

# THESE DE DOCTORAT DE

ONIRIS

COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie Santé*

Spécialité : «Nutrition et pathologies métaboliques»

Par

**Yosra DOGHRI**

**Syndrome métabolique chez le rat spontanément hypertendu :**

Etude des effets des modulateurs de la voie du GMPc sur la réactivité cardiovasculaire et sur la composition du microbiote intestinal

**Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 18 décembre 2019**

**Unité de recherche : NP3 : Nutrition, PhysioPathologie et Pharmacologie (NP3, 2017.B146)**

## Rapporteurs avant soutenance :

Valérie Nivet-Antoine    Professeur, UFR Pharmacie Paris Descartes, Paris  
Vanessa Louzier        Professeur, VetAgroSup, Lyon

## Composition du Jury :

Examineurs :    Michael Théron                            Maitre de conférence, Université de Bretagne Occidentale, Brest  
                          Ouajdi Souilem                            Professeur, ENMV Sidi Thabet, Tunisie  
Dir. de thèse :    Jean-Claude Desfontis                    Professeur, Oniris, Nantes  
Co-dir. de thèse : Mohamed Yassine Mallem    Professeur, Oniris, Nantes

### Invité(s)

Moez Rhimi        Chargé de recherche, INRA, Jouy en Josas

*Force et honneur*

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier madame Valérie Nivet-Antoine et madame Vanessa Louzier d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail

Je tiens à remercier également monsieur Michael Théron d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'examiner ce projet

Un grand merci à monsieur Ouajdi Souilem, mon professeur à l'école vétérinaire de Sidi Thabet, d'avoir accepté d'évaluer ce projet de thèse. Sans votre aide et bienveillance tout au long de ces 4 années, je ne serai pas arrivée où j'en suis aujourd'hui

Je tiens à remercier également Pr. Jean-Claude Desfontis, mon directeur de thèse pour sa confiance. Merci de m'avoir donné la chance de réaliser cette thèse au sein de votre unité et de présenter mes travaux dans plusieurs congrès.

Un grand merci à Pr. Yassine Mallem, mon co-directeur de thèse. J'ai beaucoup appris grâce à vous durant ces 4 années. Votre exigence, votre rigueur et vos encouragements à toute épreuve m'ont poussée à aller au-delà de mes limites. Sans vous, ce travail n'aurait pas pu voir le jour. Pour tout le savoir que vous m'avez transmis, je vous témoigne toute ma gratitude. J'espère avoir été à la hauteur de vos attentes. A mon tour, je vous souhaite de continuer d'exceller dans tout ce que vous entreprenez. Vous le méritez amplement.

A tous les membres de mon comité de suivi de thèse, Pr Marc-antoine Custaud, Pr Khadija Ouguerram et Dr Moez Rhimi, merci pour tous vos conseils et remarques constructives qui m'ont aidé à progresser et à améliorer mon projet.

A Chantal Thorin, merci énormément pour toute l'aide que vous nous apportez en statistiques mais aussi pour votre soutien et vos encouragements surtout pendant cette dernière ligne droite.

A Dr. Laurence Dubreil, un grand merci pour votre disponibilité et toute votre aide en immunofluorescence. Merci aussi de m'avoir accordé du temps pour me former à l'utilisation des microscopes confocaux.

A Mireille Ledevin, d'abord merci d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenue, et merci pour tes conseils et ton aide dans la préparation des lames et la mise en place du protocole. Ce n'était pas gagné d'avance mais la persévérance et la détermination finissent toujours par payer.

Merci à tous les membres de l'unité de Pharmacologie et tout particulièrement à Sylvie. Tu es arrivée aux tout derniers mois de cette thèse mais cela ne m'a pas empêché de passer d'agréables

moments en ta compagnie. Toujours aussi souriante et chaleureuse, merci infiniment pour ton soutien et tes encouragements pendant les moments de doute et d'angoisse. Merci également à Hervé Pouliquen, Frédérique Sauvaget, Françoise Bodin et Martine Kammerer pour la bonne humeur et l'ambiance conviviale pendant les pauses café et les déjeuners à la cafet.

A tous les membres de l'animalerie rongeurs : Béatrice Blanchet, Patrick, Marion et Orane pour, merci pour toute l'aide que vous m'avez apportée et merci également pour votre soutien

A mes parents, je ne vous remercierai jamais assez. Merci d'avoir fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. Vous avez toujours été mes plus grands supporters. Merci de n'avoir jamais cessé de croire en moi. Votre présence à mes côtés n'a pas de prix.

A ma sœur, Ikram, on est devenues encore plus soudées depuis qu'on s'est éloignées l'une de l'autre. Je te remercie du fond du cœur pour tout. Je te souhaite toute la réussite que tu mérites et beaucoup de bonheur.

A mon beau-frère Wassim, merci pour ton soutien. Vous voir de temps en temps, m'a fait énormément de bien. Je te souhaite à mon tour, une très bonne continuation pour la suite.

A mes petits neveux, mes petits anges Yassine et Yasmine. Merci d'avoir fait de moi une tata aussi comblée et épanouie.

A mes cousins Meriem, Mehdi, Ons et Malek pour vos encouragements. Je vous souhaite beaucoup de bonheur et de belles choses. Nos vacances d'été à Sousse me manquent énormément

A ma meilleure amie Ramla, ma deuxième sœur, comme on dit, les amis c'est comme les étoiles, on ne les voit pas tout le temps, mais on sait qu'ils sont là. Merci d'avoir été toujours aussi présente tout au long de ces 4 années. Nos conversations m'ont beaucoup aidé à traverser les périodes difficiles. Tu pourras toujours compter sur moi pour être présente quand tu en auras besoin

A mes amies Dorra et molka merci beaucoup pour votre soutien. Vous me manquez énormément

A tout ceux que j'ai eu la chance de croiser pendant ce bon bout de chemin et qui sont devenus ma deuxième famille, je vous dédie ce travail. Merci de m'avoir aidée à m'intégrer et de m'avoir tout de suite acceptée

A Camille, Maxence et Coralie, merci beaucoup pour vos encouragements. Maxence, un grand merci pour les petites escapades à la Rochelle. Je vous attends comme prévu à Tunis.

A Michelle, beaucoup plus qu'une simple collègue. Une amie et une confidente. Ensemble, on a tout partagé, les moments de stress, de doute, de pleurs mais aussi, les moments de réussite et de joie. Merci pour tous ces bons moments : nos fous rires, nos blagues, nos conneries... Tout va me manquer mais je compte sur toi pour continuer à tenir le flambeau. Je te souhaite une vie pleine d'amour et de réussite.

A Ophélie et Clément, deux belles personnes avec beaucoup de qualités humaines. Je m'estime chanceuse de vous avoir rencontrés. Merci d'avoir été là quand j'avais besoin de vous.

A Alex, Léna, Loris, Alexandra, Cyril, Giovanni, Chloé, Maurine, Niki et Kévin. Vous avez partagé avec moi ce petit bureau et je suis contente de vous avoir tous rencontrés. Je me suis sentie toujours bien entourée grâce à vous. Merci

Merci également à Elie, Julien, Romain, Florian et Alice pour les bons moments qu'on a partagés ensemble. Je vous souhaite une bonne continuation pour la suite.

Enfin, je tiens à dédier ce travail à Samuel pour son soutien et ses encouragements quotidiens. Merci pour toute l'aide que tu m'as apportée et pour tous ces mois très riches en émotions. Tu es un cadeau tombé du ciel au moment où j'en avais le plus besoin. Tu pourras à ton tour compter sur moi dans ta nouvelle aventure.

## Liste des abréviations

- AA Acide arachidonique
- AC Adénylate cyclase
- Acétyl-CoA Acétyl-coenzyme A
- Ach Acétylcholine
- AGCC Acide gras à courtes chaînes
- AGL Acide gras libre
- Akt Protéine kinase B
- AMPc Adénosine monophosphate cyclique
- Ang II Angiotensine II
- ANGPTL4 Angiopeitin-like protein 4
- ARK-1  $\beta$  Kinase du récepteur  $\beta$ -adrénergique de type 1
- ATP Adénosine-triphosphate
- BH<sub>4</sub> Tétrahydrobioptérine
- [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> Concentration intracellulaire en calcium
- CaM kinases Protéine kinase Ca<sup>2+</sup>/calmoduline dépendante
- CaM Calmoduline
- Cav-1 Calvéoline-1
- CML Cellule musculaire lisse
- CO<sub>2</sub> Dioxyde de carbone
- COX Cyclooxygénase
- CRP Protéine C réactive
- DAG Diacylglycérol
- eCB *endocannabinoïde*
- EDHF « Endothelium-derived hyperpolarizing factor »
- eNOS Monoxyde d'azote synthase endothéliale
- ERO Espèce réactive à l'oxygène
- ET-1 Endothéline-1
- FAD Flavine adénine dinucléotide
- FMN Flavine mononucléotide
- GC Guanylate cyclase
- GCs Guanylate cyclase soluble

- GLUT « Glucose transporter protein »
- GMPc Guanosine monophosphate cyclique
- GRK « G-protein-coupled receptor kinase »
- GTP Guanosine triphosphate
- HDL « High density lipoprotein »
- HTA Hypertension artérielle
- IL-6 Interleukine-6
- iNOS Monoxyde d'azote synthase inductible
- IP<sub>3</sub> Inositol triphosphate
- IP<sub>3</sub>R Récepteur de l'inositol triphosphate
- IRS « Insulin receptor substrate »
- LDL « Low density lipoprotein »  
Lipoprotéine de basse densité
- LPS lipopolysaccharide
- MAPK « Mitogen-activated protein kinases »
- MCP-1 « Monocyte chemoattractant protein 1 »
- MLCP « Myosin light chain phosphatase »
- NADPH Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- NCX Echangeur Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>
- nNOS Monoxyde d'azote synthase neuronale
- NO Monoxyde d'azote
- NOS Monoxyde d'azote synthase
- NRPA Récepteur peptide natriurétique de type A
- O<sub>2</sub><sup>-</sup> Anion superoxyde
- O<sub>2</sub> Dioxygène
- OMS Organisation mondiale de la santé
- ONOO<sup>-</sup> Peroxynitrite
- PDE Phosphodiesterase
- PDK-1 Protéine kinase-1 dépendante de la protéine 3-phosphoinositide
- PGI<sub>2</sub> Prostaglandine I<sub>2</sub>
- PI3K Phosphoinositide 3-kinase
- PIP<sub>2</sub> Phosphoinositide-4,5-biphosphate
- PIP<sub>3</sub> Phosphoinositide-3,4,5-triphosphate

- PKA Protéine kinase A
- PKC Protéine kinase C
- PKG Protéine kinase G
- PLA Phospholipase A
- PLB Phospholamban
- PLC Phospholipase C
- PN Peptides natriurétiques
- RCPG Récepteur couplé aux protéines G
- RhoA « Ras homolog type A »
- RYR Récepteur à la ryanodine
- Ser Serine
- SERCA « Sarco-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATP<sub>ase</sub> »
- SHR « Spontaneously hypertensive rat »
- SNS Système nerveux sympathique
- SOD Superoxyde dismutase
- TG Triglycérides
- TNF- $\alpha$  « Tumor necrosis factor  $\alpha$  »
- TXA<sub>2</sub> Thromboxane A<sub>2</sub>
- VLDL « Very low density lipoprotein »



# Sommaire

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
I. Physiologie cardiovasculaire .....	3
1. Physiologie cardiaque .....	3
1.1 Généralités .....	3
1.2 Contrôle par le système orthosympathique et parasymphathique.....	5
1.3 Réponse cardiaque à la stimulation $\beta$ -adrénergique.....	6
1.3.1 Généralités sur les récepteurs $\beta$ -adrénergiques.....	6
1.3.2 Contrôle de la fonction cardiaque via les récepteurs $\beta$ -adrénergiques.....	6
2. Physiologie vasculaire.....	10
2.1 Structure de la paroi vasculaire.....	10
2.2 Principales fonctions de l'endothélium .....	11
2.3 Synthèse et rôle du monoxyde d'azote.....	11
2.4 Physiologie de la vasomotricité adrénérgique .....	13
2.4.1 Vasoconstriction $\alpha$ -1 adrénérgique .....	14
2.4.2 Contrôle de la vasomotricité via les récepteurs $\beta$ -adrénergiques.....	14
2.5 Contrôle de la vasorelaxation dépendante de l'endothélium .....	17
II. Le syndrome métabolique.....	18
1. Historique .....	18
2. Définitions et classification .....	19
3. Prévalence .....	21
4. Physiopathologie du syndrome métabolique.....	21
4.1 Obésité abdominale et inflammation.....	22
4.2 Résistance à l'insuline .....	23
4.3 Hypertension artérielle .....	25
4.4 Les dyslipidémies.....	25
III. Syndrome métabolique et complications cardiovasculaires.....	27

1.	Hyperactivité du système nerveux sympathique .....	27
1.1	Hyperactivité du système nerveux sympathique et hypertension artérielle .....	27
1.2	Hyperactivité du système nerveux sympathique et obésité .....	28
1.3	Hyperactivité du système nerveux sympathique et insulino-résistance .....	30
1.4	Hyperactivation du système nerveux sympathique et dyslipidémies .....	30
2.	Dysfonctions cardiaques .....	31
2.1	Altération des récepteurs $\beta$ -adrénergiques .....	32
2.2	Altération de la signalisation $\beta$ -adrénergique .....	34
3.	Dysfonctions vasculaires .....	34
3.1	Hyporéactivité vasculaire .....	34
3.2	Dysfonction endothéliale .....	35
3.2.1	Mécanismes biologiques impliqués .....	36
3.2.1.1	Diminution de la production / activité du NO .....	36
3.2.1.2	Le stress oxydant : mécanisme clé dans la dysfonction endothéliale .....	36
3.3	Dysfonction endothéliale et syndrome métabolique .....	38
3.3.1	Dysfonction endothéliale et hypertension artérielle .....	38
3.3.2	Dysfonction endothéliale et obésité .....	38
3.3.3	Dysfonction endothéliale et insulino-résistance .....	40
3.3.4	Dysfonction endothéliale et dyslipidémies .....	40
3.3.5	La dysfonction endothéliale et athérosclérose .....	41
IV.	Le microbiote intestinal .....	41
1.	Définition .....	41
2.	Composition .....	41
3.	Facteurs influençant la composition du microbiote intestinal .....	43
3.1	Influence du terrain génétique .....	43
3.2	Influence du régime alimentaire .....	44
3.3	Influence de la prise médicamenteuse .....	44

4.	Principales fonctions du microbiote intestinal .....	44
4.1	Fonctions métaboliques .....	44
4.2	Fonction protectrice.....	45
5.	Syndrome métabolique et dérèglement du microbiote intestinal .....	45
5.1	Microbiote intestinal et hypertension artérielle .....	45
5.2	Obésité et microbiote intestinal.....	46
5.3	Insulinorésistance et microbiote intestinal.....	46
V.	Approche thérapeutique .....	47
1.	Mesures hygiéno-diététiques .....	47
1.1.	Règles diététiques.....	47
1.2	Activité physique .....	47
1.3	Les probiotiques.....	48
2.	Traitements pharmacologiques.....	49
	<b>Position du problème et Objectifs .....</b>	<b>51</b>
	<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>53</b>
I.	Matériel biologique et protocole expérimental .....	54
1.	Animaux.....	54
2.	Modèle animal de syndrome métabolique .....	54
3.	Traitement pharmacologique.....	55
II.	Suivi expérimental.....	56
III.	Etude in vivo.....	57
1.	Suivi de l'évolution du poids corporel et de la circonférence abdominale .....	57
2.	Mesure de la pression artérielle .....	57
3.	Test de tolérance au glucose.....	58
4.	Etude de la composition du microbiote intestinal.....	58
4.1	Prélèvement de fèces .....	58
4.2	Analyse de la composition du microbiote fécal par séquençage 16S.....	59

IV.	Etude ex vivo .....	60
1.	Evaluation de la fonction cardiovasculaire sur cœur isolé et perfusé .....	60
1.1	Prélèvement du coeur .....	60
1.2	Principe de la méthode de Langendorff.....	61
1.3	Substance pharmacologique utilisée .....	62
1.4	Paramètres cardiaques évalués.....	63
1.5	Traitement des données .....	63
2.	Mesure de la réactivité vasculaire sur aorte thoracique isolée .....	64
2.1	Préparation des anneaux aortiques .....	64
2.2	Montage.....	64
2.3	Mesure de la réactivité vasculaire .....	65
2.4	Traitement des données .....	66
2.5	Agents pharmacologiques.....	67
V.	Etude biochimique .....	68
1.	Evaluation du profil lipidique.....	69
2.	Détermination des concentrations en insuline dans le plasma .....	69
3.	Dosage du GMPc dans le tissu aortique, le cœur et la graisse épидидymale .....	70
VI.	Etude immunohistochimique .....	70
1.	Fixation et inclusion des tissus .....	71
2.	Coupe des tissus.....	71
3.	Immunomarquage .....	71
VII.	Analyses statistiques .....	74
	<b>Résultats.....</b>	<b>75</b>
	<b>Article 1 : Sildenafil citrate long-term treatment effects on cardiovascular reactivity in a SHR experimental model of metabolic syndrome .....</b>	<b>76</b>
	<b>Article 2: Effects of soluble guanylate cyclase chronic stimulation on cardiovascular reactivity in spontaneously hypertensive rats with metabolic syndrome .....</b>	<b>94</b>

<b>Article 3: Cardiovascular and metabolic effects of chronic treatment with mirabegron in spontaneously hypertensive rats after cafeteria-diet feeding.....</b>	<b>128</b>
<b>Résultats complémentaires : Etude des effets de la modulation de la voie du GMPc sur la composition du microbiote intestinal des SHR avec un syndrome métabolique induit .</b>	<b>153</b>
<b>Discussion générale .....</b>	<b>160</b>
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>171</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>173</b>

## Liste des Figures

<b>Figure 1</b> : Illustration de la vascularisation du cœur .....	4
<b>Figure 2</b> : Mécanisme de contraction et relaxation du cardiomyocyte .....	5
<b>Figure 3</b> : Schéma simplifié des voies de signalisation des récepteurs $\beta 1$ et $\beta 3$ -adrénergiques cardiaques .....	7
<b>Figure 4</b> : Schéma de la voie de signalisation des récepteurs $\beta 2$ -adrénergiques cardiaques. ....	9
<b>Figure 5</b> : Structure des vaisseaux sanguins (Servier Medical Art) .....	11
<b>Figure 6</b> : Mécanisme de relaxation du muscle lisse via les cellules endothéliales. ....	13
<b>Figure 7</b> : Signalisation intracellulaire de la contraction des CLMV après activation du récepteur $\alpha$ -1 adrénergique. D'après Cavalli et al. (2002) ; Wright et al. (2013) .....	14
<b>Figure 8</b> : Schéma illustrant les différentes voies de signalisation des récepteurs $\beta$ -adrénergiques dans les vaisseaux .....	16
<b>Figure 9</b> : Voies de synthèse du NO via la eNOS par les voies dépendantes et indépendantes du calcium. ....	18
<b>Figure 10</b> : Mécanismes d'implication des AGL dans l'altération du signal insulinique .....	24
<b>Figure 11</b> : Schéma récapitulatif de la physiopathologie du syndrome métabolique .....	26
<b>Figure 12</b> : Désensibilisation homologue des récepteurs $\beta 1$ -adrénergiques cardiaques .....	33
<b>Figure 13</b> : Altération moléculaire dans la cellule endothéliale en présence d'un facteur de risque cardiovasculaire. ....	37
<b>Figure 14</b> : Schéma illustrant les principaux stress physico-chimiques et la concentration bactérienne dans chaque compartiment du tractus gastro-intestinal. ....	43
<b>Figure 15</b> : Contrôle de la lipolyse dans l'adipocyte humain via la voie de signalisation du GMPc. ....	50
<b>Figure 16</b> : Schéma illustrant les différentes étapes du protocole expérimental mis en place pour étudier les effets de l'activation chronique de la voie du GMPc, sur la fonction cardiaque, la réactivité vasculaire et la composition du microbiote intestinal des SHR avec un syndrome métabolique induit expérimentalement.....	56
<b>Figure 17</b> : Pléthysmographie caudale chez un rat vigile .....	58
<b>Figure 18</b> : Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'analyse du microbiote intestinal. ....	60
<b>Figure 19</b> : Schéma montrant le cœur et les vaisseaux d'intérêt pour le prélèvement chez le rat.....	61
<b>Figure 20</b> : schéma de montage du cœur isolé et perfusé selon la méthode Langendorff .....	62
<b>Figure 21</b> : Exemple de tracé obtenu après stimulation $\beta$ -adrénergique .....	64

<b>Figure 22</b> : Schéma de montage des cuves à organes isolés permettant la construction de courbes concentration-réponses cumulatives avec anneaux d'aorte thoracique de rat. ....	65
<b>Figure 23</b> : Schéma illustrant un exemple de tracé de CCRC à la phényléphrine et à l'acétylcholine construites sur des anneaux aortiques de SHR. ....	67
<b>Figure 24</b> : Schéma illustrant les différentes étapes du test ELISA. ....	69
<b>Figure 25</b> : Dosage immunoenzymatique ELISA. ....	70
<b>Figure 26</b> : Image d'une coupe d'aorte thoracique (1) contrôle négatif, marquée avec un anticorps anti-NOS endothéliale (2) et avec un anticorps anti-NOS inductible (3). ....	73
<b>Figure 27</b> : Mécanismes hypothétiques impliqués dans l'altération de la contraction vasculaire à la phényléphrine .....	168
<b>Figure 28</b> : Voies de signalisation vasculaire de l'insuline .....	169

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Définitions du syndrome métabolique selon différents auteurs .....	20
<b>Tableau 2</b> : Composition de l'aliment standard .....	54
<b>Tableau 3</b> : Composition du régime « Cafeteria diet ».....	55
<b>Tableau 4</b> : Répartition des différents groupes .....	56
<b>Tableau 5</b> : Composition de la solution de Krebs .....	63
<b>Tableau 6</b> : Liste des substances pharmacologiques utilisées pour l'étude de la réactivité cardiovasculaire.....	68
<b>Tableau 7</b> : liste des anticorps primaires et secondaires utilisés dans cette étude .....	72



# **Introduction**

De nos jours, les maladies cardiovasculaires représentent l'une des principales causes de mortalité aussi bien dans les pays industrialisés que dans les pays en voie de développement. Ceci s'explique par l'augmentation de la prévalence de plusieurs facteurs de risques cardiovasculaires tels que l'insulinorésistance, les dyslipidémies, l'hypertension artérielle... Une tendance à l'association de plusieurs de ces anomalies chez le même individu a été observée donnant naissance au concept de syndrome métabolique (Huang 2009). Actuellement, un quart des populations américaines et européennes est touché par ce syndrome ce qui a fait de ce phénomène l'un des plus importants problèmes de santé publique de notre époque. Bien que multifactoriel, les causes les plus souvent impliquées pour expliquer la prévalence de plus en plus élevée du syndrome métabolique sont une prédisposition génétique associée à un mode de vie inadapté où la sédentarité et la consommation excessive en graisses et en sucres occupent une place majeure. En vue de l'augmentation inquiétante de ce nouveau fléau, de nouvelles recherches ont vu le jour pour essayer de découvrir l'implication de nouveaux facteurs. Le microbiote intestinal apparaît depuis quelques années, comme un de ces nouveaux facteurs clés de santé. Ce dernier serait aussi impliqué dans le développement du syndrome métabolique et des altérations cardiovasculaires qui lui sont associées.

La prise en charge du syndrome métabolique vise essentiellement à réduire les composantes de ce syndrome et par conséquent, à réduire les risques d'apparition d'accidents cardiovasculaires. A ce jour, de plus en plus d'études sont consacrées à la recherche de nouvelles thérapies permettant de lutter contre l'augmentation inquiétante du syndrome métabolique. Cependant, à notre connaissance, les effets de l'activation à long-terme de la voie du guanosine monophosphate cyclique (GMPC) sur les altérations cardiovasculaires et la dysbiose intestinale associées au syndrome métabolique n'ont jamais été étudiés.

L'objectif de ma thèse est d'étudier dans un premier temps, la modification de la fonction cardiovasculaire, et de la composition du microbiote intestinal dans un modèle animal de syndrome métabolique induit et d'évaluer dans un second temps, les effets de l'activation chronique de la voie du GMPC sur ces deux cibles.

Ce mémoire comporte 4 sections :

Une première partie consacrée à une étude bibliographique dans laquelle, nous rappellerons d'abord, brièvement quelques éléments de la physiologie cardiovasculaire afin de pour mieux comprendre la physiopathologie du syndrome métabolique. Dans un deuxième et troisième chapitre, nous introduisons quelques notions du syndrome métabolique et les principales complications cardiovasculaires qui lui sont associées. Ensuite, nous aborderons le microbiote

intestinal et son lien avec le syndrome métabolique. Enfin, nous finirons avec un chapitre sur les principales approches thérapeutiques utilisées en présence de syndrome métabolique.

Dans la deuxième partie, nous décrirons les matériels et méthodes mis en œuvre au cours de l'étude expérimentale.

Les résultats de ce travail seront par la suite exposés et discutés. Nous terminerons par une partie conclusive, ouvrant sur plusieurs perspectives.

## I. Physiologie cardiovasculaire

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les altérations cardiovasculaires associées au syndrome métabolique, nous allons commencer par un bref rappel sur les principales notions de la physiologie cardiovasculaire.

### 1. Physiologie cardiaque

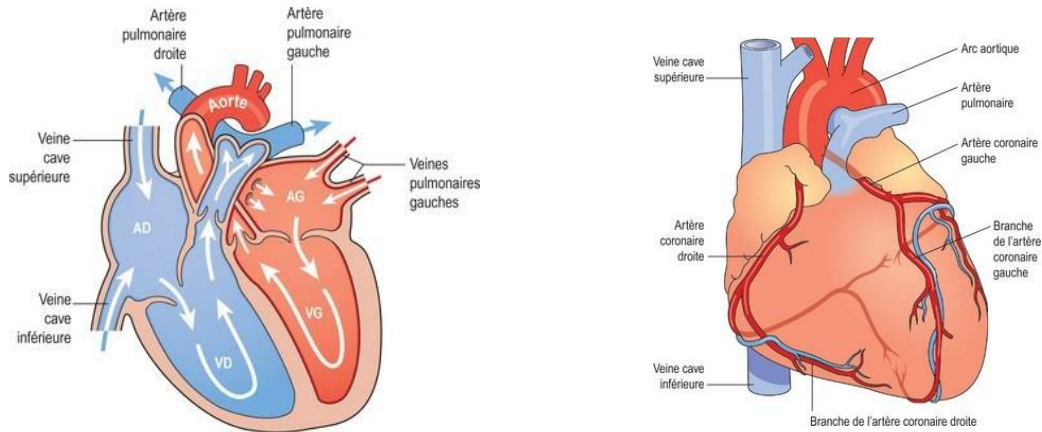
#### 1.1 Généralités

Le cœur comporte deux pompes propulsives fonctionnant parallèlement : le « cœur gauche » assurant la circulation systémique et le « cœur droit » assurant la circulation pulmonaire.

Chacun comporte un atrium (ou oreillette) et un ventricule qui expulse le sang vers l'artère pulmonaire en direction des poumons pour le ventricule droit et vers l'aorte en direction des autres organes pour le ventricule gauche. La circulation systémique alimente ainsi en parallèle les différents organes par les branches de division de l'aorte. Le sang issu de ces organes, pauvre en oxygène et riche en déchets est collecté par les veines caves inférieure et supérieure pour être collecté dans l'atrium droit.

La vascularisation du myocarde est assurée par les artères coronaires et le sinus coronaire qui vont directement dans l'atrium droit. Les poumons reçoivent par l'artère pulmonaire, du sang veineux (à faible teneur d'oxygène) mais ils reçoivent en outre du sang artériel par les artères bronchiques (constituant la vascularisation systémique pulmonaire) qui se drainent dans l'atrium gauche (**Figure 1**).

La phase du cycle pendant laquelle le myocarde se contracte et éjecte le sang vers les tissus est appelée *systole*, celle pendant laquelle il se relâche et se remplit, *diastole*. Il existe ainsi des systoles (suivies de diastoles) auriculaires droite et gauche, pratiquement simultanées, et des systoles (suivies de diastoles) ventriculaires droite et gauche, également quasi simultanées.



**Figure 1:** Illustration de la vascularisation du cœur

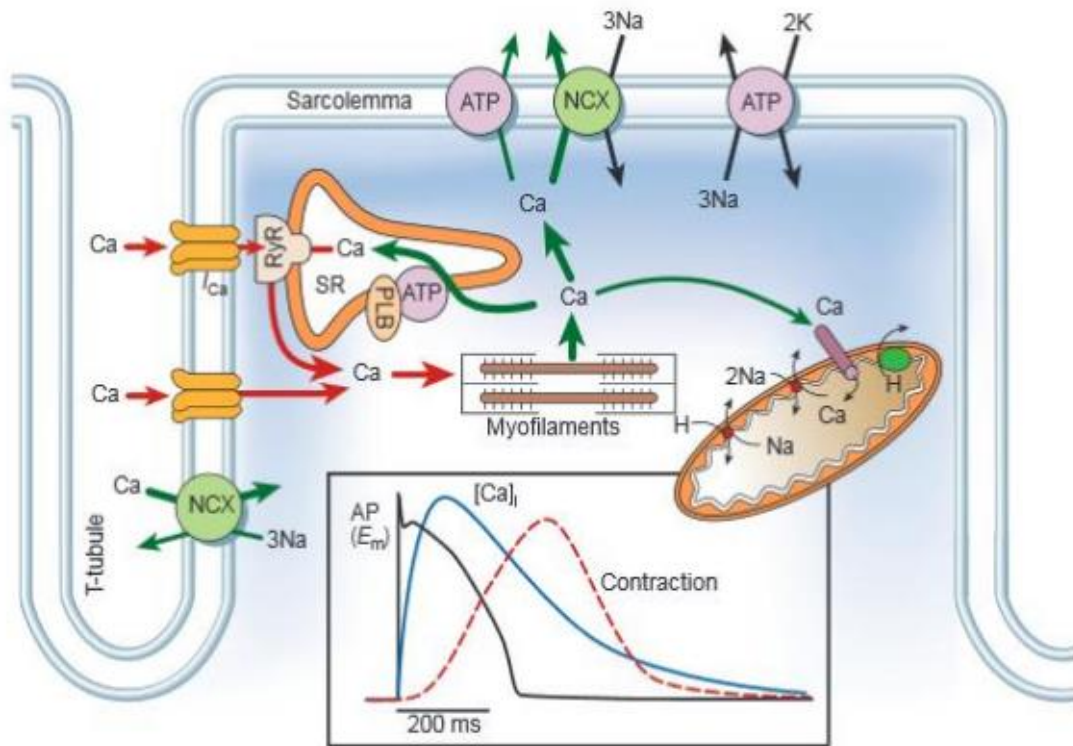
AD : atrium droit, VD : ventricule droit, AG : atrium gauche, VG : ventricule gauche

En revanche, les activités auriculaires et ventriculaires ne sont pas simultanées : les activités auriculaires précèdent de quelques fractions de seconde les activités électriques et mécaniques ventriculaires.

Au niveau du cardiomyocyte, l'ion calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) joue un rôle central dans la répétition du cycle contraction-relaxation du myocarde. En effet, l'ion calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) extracellulaire entre à chaque dépolarisation via les canaux calciques voltage dépendants de type L. Cette entrée déclenche la libération d'une grande quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers les canaux calciques du réticulum sarcoplasmique (via le récepteur à la Ryanodine RYR). Il en résulte une augmentation de la concentration calcique cytosolique disponible pour interagir avec les protéines contractiles, et donc une augmentation de la force de contraction des cardiomyocytes (**Figure 2**).

Pendant la repolarisation du cardiomyocyte, le  $\text{Ca}^{2+}$  est rapidement repompé dans le réticulum sarcoplasmique par une  $\text{Ca}^{2+}$ -adénosine triphosphatase (ATPase) appelée SERCA ou extrudé hors de la cellule par l'échangeur  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  (NCX) ce qui entraîne la relaxation.

La capacité d'échange  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  dépend étroitement de la concentration cytosolique en Na. En effet, l'échangeur utilise le gradient sodique pour déplacer un  $\text{Ca}^{2+}$  vers le milieu extracellulaire contre son propre gradient de concentration. Le sodium entré dans le cardiomyocyte est ensuite externalisé par la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (**Figure 2**).



**Figure 2:** Mécanisme de contraction et relaxation du cardiomyocyte

D'après Bers, 2002

La contraction est régulée par des mécanismes intrinsèques et extrinsèques. Le principal mécanisme intrinsèque est représenté par la loi de Starling (augmentation progressive de la force de contraction au fur et à mesure que le remplissage ventriculaire s'opère).

### 1.2 Contrôle par le système orthosympathique et parasympathique

Les catécholamines représentent les principales hormones régulatrices libérées par le système orthosympathique. Au niveau cellulaire, elles agissent sur un complexe étroitement couplé associant le récepteur  $\beta_1$ -adrénergique ( $R \beta_1$ ), la protéine Gs et l'adénylate cyclase (AC) qui produit l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) qui active la protéine kinase A (PKA).

Le système  $\beta$ -adrénergique autrefois considéré uniquement comme un stimulateur cardiaque (inotrope et chronotrope positif), présente désormais des mécanismes plus complexes depuis la découverte dans le myocarde humain, du récepteur  $\beta_3$ -adrénergique dont l'activation entraîne un effet inotrope négatif (Gauthier et al. 1996).

### 1.3 Réponse cardiaque à la stimulation $\beta$ -adrénergique

#### 1.3.1 Généralités sur les récepteurs $\beta$ -adrénergiques

Les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) caractérisés par leur structure à 7 domaines transmembranaires de 22 à 28 acides aminés hydrophobes reliés entre eux par des boucles hydrophiles successivement intracellulaires et extracellulaires (Venkatakrishnan et al. 2013).

Trois types de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques sont rencontrés dans le système cardiovasculaire : les  $R\beta_1$ , les  $R\beta_2$ , les  $R\beta_3$ . Le sous-type  $\beta_1$ -adrénergique est majoritairement présent à la membrane des cardiomyocytes avec un ratio  $\beta_1 / \beta_2$ -adrénergique d'environ 70% - 30% dans les oreillettes et de 80%-20% dans les ventricules (Wallukat 2002). La proportion des  $R\beta_3$  par rapport aux deux autres sous-types n'a pas encore été évaluée car il n'existe pas à l'heure actuelle de ligand suffisamment spécifique du  $R\beta_3$  pour appliquer la technique habituelle de liaison récepteur-ligand (Niclauss et al. 2006).

Selon leur type, leur localisation cardiaque ou vasculaire, leur densité, leur conformation ou encore les différents ligands présents, leur activation peut conduire à des effets variés, en empruntant des voies de signalisation dépendantes du couplage avec une protéine  $G_s$  (voie de l'AMP cyclique (AMPc)), soit du couplage avec une protéine  $G_i$  (voie du GMP cyclique (GMPc)) (Ufer and Germack 2009).

#### 1.3.2 Contrôle de la fonction cardiaque via les récepteurs $\beta$ -adrénergiques

##### ➤ Les récepteurs $\beta_1$ -adrénergiques

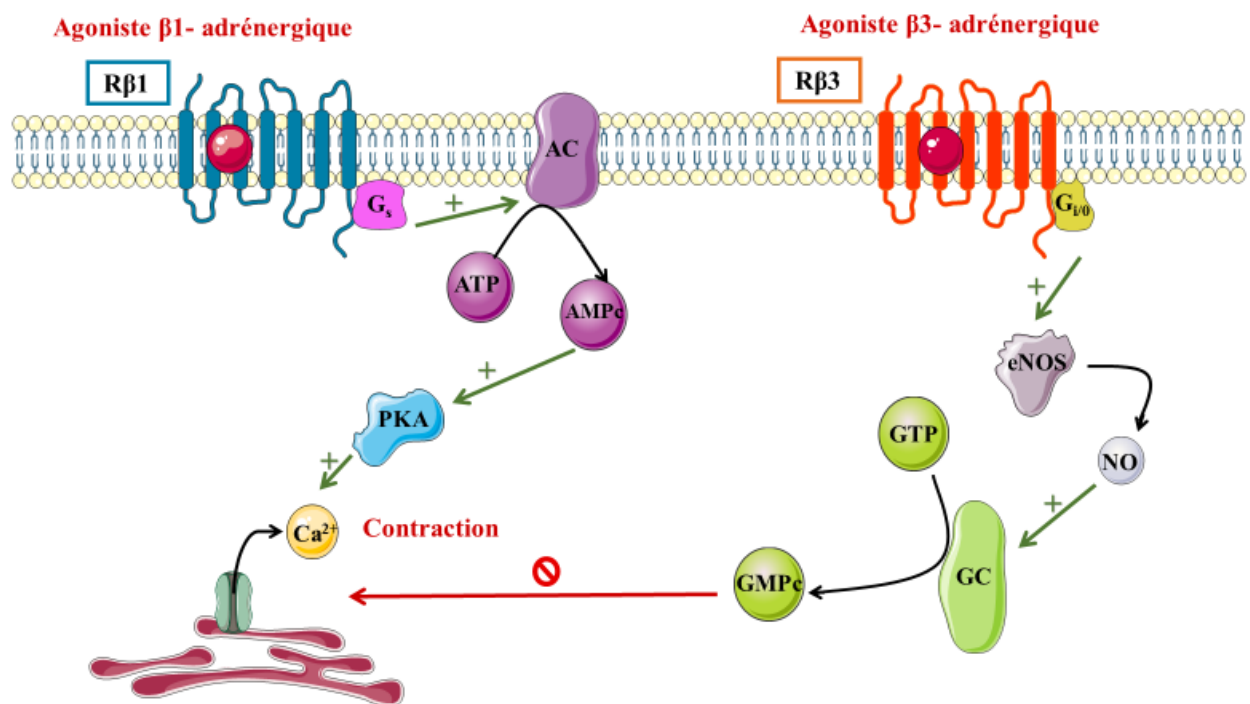
Au niveau cardiaque, la stimulation du récepteur  $\beta_1$ -adrénergique catalyse la liaison de la sous-unité  $G\alpha$  d'une protéine  $G_s$  (stimulatrice) à une molécule de guanosine triphosphate (GTP) provoquant un détachement des sous-unités  $G\beta\gamma$ . La sous-unité  $G\alpha$ -GTP libre lie et active les adénylates cyclases (AC) et par conséquent active la voie AC/ AMPc/ protéine kinase A (PKA) provoquant la phosphorylation de multiples protéines intervenant dans le couplage excitation-contraction (canaux calciques de type L, RYR, phospholamban (PLB), troponine 1) (Dessauer 2009). La phosphorylation de ces multiples cibles suite à l'activation du  $R\beta_1$  conduit à des effets inotrope (Force de contraction), lusitrope (vitesse de relaxation), chronotrope (fréquence cardiaque) et dromotrope (vitesse de conduction de l'influx nerveux) positifs.

La phosphorylation des canaux  $Ca^{2+}$  de type L par la PKA augmente la probabilité de leur ouverture de 3 à 7 fois. Il en résulte une augmentation du courant calcique de type L et donc

une augmentation de la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  ce qui provoque une augmentation de l'amplitude de la contraction (Keef et al. 2001) (**Figure 3**).

De plus, la PKA est capable d'accélérer le repompage du calcium par le réticulum sarcoplasmique en phosphorylant le PLB. En effet, Le PLB joue un rôle dans la régulation de la pompe SERCA. Cette phosphorylation entraîne une dissociation du PLB de la SERCA et lève ainsi l'inhibition qu'il exerce sur la SERCA accélérant ainsi la recapture du calcium par le réticulum endoplasmique (R.-P. Xiao et al. 2006). Il en résulte une relaxation des cardiomyocytes (effet lusitrope positif) et un effet inotrope positif en augmentant le stock calcique disponible pour le cycle suivant.

De plus, l'activation des  $\text{R } \beta_1$  peut induire une apoptose des cardiomyocytes par l'activation de la voie (CaM) kinase avec une inhibition de la voie PI3K (Liang et al. 2008).



**Figure 3:** Schéma simplifié des voies de signalisation des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_3$ -adrénergiques cardiaques

D'après (Dessauer 2009; Keef et al. 2001 ; Gauthier et al. 1998; Skeberdis et al. 2008 ; Rozec and Gauthier 2006). AC : adénylate cyclase, AMPc : Adénosine monophosphate cyclique, ATP : adénosine triphosphate, PKA : phosphokinase A, eNOS : NO synthase endothéliale, GC : guanylate cyclase, GMPc : guanosine monophosphate cyclique, GTP : guanosine triphosphate, NO : monoxyde d'azote, Gs et Gi : protéines G,  $\text{R } \beta$  : récepteurs  $\beta$ -adrénergiques.

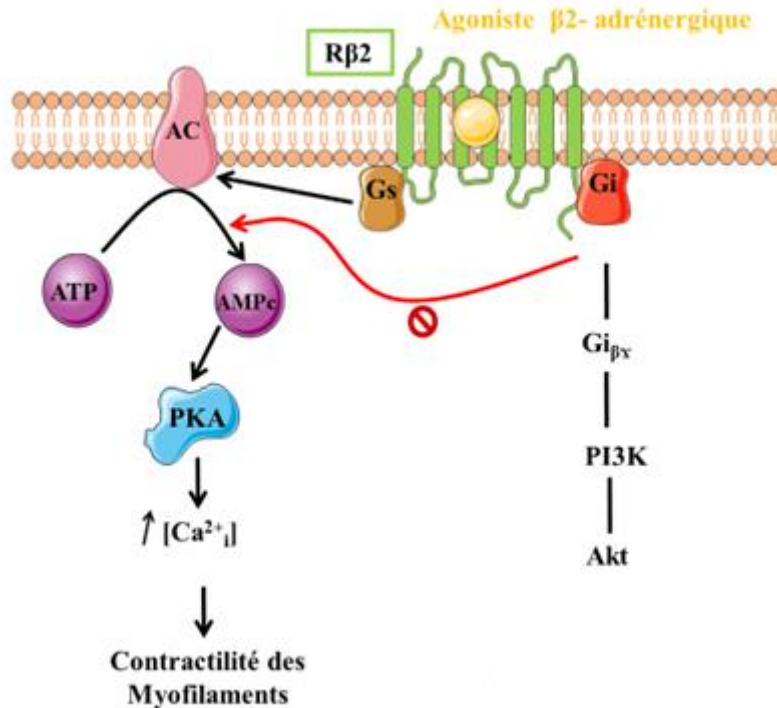
### ➤ Les récepteurs $\beta_2$ -adrénergiques

Dans le cœur sain, les récepteurs  $\beta_2$  ne représentent que 20 à 30% de l'ensemble des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques et sont localisés au niveau des cavéoles. Le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique cardiaque est un récepteur couplé à une protéine G de type Gs. Sa stimulation induit l'activation d'une cascade de signalisation AC/AMPC/PKA entraînant les mêmes effets physiologiques que ceux de l'activation des récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques (**Figure 4**). Cependant, l'effet inotrope positif est moins important que lors de la stimulation des récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques et de densité plus faible. Cela s'explique par la localisation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques au niveau des cavéoles à la membrane des cardiomyocytes (Calaghan et al. 2008) ainsi que par l'action de certaines phosphodiésterases (PDE). Comme après une stimulation du récepteur  $\beta_1$ -adrénergique, la PKA par phosphorylation des PDE3 et PDE4 impose un contrôle négatif sur les concentrations d'AMPC limitant les effets de la stimulation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. Ces effets restent localisés à la périphérie des cavéoles contrairement à ceux induit par la stimulation des récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques qui sont plus répandus dans l'ensemble du cardiomyocyte grâce à la répartition homogène du récepteur  $\beta_1$ -adrénergique sur la membrane du cardiomyocyte (R. P. Xiao 2001).

En revanche, sous une stimulation  $\beta$ -adrénergique prolongée, les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques sont capables de se lier à une protéine Gi au lieu de se lier à la protéine Gs (Devic et al. 2001). Les protéines Gi activent les PDE 4 qui détruisent l'AMPC et donc inhibent l'activité de la PKA contrairement à la signalisation des protéines G $\alpha$ . L'activation de la protéine Gi conduit également au recrutement d'autres voies de signalisation telles que la voie PI3K/Akt (**Figure 4**) ou encore la voie de la phospholipase A2 (PLA2) conduisant à la production d'acide arachidonique (Pavoine et al. 2003). Le recrutement de la PLA2 cytosolique a un effet inotrope positif modéré via une action de l'acide arachidonique sur les canaux calciques de type L, les récepteurs à la ryanodine et la PKC (Pavoine and Defer 2005). D'un autre côté, le recrutement de la voie PI3K/Akt présente des effets anti apoptotiques (W. Zhang et al. 2011) par diminution du stress oxydant (R.-P. Xiao et al. 2004).

Le couplage du récepteur à la protéine Gi conduit à des effets inotrope et lusitrope négatifs.





**Figure 4:** Schéma de la voie de signalisation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques cardiaques.

D'après Devic et al. (2001); Calaghan et al. (2008). AC : adénylate cyclase, ATP : adénosine triphosphate, AMPc : adénosine monophosphate cyclique, PKA : phosphokinase A, Gs, Gi : protéines G, PI3k : PI3K : Phosphatidyl inositol 3 kinase, Akt : protéine kinase, R $\beta$  : récepteurs  $\beta$ -adrénergiques cardiaques.

➤ Les récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques

Les récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques cardiaques ont été plus récemment décrits, ce sont des récepteurs couplés aux protéines Gi. Leur mode de fonctionnement et leurs effets sur le myocarde diffèrent de ceux des autres récepteurs. En effet, leur stimulation n'induit pas d'inhibition de la voie AMPc/PKA mais plutôt une activation de la voie du monoxyde d'azote (NO) via la NOS endothéliale (Gauthier et al. 1996; 1998). Le NO active la guanylate cyclase soluble (GCs) qui produit à son tour du GMPc. De cette activation, résulte une augmentation de la production du messenger GMPc, une inhibition des canaux calciques et une diminution des courants intracellulaires associés (Rozec and Gauthier 2006) (**Figure 3**). Le GMPc active par ailleurs, les PDE qui limitent l'activation de la PKA en détruisant l'AMPc. Tous ces mécanismes contribuent à limiter l'effet inotrope positif de la voie de signalisation des récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques alors que l'effet lusitrope positif est conservé. La stimulation des récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques induit par contre un effet chronotrope positif indirect via ses propriétés vasodilatatrices qui déclenchent le baroréflexe et donc une augmentation de la fréquence cardiaque (Rozec and Gauthier 2006; Skeberdis et al. 2008).

Chez l'homme, les effets positifs modérés de l'activation du récepteur  $\beta_3$ -adrénergique sur le courant calcique  $I_{CaL}$  pourraient avoir un rôle de contrôle de la fréquence cardiaque. D'autre part, son action sur le couplage de la NOS endothéliale et l'augmentation de l'expression de la NOS neuronale lui conférerait également un effet cardioprotecteur en luttant contre l'hypertrophie ventriculaire gauche (Moens et al. 2009; Niu et al. 2012).

## 2. Physiologie vasculaire

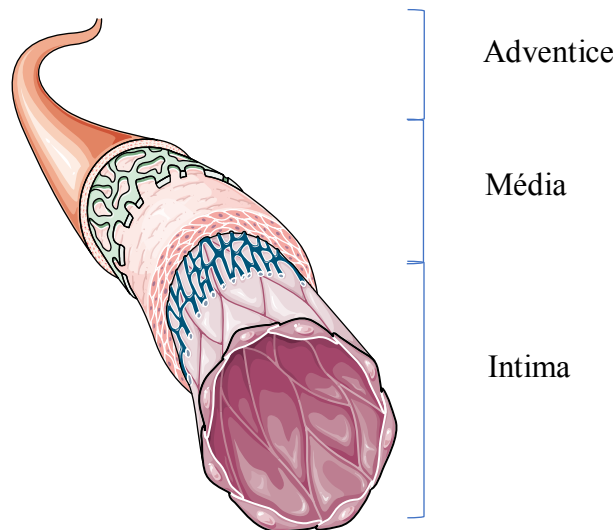
### 2.1 Structure de la paroi vasculaire

De nombreux vaisseaux sanguins de l'organisme sont constitués de 3 couches ou tuniques concentriques et leurs proportions varient selon les catégories vasculaires. Ces couches sont appelées respectivement : l'adventice, la média et l'intima ou endothélium (Kubíková et al. 2017) (**Figure 5**).

- L'adventice est la couche la plus externe de la paroi artérielle. Elle est composée de tissu conjonctif, de fibres lâches de collagène et de quelques fibres élastiques épaisses. L'adventice contient les vasa vasorum (vaisseaux capillaires vascularisant la paroi artérielle) ainsi que des fibres nerveuses du système autonome sympathique et parasympathique. Dans les artères de gros calibre, adventice et média sont séparées par la limitante élastique externe, une couche acellulaire élastique.

- La média est la couche moyenne de la paroi artérielle. Elle est composée de collagène et d'élastine. Elle contient les cellules musculaires lisses (CML) orientées en hélice et dont la principale fonction est le maintien de l'homéostasie vasculaire. La média forme une couche compacte et d'épaisseur régulière.

- L'intima est la couche interne de la paroi artérielle. Elle est formée par l'endothélium vasculaire (monocouche de cellules pavimenteuses tapissant la face interne de tous les vaisseaux). Les cellules de l'endothélium sont appelées des cellules endothéliales soutenues par une couche mince de tissu conjonctif. Elle est séparée de la média par la limitante élastique interne.



**Figure 5:** Structure des vaisseaux sanguins (Servier Medical Art)

## 2.2 Principales fonctions de l'endothélium

L'endothélium joue un rôle clé dans la régulation de la vasomotricité par la sécrétion de substances vasoactives (vasoconstrictrices et vasodilatatrices) afin de maintenir un tonus vasculaire approprié.

Parmi les substances vasoconstrictrices libérées par l'endothélium, nous retrouvons principalement l'endothéline-1 (ET-1), la thromboxane AII (TXA2) et l'angiotensine II (Ang II). Pour les substances vasodilatatrices, il s'agit principalement du monoxyde d'azote (NO), du facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) et de la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) (Cahill and Redmond 2016; Cobos-Segarra et al. 2018).

En conditions physiologiques, il existe un équilibre entre ces différents facteurs afin de maintenir un tonus vasculaire adéquat et d'obtenir le niveau de pression artérielle physiologique.

L'endothélium peut exprimer également des molécules d'adhérences qui influencent le passage des leucocytes circulants dans l'intima. Il contrôle le passage inter- et transcellulaire de nombreux nutriments et hormones jouant ainsi un rôle déterminant au cours du processus inflammatoire.

## 2.3 Synthèse et rôle du monoxyde d'azote

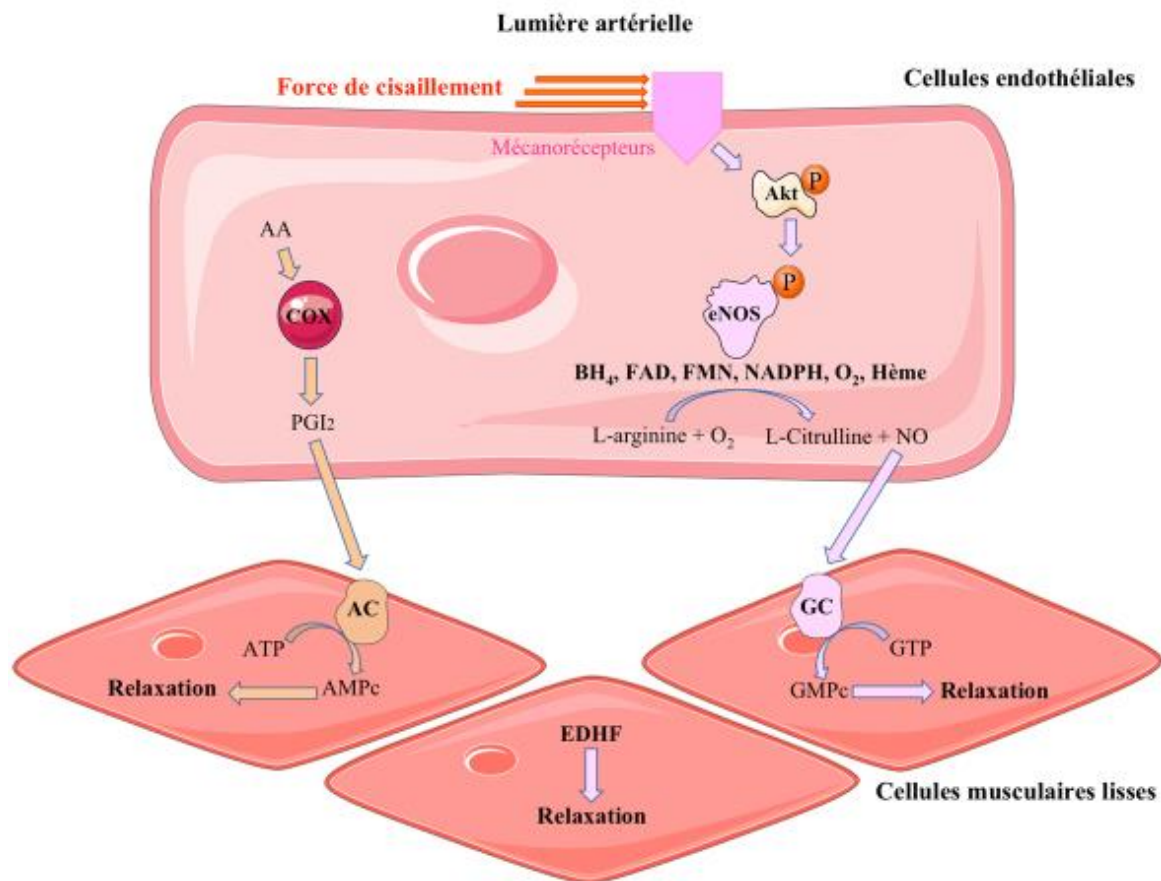
Le NO représente la principale substance vasodilatatrice synthétisée par l'endothélium (Wheatcroft et al. 2003). Ce gaz liposoluble est synthétisée par les NOS qui consomment du  $\beta$ -

nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADPH) et de l'O<sub>2</sub> pour oxyder la L-arginine en L-citrulline et NO. Les NOS utilisent pour fonctionner un ensemble de co-facteurs : la tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>), la flavine adénine dinucléotide réduit (FAD), la flavine mononucléotide (FMN) et un hème (protoporphyrine IX de fer) (Vadon-Le Goff and Sennequier 1998).

Il existe dans l'organisme trois formes de NOS : la NOS inductible (iNOS), la NOS endothéliale (eNOS) et la NOS neuronale (nNOS). La eNOS représente la principale isoforme impliquée dans la régulation de l'homéostasie vasculaire. Son activité est influencée par plusieurs facteurs parmi lesquels, les changements de concentration intracellulaire en calcium en impactent sa liaison à la calmoduline présente en grande quantité dans les calvéoles. D'autre part, l'activité de la eNOS est aussi modulée par des mécanismes de phosphorylation et déphosphorylation de certains résidus sérine et thréonine d'eNOS en réponse aux stimuli mécaniques et pharmacologiques. En effet, l'activation de la eNOS est stimulée par la phosphorylation de la sérine 1177. En revanche, elle est inhibée par la phosphorylation de la thréonine 459 (Fleming and Busse 2003). Contrairement à la eNOS, la iNOS est indépendante du calcium, son expression est induite par les cytokines et les endotoxines (Domenico 2004).

Le NO est une molécule extrêmement instable ayant une très courte durée de vie biologique. Il remplit localement de nombreuses fonctions dont les mieux connues sont la relaxation des cellules musculaires lisses sous-jacentes, l'inhibition de multiples étapes de l'athérogenèse et de la thrombogenèse telle que l'agrégation plaquettaire et la prolifération des CML, l'oxydation des lipides et la stimulation des facteurs de croissance (T. J. Anderson 2003).

Dans la paroi vasculaire, le NO diffuse de l'endothélium vers la CML sous-jacente en traversant librement les membranes cellulaires. Dans celles-ci, il se lie à la GCs, enzyme à l'origine de la production de grandes quantités de GMPc, second messenger de la relaxation vasculaire. La GMPc, en activant la phosphokinase G (PKG), entraîne une diminution de la concentration intracellulaire en calcium, induisant ainsi la vasorelaxation (Corvol 1993). L'endothélium influence et est influencé en permanence par l'écoulement du sang. En effet l'augmentation des forces de cisaillement endothélial (shear stress) par l'augmentation du débit sanguin provoque une élévation de la production de NO (Pellegrin et al. 2009) (**Figure 6**).



**Figure 6:** Mécanisme de relaxation du muscle lisse via les cellules endothéliales.

L'activation de la eNOS par les forces de cisaillement est dépendante de sa phosphorylation qui est médiée par l'activation /phosphorylation de la protéine kinase Akt (protéine kinase B) via un mécanisme calcium-indépendant.

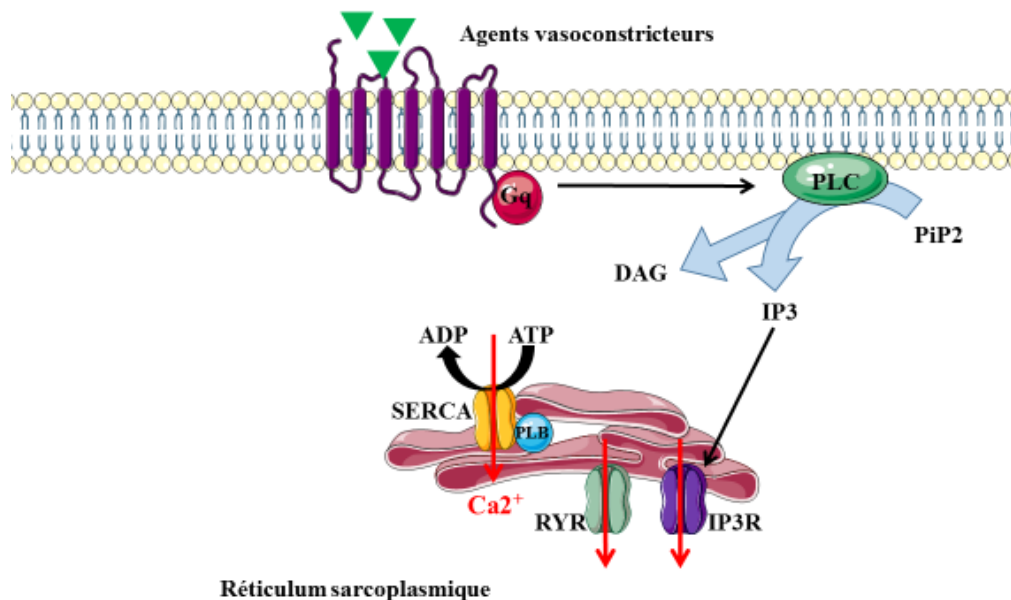
AA : acide arachidonique, COX : cyclooxygénase, PGI<sub>2</sub> : prostaglandine I<sub>2</sub>. Inspiré de Pellegrin et al. (2009).

#### 2.4 Physiologie de la vasomotricité adrénergique

La régulation adrénergique de la vasomotricité fait intervenir principalement les récepteurs  $\alpha$ -1 adrénergiques, localisés au niveau des CML vasculaires mais aussi les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, localisés au niveau des CML et des cellules endothéliales. La proportion de récepteurs  $\alpha$ -et  $\beta$ -adrénergiques et de leurs sous-types est différente en fonction de l'espèce et du lit vasculaire considéré.

### 2.4.1 Vasoconstriction $\alpha$ -1 adrénérique

Les récepteurs  $\alpha_1$  sont couplés à une protéine Gq activatrice d'une enzyme, la phospholipase C (PLC). Après stimulation du récepteur, celle-ci clive son substrat, le phosphatidylinositol 4,5 diphosphate (PIP<sub>2</sub>), constituant de la bicouche lipidique membranaire, pour obtenir deux seconds messagers : l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) et un diacylglycérol (DAG). L'IP<sub>3</sub> va se lier à son récepteur calcique (IP<sub>3</sub> R) à la surface du réticulum sarcoplasmique. Ce dernier permet la sortie massive du calcium des stocks du réticulum sarcoplasmique vers le cytosol entraînant l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. Cela provoque la contraction des CML (Cavalli et al. 2002 ; Wright et al. 2013) (Figure 7).



**Figure 7:** Signalisation intracellulaire de la contraction ces CMLV après activation du récepteur  $\alpha$ -1 adrénérique. D'après Cavalli et al. (2002) ; Wright et al. (2013)

### 2.4.2 Contrôle de la vasomotricité via les récepteurs $\beta$ -adrénériques

Dans les différents territoires vasculaires, les trois sous-types de récepteurs  $\beta$ -adrénériques sont exprimés dans la membrane des cellules endothéliales tandis que seuls les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénériques sont exprimés à la membrane des CML (Guimarães and Moura 2001). Chaque sous-type de récepteur  $\beta$ -adrénérique possède une localisation et un niveau d'expression qui varie selon le territoire vasculaire et l'espèce considérée. La vasorelaxation médiée par les catécholamines a été pendant longtemps attribuée au sous type  $\beta_2$ -adrénérique. Cependant, des études plus récentes ont montré l'implication du sous type  $\beta_1$ -adrénérique dans la

vasorelaxation  $\beta$ -adrénergique. En effet, il a été démontré que la vasorelaxation chez la souris était médiée majoritairement par des récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques (Chruscinski et al. 2001). De même, Nyborg a montré que la relaxation  $\beta$ -adrénergique des artères coronaires de résistance chez le rat est médiée par le récepteur  $\beta_1$ -adrénergique principalement (Nyborg and Mikkelsen 1985).

➤ Voie de signalisation des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques vasculaires

Dans les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires, les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques sont couplés à une protéine Gs.

Lorsque la protéine Gs est activée dans les CML, sa sous-unité  $G_{s\alpha}$  se détache des sous-unités  $\beta\gamma$  et va activer l'AC. L'AC entraîne une augmentation de la formation d'AMPc à partir de l'ATP. Cette augmentation du taux intracellulaire en AMPc va à son tour activer la PKA. La PKA va alors phosphoryler le phospholamban (PLB) ce qui provoque son détachement de la pompe SERCA permettant ainsi la recapture du calcium vers le réticulum sarcoplasmique. (Morgado et al. 2012) (**Figure 8**)

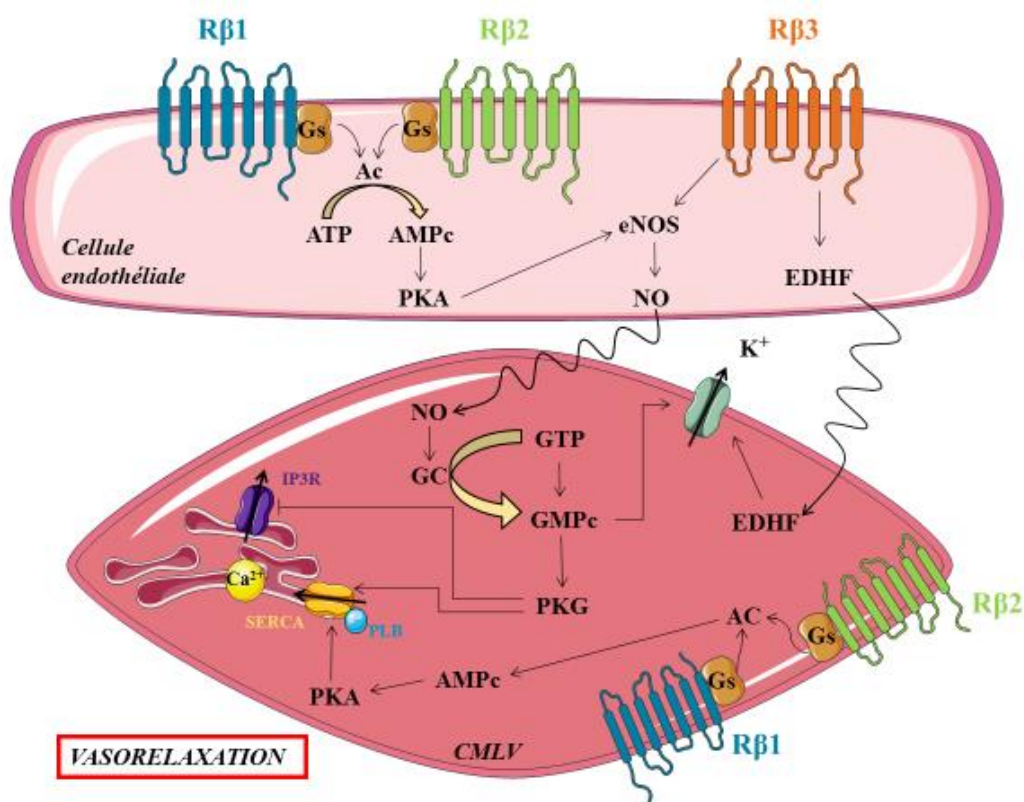
Au niveau des cellules endothéliales, la stimulation des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques entraîne l'activation de la voie AC/AMPc/PKA. La PKA active, à son tour, la eNOS qui produit ainsi du NO. Le NO diffuse de la cellule endothéliale vers la cellule musculaire lisse où il se lie à la GCs. L'activation de la GCs stimule la voie GC/ GMPc/ PKG (Francis et al. 2010). La PKG phosphoryle le PLB favorisant la recapture du calcium dans le réticulum sarcoplasmique. Il a aussi été démontré que la PKG était à l'origine de la phosphorylation du récepteur à l' $IP_3$  situé sur la membrane du réticulum sarcoplasmique. Cette phosphorylation du récepteur à l' $IP_3$  entraîne son inhibition. Il s'en suit de ce fait, une diminution de la libération de  $Ca^{2+}$  (Komalavilas and Lincoln 1994) (**Figure 8**).

L'activation de la voie des PKA et des PKG entraîne une vasorelaxation par différents autres mécanismes. Les PKA et PKG agissent sur la voie des RhoA (*Ras homolog type A*). La phosphorylation de cette voie par la PKA et PKG inactive la RhoA/ Rho-kinase. Il en résulte une activation de la phosphatase des chaînes légères de la myosine (MLCP) entraînant une déphosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC) ce qui aboutit à une vasorelaxation. La phosphorylation de la MLCP contribue aussi à la désensibilisation de l'appareil contractile (Sauzeau et al. 2000 ; Nakamura et al. 2007). De plus, l'activation des PKA et PKG entraîne une activation de plusieurs canaux ioniques de la membrane plasmique dont principalement les canaux potassiques dépendants du calcium et la  $Ca^{2+}$ -ATP<sub>ase</sub>. Ceci induit une sortie massive

des ions  $K^+$  et  $Ca^{2+}$  de la CML entrainant une repolarisation voire même une hyperpolarisation de la membrane. Cette hyperpolarisation serait à l'origine de l'inactivation des canaux calciques de type L et de l'inhibition de l'influx calcique (Tian et al. 2004 ; Y. Shi et al. 2007 ; Y. Yang et al. 2008).

➤ Voie de signalisation des récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques vasculaires

Dans les cellules endothéliales, la stimulation du récepteur  $\beta_3$ -adrénergique entraine une synthèse du NO via l'activation de la eNOS. Le NO ainsi libéré, diffuse de la cellule endothéliale vers la CML où il active la voie GC/GMPc/PKG de la même manière que pour les récepteurs  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ - adrénergiques aboutissant à une vasorelaxation (Dessy et al. 2004 ; Rozec et al. 2005 ; Feng et al. 2012). Il a été également démontré dans les artères coronaires humaines que la vasorelaxation induite par la stimulation des récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques dépendait en partie de la libération de l'EDHF (Dessy et al. 2004) (**Figure 8**).



**Figure 8:** Schéma illustrant les différentes voies de signalisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques dans les vaisseaux

AC : adénylate cyclase, ATP : adénosine triphosphate, AMPc : adénosine monophosphate cyclique, EDHF : Endothelium-derived hyperpolarizing factor, PKA : protéine kinase A, PKG :



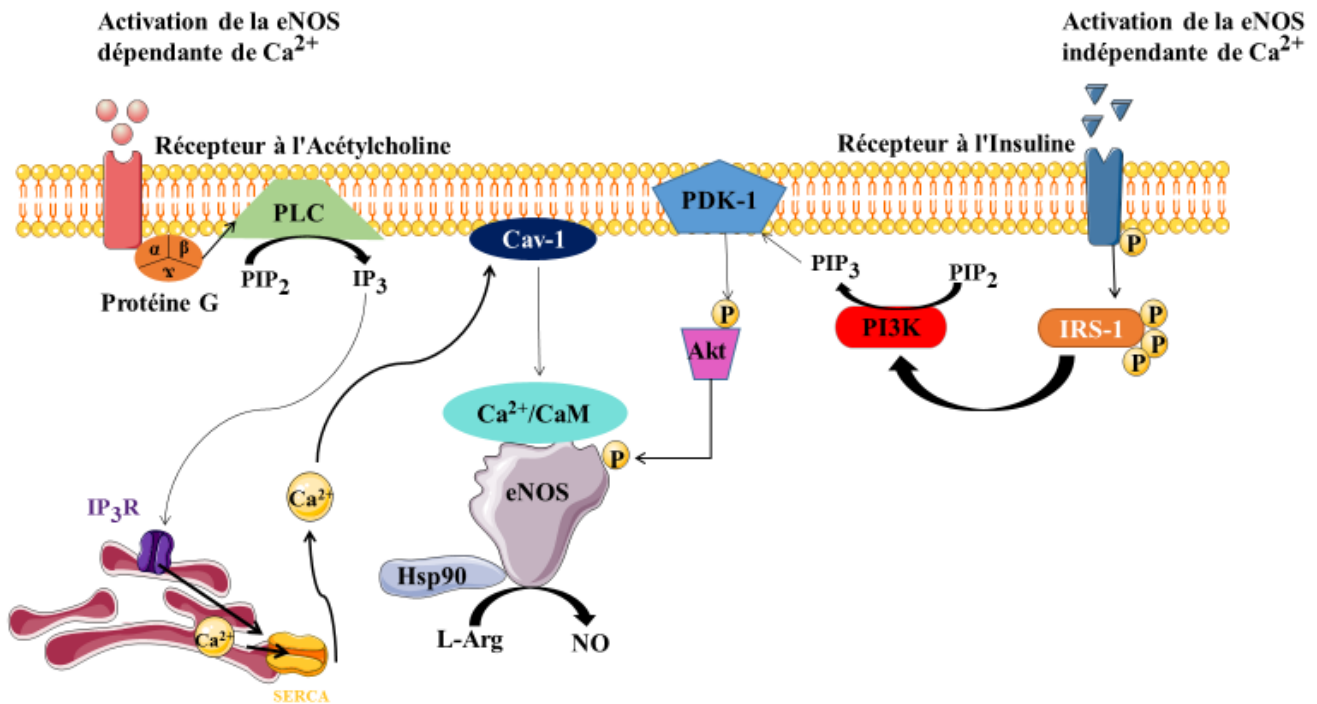
Protéine Kinase G, GC : guanylate cyclase, GTP : guanosine triphosphate, GMPc : guanosine monophosphate cyclique, NO : monoxyde d'azote, eNOS : NO synthase endothéliale, IP3R : récepteur à l'inositol triphosphate, PLB : phospholamban, SERCa : sarco/endoplasmique réticulum  $Ca^{2+}$ -ATP<sub>ase</sub>.

## 2.5 Contrôle de la vasorelaxation dépendante de l'endothélium

Comme nous l'avons cité précédemment, la eNOS représente la principale isoforme impliquée dans le maintien de l'homéostasie vasculaire. Un des principaux facteurs de régulation de l'activité de la eNOS est le changement de la concentration intracellulaire en calcium qui joue un rôle crucial dans sa liaison à la calmoduline (Walford and Loscalzo 2003 ; Domenico 2004). Furchgott et Zawadzki ont montré que l'acétylcholine (Ach) produisait une relaxation des segments de vaisseaux dont l'endothélium était intact, mais pas de ceux où il avait été sélectivement détruit. Ainsi il se trouvait démontré pour la première fois que l'endothélium peut moduler le tonus des CML sous stimulation muscarinique (Furchgott and Zawadzki 1980). Une décennie plus tard, il a été démontré que la stimulation muscarinique par le biais de l'Ach, conduit à l'activation de la eNOS de manière dépendante de la concentration intracellulaire en  $Ca^{2+}$ . En effet, la fixation de l'Ach sur son récepteur déclenche une cascade de signalisation intracellulaire dont la finalité est l'augmentation de la libération du  $Ca^{2+}$  dans le cytosol à partir du réticulum sarcoplasmique favorisant sa liaison à la calmoduline. Le complexe  $Ca^{2+}$ -calmoduline-eNOS formé après dissociation du complexe eNOS- cavéoline-1, provoque un changement de la conformation de la eNOS afin d'augmenter son activité. Ceci conduit par conséquent, à une augmentation de la synthèse du NO (Fernández de Sevilla et al. 2008 : Chédotal and Hamel 1993) (**Figure 9**).

Cependant, des études ont révélé que l'activation de la eNOS pouvait aussi être produite par une autre voie indépendante au  $Ca^{2+}$  (**figure 9**). À cet égard, il a été montré que l'insuline pouvait induire la production du NO au niveau de l'endothélium vasculaire de façon indépendante du calcium (Montagnani et al. 2001). Les effets de l'insuline sont relayés par un récepteur tyrosine kinase spécifique qui en phosphorylant plusieurs substrats, déclenche l'activation de deux voies de signalisation majeures dont la voie  $PI_3$ -kinase. La phosphorylation du substrat intracellulaire IRS-1 induit l'activation de la  $PI_3$ -kinase. Cette voie mène à la production de phosphatidylinositide-3-4-5-triphosphate (PIP3), qui par l'intermédiaire de la kinase PDK-1 (phosphoinositide-dependent kinase-1), induit l'activation des trois isoformes connus d'Akt. A son tour, Akt induit la phosphorylation du résidu kinase sérine<sup>1179</sup> de la protéine eNOS. Cette phosphorylation entraîne une augmentation de l'activité de la eNOS et

par conséquent, une augmentation de la production du NO (Montagnani et al. 2001 ; X. Shi et al. 2019).



**Figure 9:** Voies de synthèse du NO via la eNOS par les voies dépendantes et indépendantes du calcium.

D'après Montagnani et al. (2001), PDK-1 : phosphoinositide-dependent kinase-1, CaM : Calmodilune, Cav-1 : calvéoline-1, IP<sub>3</sub> : inositol 1,4,5-triphosphate, IP<sub>3</sub> R : récepteur à l'IP<sub>3</sub>, PIP<sub>3</sub> : phosphoinositide-3-4-5-triphosphate, PIP<sub>2</sub> : phosphoinositide-4,5-biphosphate

## II. Le syndrome métabolique

### 1. Historique

Les premières descriptions du syndrome métabolique datent d'il y a environ 250 ans. L'anatomiste Morgagni a établi une corrélation étroite entre l'accumulation de graisse viscérale et l'apparition de plusieurs anomalies métaboliques telles que l'athérosclérose, l'hypertension artérielle (HTA) et l'hyperuricémie (Enzi et al. 2003).

En 1923, Eskil Kylin, un médecin suédois a décrit l'association de l'hypertension artérielle, l'hyperglycémie et de l'hyperuricémie et lui a attribué le nom de syndrome « hypertension-hyperglycémie-hyperuricémie » (Nilsson 2001).

Plus tard, en 1947, le Dr Vague a attiré l'attention des autres scientifiques sur l'adiposité androïde, un phénotype très souvent associé aux anomalies métaboliques retrouvées dans le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires (Vague 1996).

A la fin des années 80, Reaven a défini le syndrome X comme étant un cortège de troubles métaboliques incluant l'intolérance au glucose, l'insulinorésistance, l'obésité viscérale, la dyslipidémie et l'hypertension artérielle (Reaven and Chen 1988).

Le syndrome X a été aussi présenté sous différentes appellations comme le syndrome d'insulinorésistance et quartet mortel avant de lui attribuer l'appellation de syndrome métabolique.

## 2. Définitions et classification

Différentes définitions du syndrome métabolique ont été proposées. On y retrouve les composantes majeures avec des niveaux chiffrés qui varient un peu d'une définition à l'autre. Dans toutes les définitions, au moins 3 critères sur 5 doivent être réunis pour constituer un syndrome métabolique (Tableau 1).

**Tableau 1:** Définitions du syndrome métabolique selon différents auteurs

Groupe d'étude	Définitions
<p><b>Organisation mondiale de la santé</b> (Alberti and Zimmet 1998)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Insulinorésistance ou anomalie glycémique :               <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Glycémie à jeûn &gt; 6,1mmol/l (110 mg/dl)</li> <li>➤ Glycémie 2heures après une charge orale en glucose &gt; 7,8 mmol/l (140mg /dl)</li> </ul> </li> <li>• HTA systolique &gt; 160 mmHg et/ou diastolique &gt; 90 mmHg</li> <li>• Triglycérides &gt; 1,7 mmol/l (150 mg/dl) et /ou high density lipoprotein (HDL)- cholestérol &lt; 0,9 mmol/l pour l'homme et &lt; 1mmol/l chez la femme</li> <li>• Obésité centrale : tour de taille/ tour de hanche &gt;0,9 pour les femmes et &gt; 0,85 pour les hommes</li> </ul>
<p><b>European Group for the study of Insulin Resistance</b> (Zimmet et al. 2005)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Insulinorésistance ou hyperinsulinémie (sujets non diabétiques seulement) Avec au moins 2 des 4 critères suivants :</li> <li>• Obésité centrale : tour de taille &gt; 94 cm chez les hommes et &gt; 80 cm pour les femmes</li> <li>• HTA systolique &gt; 140mmHg et / ou diastolique &gt; 90 mmHg ou traitement antihypertenseur en cours</li> <li>• Dyslipidémie : Triglycérides &gt; 2 mmol/l ou HDL-cholestérol &lt; 1 mmol /l</li> <li>• Glycémie à jeûn &gt; 6,1 mmol/l (110mg /dl)</li> </ul>
<p><b>National Cholesterol Education Program's Third Adult Treatment Panel</b> (ATP) III (Expert Panel on Detection, Evaluation, and</p>	<p>3 au mois des 5 critères suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hyperglycémie à jeûn : glycémie &gt; 6,1 mmol/l</li> <li>• HTA systolique &gt;130 mmHg et / ou diastolique &gt;85 mmHg</li> <li>• Triglycérides &gt; 1,7 mmol/l (150 mg/dl)</li> <li>• HDL- Cholestérol &lt; 1 mmol/l chez l'homme et &lt;1,3 mmol/l chez la femme</li> </ul>

Treatment of High Blood Cholesterol in Adults 2001)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Obésité centrale : tour de taille &gt; 102 cm chez l'homme et &gt; 88 cm chez les femmes</li> </ul>
<b>Fédération Internationale du Diabète</b> (Alberti et al. 2005)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Obésité abdominale (Tour de taille selon origine ethnique et sexe) Avec au moins 2 des 4 critères suivants :</li> <li>• Pression artérielle systolique &gt;130 mmHg et diastolique &gt; 85mmHg ou traitement antihypertenseur</li> <li>• HDL-Cholestérol &lt; 1,03mmol/l pour les hommes et &lt;1,29mmol/l pour les femmes ou traitement</li> <li>• Triglycérides &gt;1,7 mmol/l ou traitement</li> <li>• Glycémie à jeûn &gt;100mg/dl</li> </ul>

---

HDL-C= High Density Lipoprotein-Cholesterol

### 3. Prévalence

La prévalence mondiale du syndrome métabolique diffère selon les pays et augmente en général tant dans les pays industrialisés que dans les pays en voie de développement (Saklayen 2018). La diversité des définitions attribuées au syndrome métabolique a fait que l'estimation de sa prévalence réelle soit difficile à préciser. D'après les données de l'enquête américaine (National Health and nutrition Examination Survey, NHANES), plus d'un adulte sur trois est atteint du syndrome métabolique et environ 40% des adultes âgés de 40 ans et plus sont touchés par le syndrome métabolique (Sherling, et al. 2017).

La prévalence du syndrome métabolique dans les pays européens est estimée à plus de 24% et semble augmenter avec l'âge (de 3,7% chez les sujets âgés de 20 à 29 ans à plus de 30% chez les sujets âgés de 70 ans et plus). Elle varie aussi avec le sexe. Selon une récente étude réalisée sur 12 cohortes de 10 pays européens, la prévalence du syndrome métabolique était plus élevée chez les femmes que chez les hommes (Scuteri et al. 2015).

En France, la prévalence du syndrome métabolique varie de 10 à 20%. L'hypertension artérielle représente le principal contributeur du syndrome métabolique. Elle touche environ 70 % des hommes et 47% des femmes (Balkau et al. 2003).

### 4. Physiopathologie du syndrome métabolique

Actuellement, il n'existe aucun argument décisif en faveur d'une cause unique responsable de l'ensemble des anomalies observées dans le syndrome métabolique. De nombreuses zones

d'ombre persistent dans la compréhension des mécanismes impliqués. L'obésité abdominale et l'insulinorésistance constituent deux éléments majeurs et jouent un rôle causal dans la genèse et le maintien des anomalies associées au syndrome métabolique. Dernièrement, le tissu adipeux viscéral semble être l'hypothèse la plus retenue puisqu'il apparaît selon plusieurs études comme un facteur clé qui précède l'apparition des autres composants du syndrome métabolique (Maison et al. 2001 ; Palaniappan et al. 2004 ; Hillier et al. 2006).

#### 4.1 Obésité abdominale et inflammation

Dans l'organisme, on distingue deux catégories différentes de tissu adipeux : le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun. Le tissu adipeux blanc est constitué de plusieurs types cellulaires dont les adipocytes représentent une grande partie. Son principal rôle est d'assurer le stockage et la mobilisation de l'énergie. Le tissu adipeux brun est présent chez tous les mammifères et joue un rôle essentiel dans la thermogenèse. Ce rôle est assuré grâce au grand nombre de mitochondries présentes dans le cytoplasme de ses adipocytes et qui permettent de libérer l'énergie sous forme de chaleur.

Il est possible de distinguer différentes obésités en fonction de la localisation anatomique du tissu adipeux. L'obésité abdominale se définit comme une accumulation excessive de masse graisseuse entourant les viscères à l'intérieur de la cavité abdominale. A ce niveau, le tissu adipeux est majoritairement blanc (Carobbio et al. 2017). Ce dernier a été considéré pendant longtemps comme un organe de stockage d'énergie. Actuellement, il est clairement établi que le tissu adipeux est aussi un organe endocrine. Son expansion induit une libération importante d'acides gras libres (AGL) mais aussi une sécrétion accrue d'adipokines. Ces molécules sont soit impliquées localement ou de manière endocrine dans un grand nombre de processus physiologiques dont l'inflammation et la régulation de la balance énergétique. La liste des adipokines regroupe les cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 6 (IL-6) et le « Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  » TNF  $\alpha$ , la leptine et la résistine notamment (Wassink et al. 2007; Trayhurn and Wood 2004 ; Gutierrez et al. 2009)

- ❖ Le TNF  $\alpha$  stimule la lipolyse en favorisant la résistance à l'insuline des adipocytes et l'hyperinsulinémie. Il augmente l'expression d'autres médiateurs inflammatoires comme l'IL-6, la résistine et la leptine tout en diminuant celle de l'adiponectine contribuant ainsi au développement du syndrome métabolique et au maintien des anomalies qui lui sont associées (Hutley and Prins 2005).

- ❖ La leptine appelée aussi « hormone de la satiété » est une hormone produite et sécrétée dans la circulation sanguine par les adipocytes. Elle agit sur la régulation centrale de la balance énergétique en diminuant la prise alimentaire et en augmentant la consommation énergétique. En plus de ses effets au niveau central, la leptine agit également au niveau périphérique en diminuant la sécrétion de l'insuline et en stimulant la néoglucogenèse hépatique. Son élévation est constatée dans de nombreuses affections inflammatoires dont l'obésité (Correia and Rahmouni 2006).
- ❖ La résistine est une adipokine dont les taux plasmatiques sont corrélés à l'indice de masse corporelle. Elle induit une résistance à l'insuline en altérant la signalisation passant par le récepteur à l'insuline réduisant ainsi l'entrée du glucose dans la cellule. Elle favorise l'expression des molécules d'adhésion de cellules endothéliales et augmente la production de cytokines inflammatoires (Steppan and Lazar 2002).
- ❖ L'adiponectine augmente la sensibilité de l'organisme à l'insuline, diminue les concentrations plasmatiques en acides gras et en triglycérides ainsi que la production hépatique de glucose. Elle possède des propriétés anti-inflammatoires et anti-athérogéniques via ses effets sur d'autres cytokines comme le TNF $\alpha$ . Contrairement aux autres adipokines, la sécrétion d'adiponectine est diminuée au cours de l'obésité (Kadowaki et al. 2006).

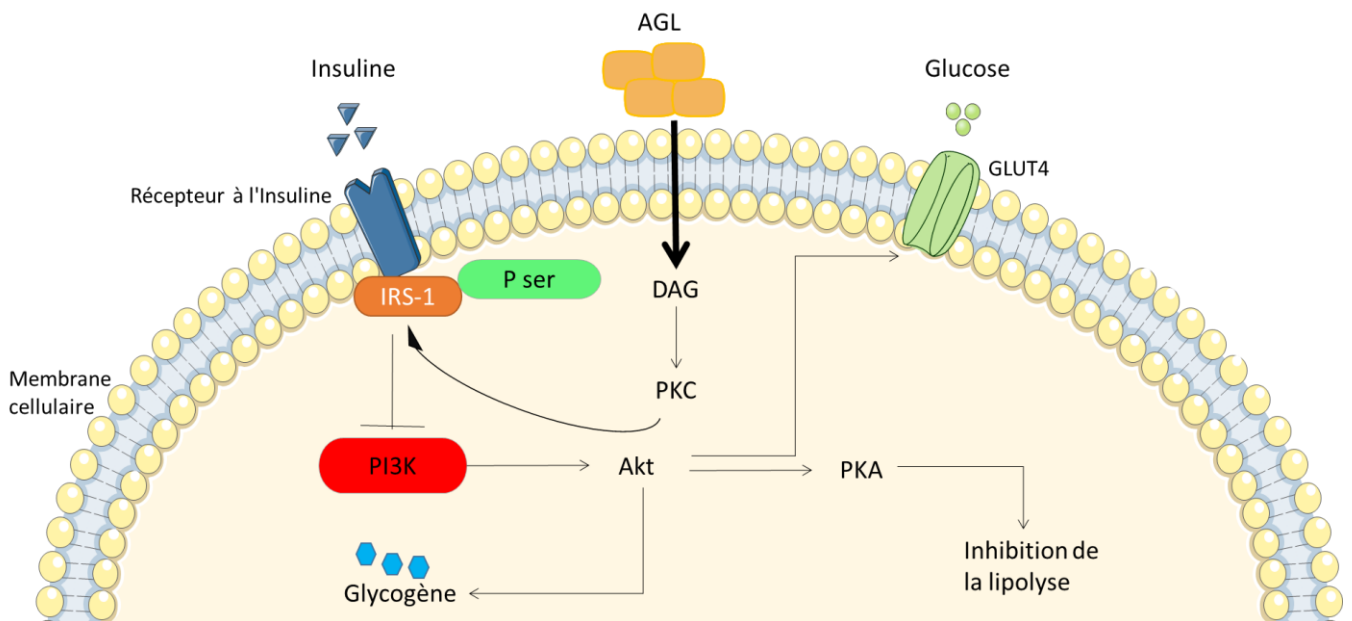
La libération accrue des AGL et des cytokines pro-inflammatoires par le tissu adipeux hypertrophié contribue à divers troubles du métabolisme glucidique comme la résistance à l'insuline.

#### 4.2 Résistance à l'insuline

L'insuline est une hormone protéique sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas. Sa sécrétion est principalement contrôlée par la concentration en glucose plasmatique. Elle a un effet important sur le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines. Sa fonction principale est le contrôle de la capture et l'utilisation du glucose par les tissus périphériques par l'intermédiaire de transporteurs passifs de glucose (GLUT) (Zhao and Keating 2007).

L'insulinorésistance est un état qui se caractérise par une baisse de la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline, principalement au niveau du muscle strié squelettique, du foie et du tissu adipeux malgré une sécrétion normale par les cellules  $\beta$ -pancréatiques (Canale et al. 2013). Au niveau biologique, elle se traduit par une hyperinsulinémie basale et/ou une augmentation

de l'Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance (index HOMA-IR). Un des mécanismes majeurs impliqués dans le développement de la résistance à l'insuline est l'abondance des AGL dans la circulation sanguine résultant d'une lipolyse inappropriée. Une hypothèse proposée, suggère que l'excès d'AGL perturbe les mécanismes de transmission du signal insulinique. Selon cette hypothèse, l'augmentation d'AGL dans le muscle conduirait à l'accumulation de certains métabolites, tels que l'acétyl-CoA et le diacylglycérol (DAG). Ces derniers activent la protéine kinase C (PKC), une sérine/thréonine kinase activée qui phosphoryle le substrat majeur du récepteur à l'insuline (IRS) sur des résidus sérine-thréonine. Cette phosphorylation empêche le recrutement et la transmission du signal insulinique vers la voie métabolique phosphatidyl-inositol 3 kinase (PI3K) diminuant ainsi, la capture du glucose (**Figure 10**) (McCracken et al. 2018 ; Boden 2008). Un mécanisme similaire existe dans le foie ce qui conduit à une inhibition de la glycolyse. La résistance à l'insuline induit une inactivation des enzymes clés de la glycolyse avec en contrepartie une activation de la néoglucogenèse ce qui entraîne une augmentation de la production hépatique de glucose (Boden et al. 2002 ; J. K. Kim et al. 2000).



**Figure 10:** Mécanismes d'implication des AGL dans l'altération du signal insulinique

L'excès d'acides gras libres entraîne une altération du signal insulinique. L'accumulation de métabolites dérivés des AGL tels que les DAG, active la PKC, qui en phosphorylant un résidu sérine (SER) au niveau de l'IRS-1, entraîne une diminution de recrutement de la PI3K et une réduction du transport de glucose dans le tissu adipeux. (AGL : Acides gras libres, PKC : protéine kinase C, IRS-1 : insulinerécepteur substrat 1, PI3K : Phosphatidyl inositol 3 kinase,



Akt : protéine kinase, Ser : Sérine, DAG : diacylglycérol, PKA: phosphokinase A, GLUT 4 : transporteur de glucose 4) inspiré et modifié de (McCracken et al. 2018)

Enfin, il semblerait également que l'augmentation intracellulaire des AGL diminue la transcription des gènes codant pour le GLUT 4 et diminue la stabilité de leur acide ribonucléique messenger (ARNm) (Armoni et al. 2005).

#### 4.3 Hypertension artérielle

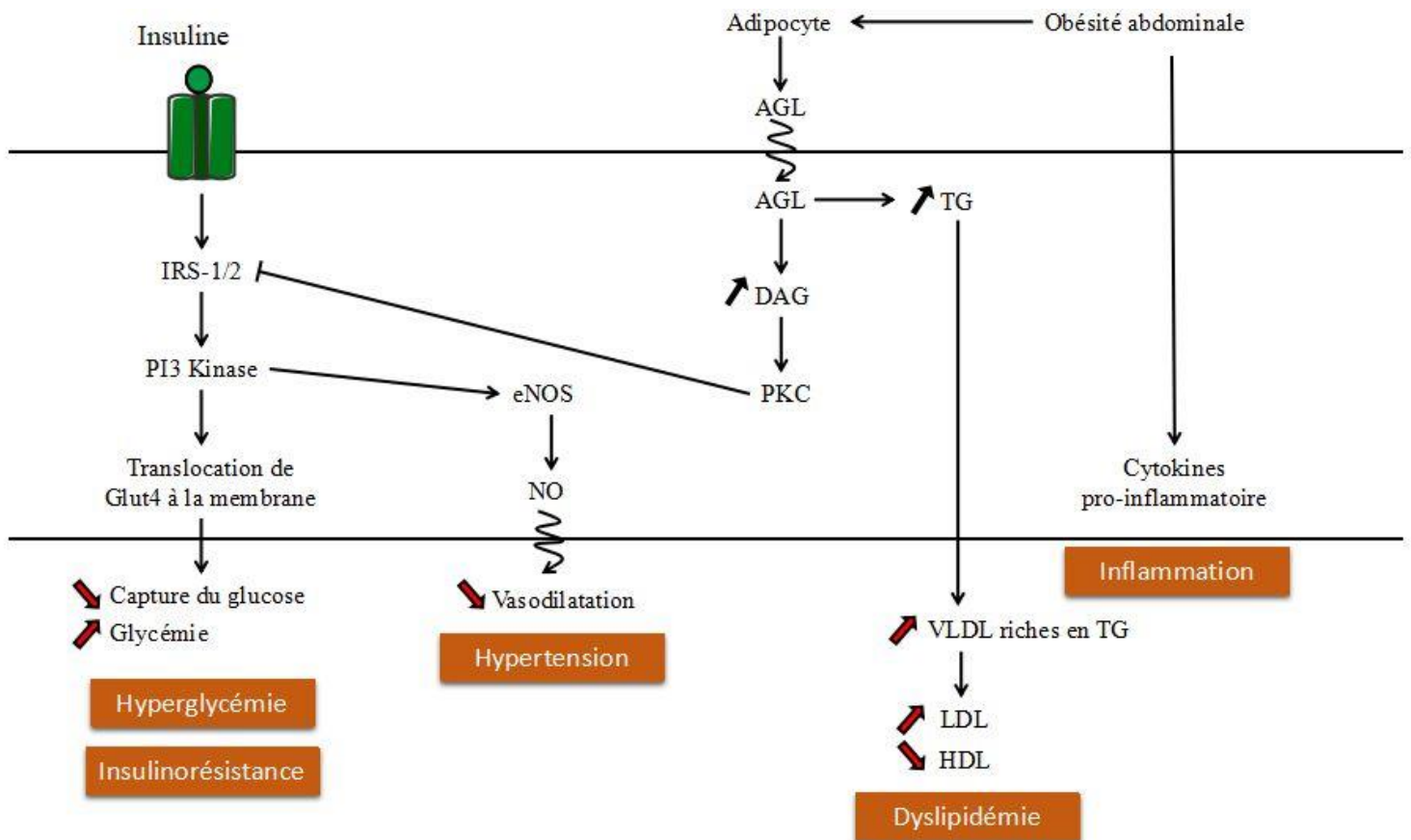
La prévalence de l'hypertension artérielle augmente avec la sévérité de l'obésité. La physiopathologie permettant d'expliquer l'hypertension artérielle associée à l'obésité et au syndrome métabolique est complexe. A ce sujet, plusieurs hypothèses ont été avancées dont l'insulinorésistance et l'hyperinsulinémie qui en résulte. Lors d'une résistance à l'insuline, le pancréas développe une réponse compensatrice en augmentant la sécrétion d'insuline pour éviter l'apparition du diabète. Il a été démontré que l'hyperinsulinémie active le système rénine- angiotensine en augmentant l'expression de l'angiotensinogène, la formation de l'angiotensine II et l'expression du récepteur de l'angiotensine II (AT<sub>1</sub>) ce qui peut contribuer au développement de l'hypertension artérielle (Kaur 2014). Il a été démontré également que l'hyperinsulinémie stimule l'activité du système sympathique, et par conséquent, augmente la rétention sodée et le débit cardiaque. La pression artérielle s'élèverait d'autant plus volontiers que l'insuline ne peut induire son propre effet vasodilatateur par altération de l'activité de la nitric oxide synthase (NOS) endothéliale (Valensi et al. 2006) (**Figure 11**). D'autres mécanismes contribuent au développement de l'hypertension artérielle chez les individus en excès pondéral. C'est le cas de la leptine dont la sécrétion est augmentée au cours de l'obésité. La leptine stimule l'activité sympathique, de plus, ses effets vasodilatateur périphérique et natriurétique sont altérés pendant l'obésité (Villarreal et al. 1998).

#### 4.4 Les dyslipidémies

La dyslipidémie associée à l'obésité abdominale se caractérise par des anomalies quantitatives et qualitatives des lipoprotéines riches en triglycérides (TG), des lipoprotéines de basse densité (LDL) et des lipoprotéines de haute densité (HDL).

Dans des conditions d'insulinorésistance, l'excès d'activité lipolytique dans le tissu adipeux viscéral augmente le flux des AGL directement drainé par voie portale. Le flux accru des AGL allant du tissu adipeux vers le foie augmente la synthèse hépatique de TG. Il en résulte des anomalies dans le métabolisme des lipoprotéines. On constate alors une élévation de la production des VLDL (very low density lipoprotein) riches en TG et IDL (intermediate density

lipoprotein), précurseurs de la formation des LDL petites et denses ainsi qu'une diminution des HDL (Chan et al. 2004). Les particules de LDL de petite taille sont plus sensibles à l'oxydation et sont considérées comme particulièrement athérogènes (Zambon et al. 1999) (**Figure 11**).



**Figure 11:** Schéma récapitulant la physiopathologie du syndrome métabolique

AGL : acides gras libres, DAG : diacylglycérol, NO : monoxyde d'azote, TG : triglycérides, eNOS : endothéliale nitric oxide synthase, PI3 Kinase : phosphatidyl inositol3 kinase, PKC : phosphokinase C, GLUT4 : glucose transporter type -4, IRS-1/2 : Insulin receptor substrate-1/2, VLDL : Very low density lipoprotein, LDL : low density lipoprotein, HDL : high density lipoprotein. Inspiré et modifié à partir de Boden 2008.

### III. Syndrome métabolique et complications cardiovasculaires

De plus en plus d'études montrent que le syndrome métabolique est fortement associé à une augmentation des risques de développer des maladies cardiovasculaires (Gierach et al. 2016). Le risque d'apparition d'événements cardiovasculaires est d'autant plus élevé si l'ensemble des composants du syndrome métabolique sont réunis chez le même individu. En effet une étude montre qu'une personne présentant 4 ou 5 composantes du syndrome métabolique a 4 fois plus de risque de développer une maladie coronarienne et 24 fois plus de risque de développer un diabète de type 2 qu'une personne saine (Sattar et al. 2003).

#### 1. Hyperactivité du système nerveux sympathique

##### 1.1 Hyperactivité du système nerveux sympathique et hypertension artérielle

L'hypertension artérielle constitue une préoccupation majeure à cause de sa morbidité démontrée par de nombreuses études. La contribution du système nerveux sympathique dans le développement, le maintien et la progression de l'hypertension artérielle n'est plus à prouver (Grassi et al. 2015). En effet, l'hyperactivité sympathique est depuis de nombreuses années largement incriminée dans l'hypertension artérielle essentielle.

La régulation autonome de la pression artérielle par voie réflexe fait intervenir les barorécepteurs et les chémorécepteurs situés au niveau périphérique. Les barorécepteurs situés au niveau du sinus carotidien (reliés au système nerveux par le nerf de Héring) et de la crosse de l'aorte (reliés au système nerveux par le nerf de Cyon) sont très sensibles aux variations de la pression artérielle et permettent selon le cas d'activer ou d'inhiber le système nerveux sympathique (SNS) et le système nerveux parasympathique afin d'amortir toute variation de pression. Les chémorécepteurs sont stimulés par une augmentation de la pression partielle en  $\text{CO}_2$  ( $P_{\text{CO}_2}$ ), ou une diminution du pH ou de la pression partielle en  $\text{O}_2$  ( $P_{\text{O}_2}$ ). Ces chémorécepteurs émettent de ce fait, des influx inhibiteurs pour le centre cardiomodérateur et des influx excitateurs pour le centre vasomoteur, ce qui entraîne une augmentation de la fréquence cardiaque et une vasoconstriction conduisant à une augmentation de la pression artérielle (Benjelloun et al. 2009). Il a été démontré que l'activité du SNS est élevée chez les jeunes rats spontanément hypertendus (SHR) avant l'apparition de l'hypertension (Leosco et al. 2013) et que les barorécepteurs dans cette souche sont moins sensibles aux variations de pression que ceux de rats normotendus (Brown et al. 1976). Chez les SHR, une augmentation de pression artérielle plus importante est nécessaire pour activer la boucle baroréflexe et donc pour inhiber le SNS et activer le système nerveux parasympathique. Cette boucle baroréflexe

se trouve également altérée chez l'homme en cas d'hypertension artérielle mais aussi en cas d'obésité abdominale ou d'insulinorésistance (Thorp and Schlaich 2015). D'autres études ont montré une activité parasympathique cardiaque réduite chez les adultes SHR et qu'une sympathectomie néonatale permettrait de prévenir le développement de l'hypertension chez cette souche (Leosco et al. 2013). De ces observations, l'altération de la boucle baroréflexe en cas de syndrome métabolique pourrait donc être à l'origine d'une hyperactivité sympathique conduisant ainsi au maintien et à la progression de l'hypertension artérielle. Néanmoins, tous les patients avec un syndrome métabolique ne sont pas forcément hypertendus soulignant la complexité des mécanismes impliqués dans la physiopathologie du syndrome métabolique.

En outre, l'hyperactivité sympathique et la réponse vagale inadéquate observées chez les sujets hypertendus n'agissent pas uniquement sur le système cardiovasculaire mais agissent également sur d'autres organes cibles du système nerveux autonome. En effet, la présence d'une activité sympathique de base plus importante, ainsi qu'une augmentation du relargage des catécholamines dans la circulation ont été démontrées dans de nombreux modèles animaux d'hypertension, ainsi que chez les patients avec une hypertension artérielle essentielle en comparaison avec des sujets normotendus (Leosco et al. 2013). Ce phénomène serait modulé par les nerfs afférents et efférents du système sympathique rénal. Toutes les fibres nerveuses vont cheminer depuis le hile rénal au niveau de l'adventice de la paroi de l'artère rénale. L'activité sympathique entre le système nerveux central et le rein est bidirectionnelle. Les influx nerveux efférents, qui proviennent du système nerveux central et aboutissent aux reins, augmentent l'activité du système rénine-angiotensine (relargage de la rénine par les cellules juxtaglomérulaires), les résistances vasculaires (via les effets sur les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques), ainsi que la rétention sodée (Bell-Reuss et al. 1976), tout en diminuant le flux sanguin rénal. L'ampleur de l'hyperactivité sympathique est étroitement liée à la sévérité de l'hypertension. Le pronostic de l'hypertension artérielle dépendrait donc de la réduction de cette hyperactivité sympathique (Benjelloun et al. 2009).

## 1.2 Hyperactivité du système nerveux sympathique et obésité

L'obésité est définie par l'OMS comme une augmentation anormale ou excessive de la masse grasse totale et plus particulièrement une augmentation de la taille des adipocytes. Elle résulte de l'interaction de facteurs génétiques et environnementaux particulièrement complexes. Communément, l'accumulation de ce tissu gras est la conséquence d'une réduction notable du niveau général d'activité physique, et souvent d'un excès d'aliments riches en calories. Comme le SNS constitue un élément clé dans la régulation de la balance énergétique, du système

cardiovasculaire et de la sécrétion d'insuline, il a été rapidement suggéré qu'un dysfonctionnement de celui-ci pourrait être en lien avec la pathogenèse de l'obésité. Cependant les études ayant évalué l'activation du système sympathique dans l'obésité sont controversées. A ce sujet, deux grandes hypothèses ont été émises. La première suggère qu'une diminution de l'activité du SNS chez les rongeurs, était associée au développement de l'obésité par inhibition de la thermogénèse (Bray 1991). Contrairement à ces observations, d'autres études ont montré que la suralimentation avait tendance à stimuler l'activité du SNS chez les rongeurs et qu'à l'inverse, le jeûne avait tendance à la supprimer. Des effets similaires ont aussi été rapportés chez l'homme (Landsberg 2006). Selon Landsberg, l'accroissement de l'activité sympathique s'explique par l'augmentation des taux d'insuline circulante souvent associée à l'obésité. Cette hyperactivité du SNS serait donc une réponse physiologique pour stimuler la thermogénèse de façon à maintenir un poids constant (Landsberg 2001). Toutefois, il est intéressant de noter que l'activité sympathique de sujets présentant une obésité abdominale est plus importante que celle de sujets présentant une obésité périphérique soulignant l'importance de la localisation anatomique du tissu adipeux (Grassi et al. 2004).

Un autre mécanisme a été proposé pour expliquer le lien entre l'hyperactivation du SNS et l'obésité. Il s'agit de l'augmentation des concentrations plasmatiques de la leptine. L'augmentation de la sécrétion de la leptine par le tissu adipeux abdominal est positivement corrélée au risque de développer un syndrome métabolique (Galletti et al. 2007). En conditions normales, la leptine provoque une sensation de satiété et active la thermogénèse de façon à prévenir le gain de poids (Canale et al. 2013). Cependant plusieurs études ont montré que la leptine est aussi un important activateur du SNS chez les rongeurs. En effet, il a été démontré que des perfusions de leptine activent les fibres sympathiques dans le muscle squelettique, le tissu adipeux brun et le rein induisant une augmentation de la pression artérielle (Lafontan 2014) et que l'injection intracérébrale de leptine augmente considérablement l'activité du SNS (Haynes 2000). L'augmentation de la sécrétion de la leptine chez les personnes obèses entraîne une hyperleptinémie (Eikelis and Esler 2005). Cette hyperleptinémie chronique conduit à une résistance de ses récepteurs centraux inhibant ainsi les mécanismes de satiété et de thermogénèse.

L'ensemble de ces données permet d'établir clairement un lien entre l'obésité et l'hyperactivité sympathique. Cependant, la relation de causalité entre l'hyperactivité sympathique et l'obésité n'est pas bien élucidée jusqu'à présent.

### 1.3 Hyperactivité du système nerveux sympathique et insulino-résistance

Comme la présence d'une insulino-résistance est en règle générale fortement associée à l'obésité abdominale et à la plupart des anomalies du syndrome métabolique, il est donc difficile d'étudier l'activité sympathique chez des sujets insulino-résistants indépendamment des autres troubles. Des études ont montré qu'une augmentation des taux d'insuline circulante induisait un accroissement de l'activité sympathique chez les rongeurs. Cette observation a permis d'émettre l'hypothèse que l'hyperinsulinémie souvent associée à l'obésité débouche sur une activation du SNS (Landsberg 2001). De manière similaire, d'autres travaux ont confirmé que l'administration d'insuline en intra-cérébroventriculaire chez le rat accroît également l'activité nerveuse sympathique de façon non uniforme dans l'organisme (Muntzel et al. 1994 ; Rahmouni et al. 2004). L'action centrale de l'insuline se fait par fixation sur ses récepteurs localisés dans le noyau arqué hypothalamique. La liaison de l'insuline à ses récepteurs hypothalamiques lui permet d'accroître l'activité des nerfs sympathiques lombaires et de promouvoir un gain du contrôle sympathique du baroréflexe (Cassaglia et al. 2011). Toutes ces données suggèrent que l'hyperinsulinémie pourrait donc contribuer, du moins pendant sa phase d'installation à l'hyperactivité sympathique décrite chez l'obèse.

Par ailleurs, on retrouve une forte activité inflammatoire en cas d'obésité abdominale avec une sécrétion accrue de facteurs pro-inflammatoires par l'adipocyte comme IL6, le  $TNF\alpha$ , la leptine ou encore la C reactive protein (CRP) (Gutierrez et al. 2009). Il a été décrit que l'ensemble de ces facteurs conduisent à une hyperactivation sympathique (Lafontan 2014).

### 1.4 Hyperactivation du système nerveux sympathique et dyslipidémies

Le tissu adipeux viscéral est un tissu métaboliquement très actif avec hydrolyse continue des TG contenus dans les adipocytes et une libération excessive d'AGL. Les AGL semblent également interagir avec le SNS. En effet, il a été démontré que les AGL sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique (Qi et al. 2002) et d'aller stimuler l'hypothalamus induisant ainsi une augmentation de l'activité sympathique (Florian and Pawelczyk 2009) aussi bien chez des sujets obèses et hypertendus que chez les sujets sains (Gadegbeku et al. 2002). De plus, une étude a aussi montré qu'une injection aiguë de lipides sous forme d'AGL chez des sujets obèses normotendus présentant un diabète de type 2, augmente la pression artérielle et l'activité du SNS et altère la fonction endothéliale (Umpierrez et al. 2009).

## 2. Dysfonctions cardiaques

Les complications de la fonction cardiaque associées à l'obésité sont qualifiées de « cardiomyopathie de l'obésité ». Deux mécanismes physiopathologiques semblent être impliqués dans les effets délétères du syndrome métabolique sur la fonction ventriculaire gauche : l'augmentation de la précharge ventriculaire secondaire à la majoration du volume plasmatique induite par l'augmentation de la masse grasse et l'augmentation de la postcharge ventriculaire gauche due à l'association fréquente d'une hypertension artérielle à l'obésité, induite par l'activation du système nerveux sympathique (Galinier et al. 2005). En effet, l'obésité entraîne une élévation du débit cardiaque afin de répondre à une demande métabolique accrue due à l'augmentation de la masse grasse. Le volume plasmatique élevé entraîne une surcharge volumétrique conduisant à une augmentation de la précharge. Afin de s'adapter à cette augmentation chronique de la précharge, une hypertrophie ventriculaire gauche excentrique s'installe progressivement. Elle se caractérise par un allongement des cardiomyocytes et par une augmentation du diamètre de la chambre ventriculaire gauche. Des études plus récentes ont montré que les sujets présentant un syndrome métabolique développent une hypertrophie ventriculaire gauche concentrique suite à une augmentation chronique de la postcharge (Tune et al. 2017). Elle se caractérise par une augmentation de la pression intraventriculaire au cours de la systole entraînant une augmentation de l'épaisseur de la paroi cardiaque et une diminution de la taille de la lumière. Qu'elle soit excentrique ou concentrique, l'hypertrophie ventriculaire s'accompagne d'une perte progressive de la contractilité du cœur pouvant évoluer en insuffisance cardiaque.

En effet, ces mécanismes d'adaptation initialement bénéfiques, permettent de normaliser la pression exercée sur la paroi du myocarde et d'améliorer la capacité d'éjection du cœur. Ils ont cependant, des effets néfastes à long terme conduisant à un remodelage tissulaire (Grossman et al. 1974).

L'hypertrophie cardiaque inadaptée ne permettant pas de normaliser les contraintes pariétales peut progresser en insuffisance cardiaque qui se définit comme l'incapacité du cœur à assurer un débit sanguin adéquat au besoin de l'organisme tant à l'effort qu'au repos dans des conditions de pression et de remplissage ventriculaires normales (McMurray et al. 2012). C'est la conséquence ultime des différentes agressions pouvant affecter la fonction cardiaque.

Lors du syndrome métabolique, deux types d'insuffisance cardiaque peuvent être rencontrés (Galinier et al. 2005) :

- L'insuffisance cardiaque diastolique qui se caractérise par une altération de la relaxation et de la compliance diastolique du ventricule gauche avec une fonction systolique d'éjection conservée (débit sanguin éjecté par chaque ventricule).
- L'insuffisance cardiaque systolique survient plus tardivement quand l'hypertrophie n'est pas suffisamment importante pour lutter contre l'augmentation chronique de la précharge et de la postcharge.

L'un des mécanismes majeurs impliqués dans les dysfonctions cardiaques associées au syndrome métabolique est l'altération de la réponse  $\beta$ -adrénergique cardiaque

### 2.1 Altération des récepteurs $\beta$ -adrénergiques

Il a été démontré que la réponse à la stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques était altérée dans des modèles animaux de syndrome métabolique ce qui laisse supposer qu'une dysfonction  $\beta$ -adrénergique liée au syndrome métabolique pourrait en être une des causes.

La stimulation excessive et prolongée des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques induit un arrêt ou une atténuation de la transmission de leur propre signal afin d'éviter les effets délétères que cela entraîne sur la fonction cardiaque. Le contrôle direct de l'activation des récepteurs est la conséquence d'une modification covalente par phosphorylation. Une fois phosphorylés, les récepteurs sont désensibilisés, séquestrés et internalisés pour être dégradés ou recyclés vers la membrane (Jaber and Giros 2012). On distingue deux mécanismes de désensibilisation : la désensibilisation homologue et la désensibilisation hétérologue.

La désensibilisation homologue d'un récepteur couplé à une protéine G n'intervient qu'après fixation d'un ligand sur ce récepteur et sa phosphorylation par une kinase de la famille des « G-protein-coupled receptor kinase » (GRK). La famille des GRK contient six membres dont la plus décrite est la  $\beta$ -adrenergic receptor kinase-type 1 ( $\beta$  ARK-1). Son expression a été montrée comme augmentée lors d'une stimulation chronique des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (Ho et al. 2010).

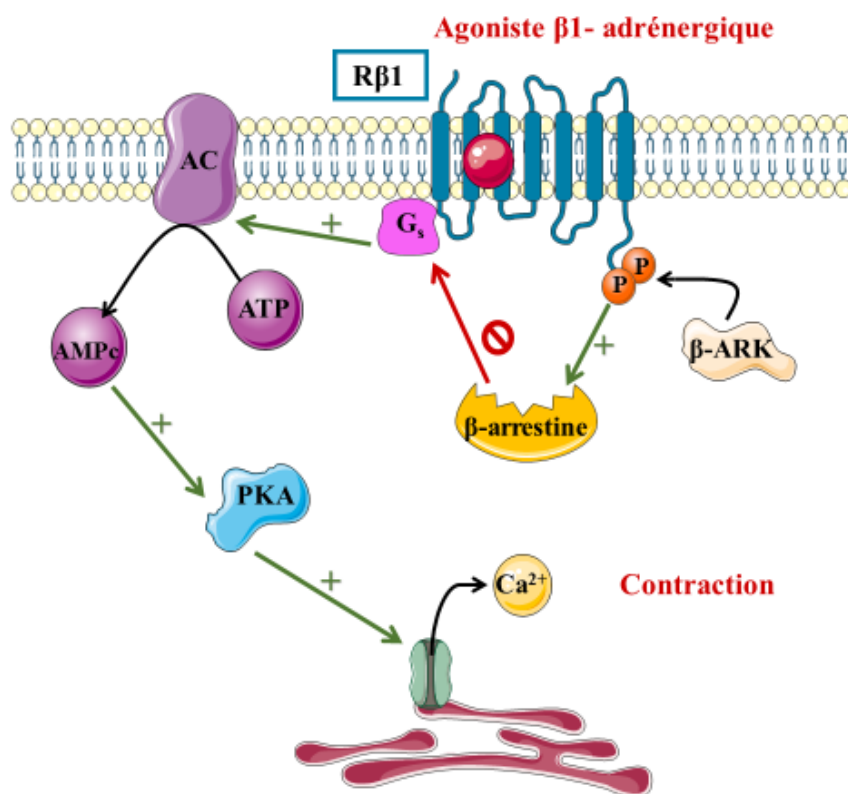
Lorsque le récepteur  $\beta$ -adrénergique est activé par son ligand, la  $\beta$  ARK-1 peut alors le phosphoryler au niveau de la 3<sup>ème</sup> boucle cytoplasmique intracellulaire et du domaine C-terminal (Walther and Ferguson 2013). Cette phosphorylation permet le recrutement d'une protéine cytosolique à la membrane, la  $\beta$ -arrestine. La liaison de la  $\beta$ -arrestine au récepteur



diminue son affinité pour la protéine G et par conséquent, produit un découplage fonctionnel entre le récepteur et la protéine G, l'internalisation du récepteur et sa digestion (Patel et al. 2008; Violin et al. 2014) (**Figure 12**). Ceci conduit à la réduction du nombre des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques à la surface membranaire. La désensibilisation homologue constitue le moyen le plus rapide pour régler l'activité des récepteurs couplés aux protéines G.

Contrairement à la désensibilisation homologue, la désensibilisation hétérologue ne nécessite pas la fixation d'un agoniste au récepteur  $\beta$ -adrénergique (Freedman and Lefkowitz 1996). Elle est effectuée par la phosphorylation du récepteur au niveau de la partie C-terminale des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques par la PKA.

L'ensemble de ces phénomènes aboutit à une réduction de la réponse observée lors de l'administration d'un agoniste  $\beta$ -adrénergique. Ce phénomène est particulièrement marqué pour les récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques. Il l'est beaucoup moins pour les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques (Brodde 1991).



**Figure 12:** Désensibilisation homologue des récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques cardiaques

Le ligand se fixe et active le récepteur. Ce dernier est alors phosphorylé par la kinase des récepteurs couplés aux protéines G ( $\beta$  ARK). Cette phosphorylation permet le recrutement de

la  $\beta$ -arrestine. Le récepteur est alors internalisé et sera soit dégradé soit recyclé à la membrane cellulaire. D'après (Patel, et al. 2008; Violin et al. 2014).  $\beta$  ARK : kinase des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, P : phosphate

## 2.2 Altération de la signalisation $\beta$ -adrénergique

Plusieurs études ont montré une réduction de la réponse inotrope positive après stimulation  $\beta$ -adrénergique lors du syndrome métabolique. En plus des mécanismes de désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et/ ou de diminution de leur expression (Jiang et al. 2015), d'autres mécanismes ont également été évoqués pour expliquer la dysfonction  $\beta$ -adrénergique cardiaque chez les sujets présentant un syndrome métabolique. En effet, il a été démontré que la diminution de la réponse inotrope positive était due non pas à une diminution du nombre des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques mais à une altération de la signalisation  $\beta$ -adrénergique sous-jacente. Cette hypothèse est renforcée par une étude indépendante qui montre que la réponse inotrope à la forskoline (un activateur direct de l'adénylate cyclase) ou à un analogue de l'AMPc est diminuée chez les personnes obèses (Tamada et al. 1998).

Selon d'autres études, la dysfonction cardiaque observée chez les personnes obèses est liée à une altération dans le transport du calcium intracellulaire. Cette altération serait attribuée à une diminution de l'activation de la SERCA via la  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline kinase. Il en résulte une déplétion du stock en calcium dans le réticulum sarcoplasmique et par conséquent, une diminution de la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  par les récepteurs à la ryanodine. Ces études n'excluent pas non plus l'hypothèse que l'obésité soit aussi à l'origine d'une augmentation de l'affinité du calcium pour la troponine C (Lima-Leopoldo et al. 2011).

## 3. Dysfonctions vasculaires

### 3.1 Hyporéactivité vasculaire

Parmi les dysfonctions vasculaires observées au cours du syndrome métabolique, nous retrouvons la diminution de la fonction contractile des CML vasculaires. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer ce phénomène parmi lesquels : l'augmentation de l'activation de la iNOS et la désensibilisation/ ou la diminution de l'expression des récepteurs  $\alpha$ 1-adrénergiques vasculaires.

Le NO joue un rôle important dans la dysfonction vasculaire associée au syndrome métabolique. En effet l'augmentation de la synthèse du NO au niveau des CML et des cellules endothéliales contribue en grande partie à la baisse de la réactivité des CML aux agents

vasoconstricteurs. A ce sujet, des études ont montré que la production exagérée de NO au cours du syndrome métabolique pourrait être la conséquence d'une augmentation de l'expression de la iNOS. Cette enzyme peut être stimulée à la fois au niveau de l'endothélium et dans les CML par les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF  $\alpha$  et les endotoxines. La production pathologique de NO par la iNOS serait à l'origine de la résistance vasculaire aux agents vasoconstricteurs semblable à la situation caractéristique du choc septique (Mollace et al. 2005). L'augmentation de la synthèse du NO au cours du syndrome métabolique serait donc lié à un mécanisme d'adaptation de l'organisme afin de préserver un flux sanguin approprié et de maintenir l'homéostasie vasculaire (Vendrame et al. 2014). Cependant, selon d'autres études, l'hyporéactivité vasculaire observée dans le syndrome métabolique serait probablement associée à une activité accrue du système nerveux sympathique. L'hyporéactivité vasculaire est ainsi perçue comme un mécanisme de compensation pour neutraliser l'hypertension artérielle (Battault et al. 2018). Toutefois, les mécanismes sous-jacents ne sont pas clairement établis et restent à élucider. Il a été démontré que la leptine, une adipokine connue pour augmenter le tonus sympathique, induit une contraction vasculaire plus faible à l'épinéphrine. Cette réponse est associée à une expression plus faible du gène  $\alpha_{1D}$ -adrénergique (Belin de Chantemèle et al. 2009). Les mêmes observations ont aussi été décrites chez des souris obèses (Belin de Chantemèle et al. 2011).

### 3.2 Dysfonction endothéliale

Le terme de dysfonction endothéliale regroupe un ensemble d'altérations des fonctions régulatrices de l'endothélium qui affecte l'homéostasie vasculaire et entraîne l'apparition de certaines pathologies. Elle peut se manifester soit par un déséquilibre entre les agents vasodilatateurs et vasoconstricteurs, un déséquilibre entre la fonction antithrombogène et procoagulante, une altération de la biosynthèse et de la libération de facteurs anti-inflammatoires ou encore comme une anomalie de la perméabilité (Avogaro and de Kreutzenberg 2005). Elle est souvent associée aux principaux facteurs de risque cardiovasculaires tels que l'hypercholestérolémie, le diabète, l'hypertension artérielle, l'insulinorésistance et les maladies coronariennes (Taddei et al. 2003 ; Vanhoutte et al. 2017). Toutefois, dans plusieurs études, la dysfonction endothéliale est réduite aux fonctions vasomotrices. Elle se définit ainsi par une diminution de la biodisponibilité du NO endothélial dont l'une de ses principales manifestations est l'altération fonctionnelle de la vasorelaxation dépendante de l'endothélium dans différents territoires vasculaires (Taddei et al. 2003 ; Bahia et al. 2006). Il est largement reconnu que le NO produit exclusivement par les NOS joue un rôle

majeur dans le développement des altérations cardiovasculaires. En effet, il a été démontré dans des modèles animaux d'hypertension artérielle que la relaxation endothélium dépendante induite par l'acétylcholine était altérée dans les vaisseaux de conductance, comme dans les vaisseaux de résistance (Priviero et al. 2009).

### 3.2.1 Mécanismes biologiques impliqués

La réduction de la biodisponibilité en NO est théoriquement la conséquence soit d'un défaut de sa production, soit d'une augmentation de sa capture et de sa dégradation (Williams et al. 2002).

#### 3.2.1.1 Diminution de la production / activité du NO

Plusieurs mécanismes semblent être impliqués dans la diminution de la production du NO ou de son activité (Pellegrin et al. 2009 ; Braam and Verhaar 2007) :

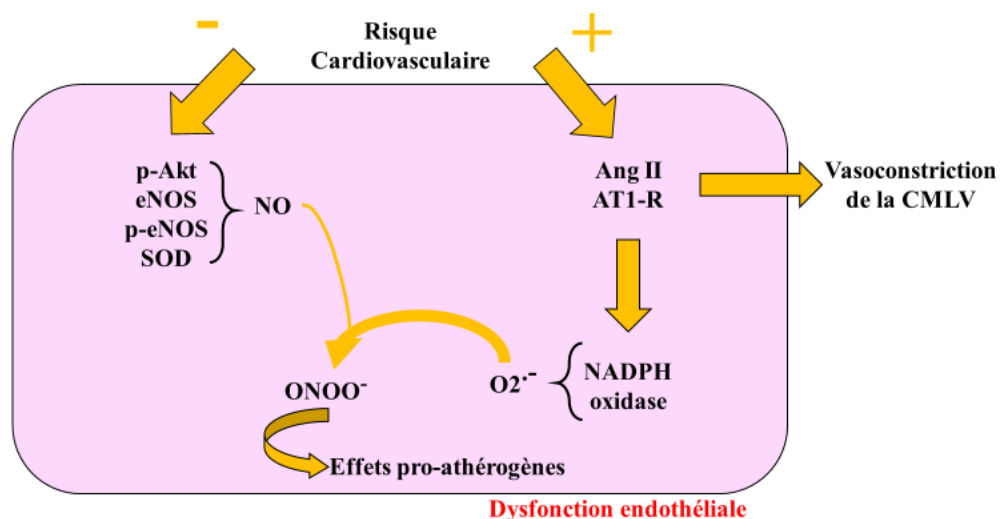
- La réduction de l'expression /et ou de l'activité de la eNOS entraîne une baisse de la production du NO et donc un déséquilibre en faveur des facteurs vasoconstricteurs, ce qui entraîne une dysfonction endothéliale et favorise la vasoconstriction.
- Le découplage de la eNOS en l'absence de l'un de ses substrats (ex : L-arginine) ou de l'un des cofacteurs essentiels à sa production.
- L'altération des voies de signalisation initiées par le NO consécutive à l'altération des mécanismes effecteurs.

La diminution de la production du NO peut être aussi la conséquence d'une modification fonctionnelle de l'endothélium (altération des récepteurs endothéliaux...) ou la conséquence d'une modification structurale du vaisseau qui vont modifier les fonctions régulatrices de l'endothélium (Widlansky et al. 2003). D'autre part, la dégradation accrue du NO joue également un rôle majeur dans le développement de la dysfonction endothéliale. Elle est souvent causée par un stress oxydant consécutif à une production excessive de radicaux libres (Senoner and Dichtl 2019).

#### 3.2.1.2 Le stress oxydant : mécanisme clé dans la dysfonction endothéliale

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre entre les facteurs pro-oxydants et anti-oxydants en faveur des facteurs pro-oxydants entraînant des dommages cellulaires (Atamer et al. 2008). Il apparaît lorsque les radicaux libres sont produits en grande quantités dépassant les capacités d'élimination du système de défense anti- oxydante.

En conditions physiologiques, les radicaux libres sont produits en faibles quantités et ne présentent pas d'effets délétères sur les cellules car ils sont constamment éliminés par les mécanismes de défense enzymatique qui font intervenir notamment la vitamine C et la superoxyde dismutase (SOD) (Pellegrin et al. 2009). Les radicaux libres impliquant un ou plusieurs atomes d'oxygène se nomment les espèces réactives à l'oxygène (ERO). Elles sont produites essentiellement au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cependant, plusieurs enzymes ont été identifiées comme productrices de ERO au niveau vasculaire. La NADPH oxydase et la xanthine oxydase en représentent les deux principales sources (Incalza et al. 2018 ; Pierce et al. 2009). Il existe en conditions physiologiques, un équilibre permanent entre la génération des ERO pro-oxydants et leur dégradation par les enzymes anti- oxydantes (les superoxydes dismutases) afin de protéger les cellules du stress oxydant. Cependant, en condition pathologique et notamment en présence de facteurs de risques cardiovasculaires, l'équilibre entre les facteurs pro-oxydants et antioxydants est rompu. Ce déséquilibre se caractérise par une augmentation de la production des ERO et une libération accrue de l'anion superoxyde. Ce dernier va alors pénétrer dans le cytosol pour se combiner au NO et former l'anion peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) (**Figure 13**) (Griendling and FitzGerald 2003). En favorisant l'oxydation des LDL-cholestérol, l'anion peroxynitrite est considéré comme un des éléments majeurs de l'initiation des complications cardiovasculaires (Williams et al. 2002).



**Figure 13:** Altération moléculaire dans la cellule endothéliale en présence d'un facteur de risque cardiovasculaire. D'après Pellegrin et al. (2009).

L'anion peroxy-nitrite peut aussi contribuer à la dysfonction endothéliale en dégradant le BH<sub>4</sub> favorisant ainsi le découplage de la eNOS (Incalza et al. 2018).

### 3.3 Dysfonction endothéliale et syndrome métabolique

#### 3.3.1 Dysfonction endothéliale et hypertension artérielle

Dans l'hypertension artérielle, l'endothélium perd ses capacités à libérer l'EDHF entraînant une vasoconstriction (Konukoglu and Uzun 2017). De plus, il a été démontré que l'hypertension artérielle s'accompagne de modifications structurelles des artères. Il existe deux types de modifications structurelles dans les vaisseaux de la microcirculation : la raréfaction de la microcirculation et le remodelage artériolaire. C'est le remodelage artériolaire interne qui est responsable de la majorité des élévations chroniques de la résistance vasculaire systémique observée dans l'hypertension artérielle (Jacobsen et al. 2011). Ces modifications structurelles entraînent une dysfonction endothéliale en altérant les capacités vasodilatatrices de l'endothélium.

Par ailleurs, il est largement documenté que le stress oxydant joue un rôle central dans la physiopathologie de l'hypertension artérielle et au développement de la dysfonction endothéliale. A cet égard, plusieurs études ont montré une augmentation de l'expression et de l'activation des NADPH oxydases productrices des ERO et spécifiquement des anions superoxydes au niveau des cellules endothéliales et le long de la paroi vasculaire dans des modèles animaux d'hypertension artérielle (Alvarez et al. 2008 ; Saha et al. 2008). Il a aussi été rapporté que les niveaux du BH<sub>4</sub>, cofacteur essentiel à la production de l'eNOS étaient diminués chez les SHR pré-hypertendus (Miloradović et al. 2008). De plus, des études ont montré un découplage de la eNOS dans les vaisseaux des SHR qui semblerait être lié à l'augmentation de l'oxydation du BH<sub>4</sub> par l'anion peroxy-nitrite (Incalza et al. 2018).

Dans les conditions physiologiques, les radicaux libres sont éliminés par les mécanismes de défense enzymatique dont la SOD. Des études ont montré une diminution de l'expression de la SOD dans les artères de SHR (Priviero et al. 2009). Cette réduction contribue à maintenir l'altération de la relaxation vasculaire dépendante de l'endothélium.

#### 3.3.2 Dysfonction endothéliale et obésité

L'obésité est un état pathologique caractérisé par une inflammation chronique infraclinique et de bas grade. Actuellement, elle est considérée comme un véritable marqueur de risque de la survenue d'accidents cardiovasculaires (Miâdi-Messaoud et al. 2010).

L'obésité contribue au développement de la dysfonction endothéliale par l'augmentation de la production d'adipokines pro-inflammatoires et d'AGL par le tissu adipeux. Des études cliniques et expérimentales réalisées sur des modèles animaux d'obésité génétique et induite par un régime alimentaire riche en matière grasse ou en fructose, ont montré une altération de la vasorelaxation dépendant du NO au niveau de l'aorte en réponse à l'acétylcholine (Ketonen et al. 2010 ; Halimi et al. 2010). Cette altération était corrélée à la quantité du tissu adipeux viscéral. La libération locale de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et TNF $\alpha$  provoquent des changements phénotypiques dans les cellules endothéliales qui vont exprimer des ligands de surface cellulaire tels que les sélectines, les molécules d'adhésion vasculaires et la protéine chimio-attractante monocytaire-1 (MCP-1). Ceci facilite les interactions endothéliales favorisant ainsi l'infiltration des monocytes et la formation de cellules riches en lipides et leur accumulation avec une altération de la relaxation dépendante de l'endothélium du NO. Ce processus représente un élément crucial dans le développement de l'athérosclérose (Meyers and Gokce 2007).

D'autre part, les cellules adipeuses produisent des substances antiathérogènes et vasculo-protectrices comme l'adiponectine. Il a été démontré que les taux d'adiponectine sont diminués chez les personnes obèses et ont en revanche, tendance à augmenter avec la perte de poids ou la pharmacothérapie contre l'obésité (Meyers and Gokce 2007). En ce qui concerne la vasomotricité, des études ont montré que l'adiponectine stimule la production de NO dans les cellules endothéliales en culture et diminue l'expression des molécules d'adhésion induites par les cytokines inflammatoires. Ainsi, l'hypoadiponectinémie consécutive à l'obésité serait associée à une altération de la fonction vasodilatatrice dépendante de l'endothélium (Ouchi et al. 2003). Selon d'autres études réalisées sur des modèles animaux d'obésité, il existe une production anormale de l'endothéline-1 par l'endothélium chez les animaux obèses. L'endothéline-1 est un puissant agent vasoconstricteur pro-athérogène. Une telle augmentation pourrait induire la baisse de la production du NO (Prieto et al. 2014).

Enfin, la biodisponibilité réduite du NO due au stress oxydatif apparaît également comme l'une des principales causes de dysfonctionnement endothélial de l'obésité. En effet, dans un contexte d'inflammation, le tissu adipeux et en particulier le tissu adipeux périvasculaire secrète de plus grandes quantités de ERO et d'adipokines qui détériorent les voies de signalisation du NO (Engin 2017). A ce sujet, des études menées sur des adipocytes en culture de souris obèses ont montré une augmentation du stress oxydatif dans le tissu adipeux et une régulation à la hausse

de l'activité de la NADPH oxydase associées à une production anormale d'adipokines (Furukawa et al. 2004).

### 3.3.3 Dysfonction endothéliale et insulino-résistance

Dans un contexte d'insulino-résistance, l'activation de la PKC par les fortes concentrations en glucose, les acides gras non estérifiés, le DAG et la production élevée d'anions superoxydes entraînent une diminution de l'expression de la eNOS et une altération de la signalisation des cellules vasculaires (Rask-Madsen and King 2005). En effet, l'activation de la PKC dans les tissus vasculaires de sujets insulino-résistants pourrait inhiber l'activité de la PI3K et l'expression de la eNOS ce qui entraîne un dysfonctionnement endothélial par baisse de la production du NO (Kuboki et al. 2000). D'un autre côté, la tyrosine kinase du récepteur à l'insuline (IRS-1) et la kinase-1 dépendante du phosphoinositide (PDK-1) jouent un rôle essentiel dans les voies de signalisation de l'insuline conduisant à l'activation de la eNOS. Il a été démontré que la phosphorylation de la tyrosine induite par l'IRS-1/2, l'activation de la PI3K et la phosphorylation de la sérine d'Akt/PKB sont altérées dans le système vasculaire des animaux obèses et résistants à l'insuline. Chez ces sujets, les fonctions vasodilatatrices et antiathérogènes de l'insuline sont diminuées tandis que les actions pro-athérogènes médiées par la cascade de MAPK peuvent être accrues en raison d'une hyperinsulinémie. L'altération de la voie de signalisation de l'insuline dépendante de PI3K dans l'action de l'insuline contribue à la dysfonction endothéliale associée à la résistance à l'insuline (Engin 2017).

De plus, une altération métabolique de la signalisation dépendante de la PI3K dans l'endothélium peut entraîner un déséquilibre entre la production de NO et la sécrétion d'endothéline-1. Ce déséquilibre conduit à une diminution du flux sanguin qui aggrave la résistance à l'insuline (J. Kim et al. 2006 ; Engin 2017).

### 3.3.4 Dysfonction endothéliale et dyslipidémies

La dyslipidémie est caractérisée par une augmentation du LDL-cholestérol et une baisse du HDL-cholestérol. Il a été démontré que le LDL oxydé favorisait la production d'anions superoxydes et augmentait la production des ERO par la eNOS elle-même, après l'avoir activée (J. Li et al. 2019). Selon une autre étude, la dysfonction endothéliale implique essentiellement une augmentation de l'activité de la NADP oxydase productrice des ERO, dans un modèle de rat hyperlipidémique après un régime high fat (T.-B. Li et al. 2017).



### 3.3.5 La dysfonction endothéliale et athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire de la paroi artérielle qui apparaît suite à une agression de l'endothélium vasculaire notamment par la présence des LDL oxydées. L'endothélium n'exerçant plus ses fonctions régulatrices, favorise l'adhérence des monocytes circulants au niveau de la surface de l'endothélium et leur pénétration dans l'espace sous endothélial. C'est l'étape initiatrice dans la formation de la plaque athéromateuse. Les monocytes se transforment ensuite en macrophage puis en cellules spumeuses sous l'influence de différents facteurs. La rupture des cellules spumeuses provoque le dépôt du cholestérol dans l'intima sous forme de corps lipidique. Les macrophages jouent un rôle délétère important dans les différentes étapes de l'athérosclérose, essentiellement par la production de cytokines pro-inflammatoires qui génèrent à la fois la croissance de la plaque, et sa fragilisation (Duriez 2004). La plaque athéromateuse se caractérise par une chape fibreuse constituée de CML, de collagènes et d'une matrice extra-cellulaire qui entoure le corps lipidique. Les CML proviennent de la média après migration à travers la limitante élastique interne vers l'intima et prolifération sous influence des facteurs de croissance. La chape fibreuse est considérée comme un facteur de stabilité de la plaque d'athérome (Duriez 2004).

#### IV. Le microbiote intestinal

##### 1. Définition

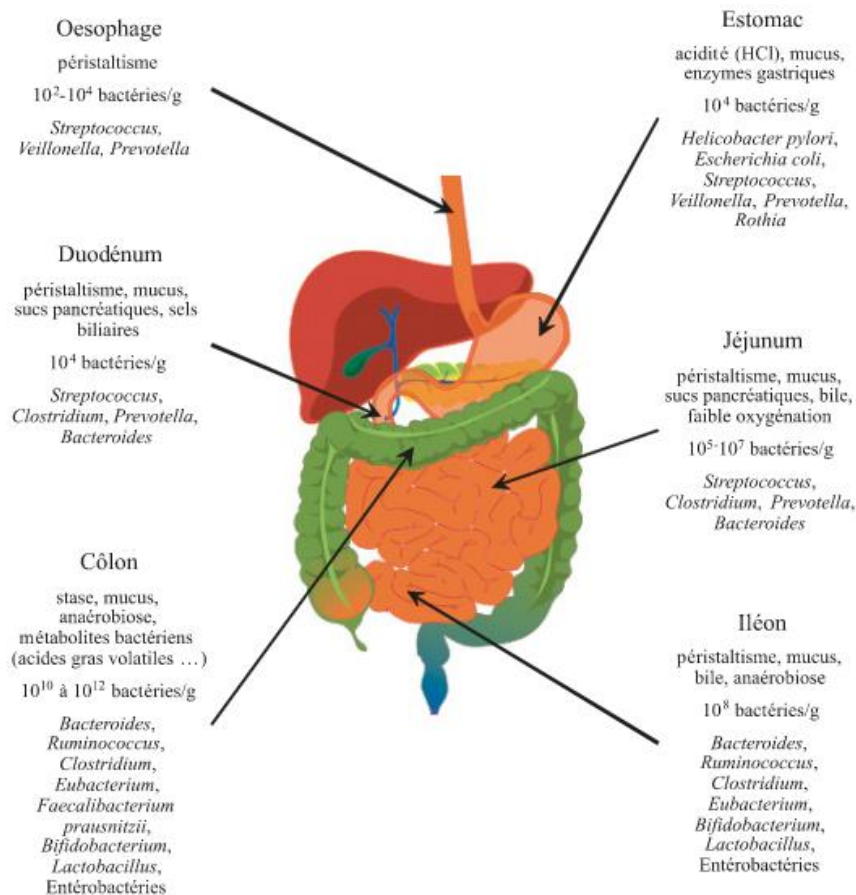
Le microbiote intestinal désigne l'ensemble de la population de micro-organismes vivant au sein du tractus gastro-intestinal en accord avec l'hôte. Il est, de loin, le plus peuplé et les bactéries y sont les micro-organismes les plus nombreux (Raibaud et Ducluzeau., 1989). Actuellement, les auteurs le qualifient comme étant un organe à part entière ayant coévolué avec son hôte pour parvenir à une relation symbiotique menant à l'homéostasie physiologique. Il joue un rôle primordial dans le métabolisme des composants alimentaires non digestibles, dans la production de vitamines et d'acides gras à courte chaîne, et dans la mise en place du système immunitaire de l'hôte. Un déséquilibre dans la composition bactérienne du microbiote intestinal appelé aussi une dysbiose intestinale, a été associé à des dysfonctionnements de l'appareil digestif et à l'apparition des maladies métaboliques (Festi et al,2014).

##### 2. Composition

Le fœtus des mammifères se développe *in utero* dans un environnement stérile (Doré and Corthier 2010). A la naissance, le tractus digestif du nouveau-né entre en contact

progressivement avec les bactéries provenant du microbiote maternel et de l'environnement. Ces bactéries vont coloniser rapidement son tube digestif et participer à la mise en place du microbiote intestinal de l'enfant (Gérard 2011).

Le microbiote intestinal abrite plus de  $10^{14}$  microorganismes, ce qui représente 10 à 100 fois le nombre de cellules du corps humain et l'équivalent d'une masse d'environ 1 kg (Kaoutari et al. 2014). La plupart de ces microorganismes n'ont pas encore été identifiés à ce jour (Coudeyras and Forestier 2010). La composition du microbiote intestinal est décrite habituellement à partir de l'analyse des échantillons de selles. Elle représente ainsi la composition microbienne de la partie terminale du tube digestif. Firmicutes Bacteroidetes et Actinobacteria sont les trois principaux phyla du microbiote intestinal et constituent près de 90% de la population totale (Gérard 2011). Le phylum des Firmicutes (Bactéries à gram positif), est en général le plus représenté comportant plus de la moitié des bactéries présentes. Les Bacteroidetes (Bactéries anaérobies à gram négatif), deuxième phylum dominant, représente 10 à 30% des bactéries totales. Quant aux Actinobacteria, ils sont moins systématiquement détectés en dominance et représentent moins de 10% (Gérard 2011). Il est important de noter que la composition du microbiote intestinal varie quantitativement et qualitativement le long du tube digestif en lien avec les variations des conditions biochimiques dans les différents compartiments du tractus gastro-intestinal (**Figure 14**). Ainsi, Au niveau de l'estomac, l'acidité gastrique a été décrite comme toxique pour la plupart des bactéries. Cependant, seulement quelques bactéries sont capables de résister à ces conditions de PH très acide dont les bactéries: *Helicobacter Pylori* et *Streptococcus* sp. (Bik et al. 2006). En effets, la densité bactérienne au niveau gastrique, est estimée à quelques centaines de bactéries. Malgré la toxicité des sécrétions pancréatiques et des sels biliaires, la densité bactérienne augmente le long du tube digestif a atteint son maximum dans le colon distal avec  $10^{11}$  bactéries par gramme (Leclerc et al. 2007). Le péristaltisme important est associé à un diminution de la teneur en oxygène dans l'intestin grêle jusqu'à sa disparition totale dans la partie distale du tube digestif (Leclerc et al. 2007). Les bactéries qui résident à ce niveau sont ainsi majoritairement anaérobies strictes.



**Figure 14:** Schéma illustrant les principaux stress physico-chimiques et la concentration bactérienne dans chaque compartiment du tractus gastro-intestinal. D'après Coudeyras and Forestier (2010)

### 3. Facteurs influençant la composition du microbiote intestinal

#### 3.1 Influence du terrain génétique

Malgré le fait que le tractus gastro-intestinal du nouveau-né se trouve dès la naissance confronté à une multitude de micro-organismes provenant de l'environnement, des études ont montré l'importance du terrain génétique dans la modulation de la colonisation bactérienne du nouveau-né. En effet, une étude menée sur 3 couples de jumeaux homozygotes a montré qu'après l'âge de 25 ans, ceux-ci avaient un microbiote similaire suggérant que le génotype de l'hôte pourrait jouer un rôle déterminant dans la mise en place du microbiote intestinal (Erwin G. Zoetendal 2001).

### 3.2 Influence du régime alimentaire

De nombreuses études ont évalué l'importance du régime alimentaire dans la modulation du microbiote intestinal de l'hôte qu'il soit bénéfique ou néfaste. A ce sujet, une étude réalisée sur des rats ayant reçu du sucralose pendant 12 semaines, a montré des proportions diminuées de *Bacteroides*, *Clostridia* et des bactéries aérobies dans le microbiote intestinal de ces rats et un PH fécal significativement plus élevé en comparaison avec les rats n'ayant pas reçu de sucralose (Abou-Donia et al. 2008). Une expérience similaire réalisée sur des souris a révélé une augmentation de l'expression de gènes pro-inflammatoires bactériens dans l'intestin ainsi qu'une perturbation des métabolites fécaux (Bian et al. 2017). En revanche, il a été rapporté que les individus ayant un apport important en fibres étaient moins sensibles au développement des maladies cardiovasculaires, des maladies inflammatoires chroniques, du diabète de type 2 et du cancer du côlon (Holscher 2017)

### 3.3 Influence de la prise médicamenteuse

En plus du régime alimentaire, les médicaments jouent un rôle clé dans la modulation de la composition du microbiote intestinal. Une étude a montré que certains médicaments comme les inhibiteurs de la TNF $\alpha$  entraînent une perturbation de la composition du microbiote intestinal (Valdes et al. 2018). Par ailleurs, il a été également montré que l'utilisation des antibiotiques pouvait être associée à des effets obésogènes chez les rats même à des doses faibles (Reijnders et al. 2016). En revanche, des expériences réalisées sur des animaux ont permis de mettre en évidence des effets protecteurs des phytoestrogènes sur le cancer du sein. Ces effets seraient probablement médiés par les bactéries du microbiote intestinal (*Enterococcus faecium*, *Lactobacillus mucosae*, *Bifidobacterium sp.*, *Coriobacteriaceae sp.*, *Eggerthella sp*) qui seraient capables de transformer les isoflavones en composés bioactifs (Spanogiannopoulos et al. 2016).

## 4. Principales fonctions du microbiote intestinal

### 4.1 Fonctions métaboliques

Les bactéries du microbiote intestinal exercent plusieurs fonctions physiologiques. Elles participent au métabolisme des sucres, des lipides et des protéines, permettent la digestion des fibres alimentaires grâce à des enzymes que l'homme ne possède pas conduisant à la production d'acides gras à courtes chaînes (AGCC) tels que le butyrate, le propionate et l'acétate (Jandhyala et al. 2015) absorbés par l'intestin. Ces AGCC représentent une source d'énergie

pour l'hôte et jouent un rôle important dans la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales au niveau du côlon (Srikanth and McCormick 2008). Le microbiote intestinal permet également la fermentation des résidus alimentaires non digestibles et le maintien de l'homéostasie des gaz au niveau de l'intestin. De plus, il participe aussi à la synthèse de plusieurs vitamines telles que la biotine (vitamine B8), les folates (vitamine B9), la vitamine B12 et la vitamine K, vitamine essentielle de la coagulation (Harmsen and de Goffau 2016).

#### 4.2 Fonction protectrice

La barrière intestinale est une entité fonctionnelle complexe dont la première fonction est de limiter l'accès du contenu de la lumière intestinale qui inclut les composants bactériens du microbiote intestinal, à la circulation. Le microbiote intestinal renforce l'intégrité de la barrière intestinale pour maintenir un équilibre stable au sein de la muqueuse intestinale et constituer une ligne de défense face aux agressions de l'environnement. Il favorise de ce fait, la production de mucus, la sécrétion de défensine et d'immunoglobulines A sécrétoires et la synthèse des protéines de jonction serrée par les entérocytes (Genser et al. 2016).

Enfin, la flore intestinale joue également un rôle majeur dans le développement et la maturation du système immunitaire et contribue à la défense de l'hôte contre les agents pathogènes (Gaboriau-Routhiau and Cerf-Bensussan 2016).

### 5. Syndrome métabolique et dérèglement du microbiote intestinal

#### 5.1 Microbiote intestinal et hypertension artérielle

Une étude réalisée sur deux modèles animaux différents d'hypertension artérielle a permis d'apporter de nouvelles connaissances sur une éventuelle association entre une dysbiose de la flore intestinale et l'hypertension artérielle.

Les principaux résultats révélés par cette étude ont montré une altération de la richesse et de la diversité microbienne ainsi qu'une augmentation marquée du ratio Firmicutes /Bacteroidetes chez les sujets hypertendus. Cette dysbiose était aussi associée à une forte diminution dans les populations bactériennes productrices d'acétate et de butyrate. Le butyrate est un des AGCC les plus bénéfiques pour l'hôte pour les multiples effets dont il est à l'origine comme la réduction de l'inflammation au niveau du tissu adipeux et de l'intestin, l'amélioration de l'insulino-sensibilité, la protection contre l'obésité induite par le régime alimentaire et les maladies cardiovasculaires. Cet AGCC joue, également, un rôle dans la régulation de la différenciation des cellules épithéliales et dans l'amélioration de l'inflammation mucoale. Un

autre AGCC, le propionate semble induire une vasodilatation et une réponse hypotensive aigue médiée par un récepteur couplé à une protéine G comme le récepteur Grp41 exprimé dans les cellules musculaires lisses des petits vaisseaux ou encore le récepteur olfr78 exprimé au niveau de l'appareil juxtaglomérulaire du rein là où la sécrétion de la rénine a lieu (T. Yang et al. 2015; Gómez-Guzmán et al. 2015)

## 5.2 Obésité et microbiote intestinal

En plus de l'hypertension artérielle, des études ont suggéré que le microbiote intestinal pourrait exercer un rôle essentiel dans le développement de la masse grasse et dans l'altération de l'homéostasie énergétique. D'après Bäckhed et al. (2004) le microbiote intestinal stimule le stockage des triglycérides circulants dans les adipocytes en réprimant la sécrétion d'un inhibiteur de la lipoprotéine lipase (LPL) appelé angiopoitein-like protein 4 (ANGPTL4) au niveau intestinal.

Dans le même contexte, une comparaison du microbiote de souris minces et obèses a montré que les bactéries provenant des souris obèses contenaient plus de gènes codant pour des enzymes responsables de la dégradation des polysaccharides non digestibles et que la concentration en AGCC dans le contenu caecal était plus élevée tandis que la teneur des fèces en calories était plus faible ce qui laisse à supposer que l'extraction de l'énergie à partir de l'alimentation est plus importante chez les sujets obèses (Turnbaugh et al. 2006).

L'obésité a, également, été associée à une hyperréactivité du système endocannabinoïde (eCB) impliqué en conditions physiologiques dans le maintien de la perméabilité intestinale. En effet, des travaux récents, ont prouvé que l'accumulation de la graisse abdominale conduit à une dérégulation de ce système et les hypothèses avancées suggéraient que le microbiote intestinal pourrait à travers les récepteurs du système (eCB) modifier l'intégrité de la barrière intestinale (Muccioli et al. 2010).

## 5.3 Insulinorésistance et microbiote intestinal

Afin de déterminer le rôle du microbiote intestinal dans le développement d'une insulinorésistance, des expériences réalisées sur des souris soumises à un régime riche en lipides ont permis de voir la concentration plasmatique des LPS (lipopolysaccharides) doubler voire même tripler. Ces LPS sont reconnus par le complexe CD14-TLR-4 présent à la surface des cellules immunitaires ce qui provoque une augmentation de l'expression de cytokines pro-

inflammatoires dont l'IL-6 et par conséquent, une augmentation du niveau de l'insulinorésistance (P. D. Anderson et al. 2007).

## V. Approche thérapeutique

La prise en charge du syndrome métabolique vise à prévenir l'installation des complications cardiovasculaires et retarder l'évolution vers le diabète du type 2. Pour répondre à cet objectif, il est nécessaire d'agir sur chaque composante de ce syndrome, car à l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement permettant de traiter l'ensemble des anomalies observées au cours du syndrome métabolique. Cependant, un régime alimentaire équilibré et une activité physique régulière occupent une place majeure dans cette prise en charge.

### 1. Mesures hygiéno-diététiques

#### 1.1. Règles diététiques

La perte de poids constitue une partie du traitement idéal de l'hypertension artérielle chez le patient obèse. Une étude a montré qu'en présence d'un excès de poids, une perte de 5 kg entraîne déjà une diminution significative de la pression artérielle comparable à celle induite par la prise d'un agent anti-hypertenseur (Geronoz and Krzesinski 2000). De plus, la réduction pondérale aide à limiter d'autres facteurs de risques cardiovasculaires tels que l'intolérance au glucose, l'insulinorésistance et les dyslipidémies (Wing et al. 2011).

Les mesures diététiques visant la perte pondérale vont de la restriction calorique plus ou moins sévère à des modifications de la composition de l'apport alimentaire. Plusieurs études ont décrit les effets bénéfiques de la restriction alimentaire sur les facteurs de risques cardiovasculaires associées au syndrome métabolique. A ce sujet, une étude expérimentale réalisée par Ketonen, et al. (2010) a rapporté que la restriction calorique sévère a permis de restaurer la fonction endothéliale et de réduire le stress oxydant chez des souris obèses. De plus, une étude menée sur des souris C57BL/6J a montré que la restriction calorique à long-terme induisait des changements dans la composition du microbiote intestinal de ces souris en favorisant la croissance des bactéries bénéfiques telles que les Lactobacilles (C. Zhang et al. 2013).

#### 1.2 Activité physique

A côté des mesures diététiques, l'activité physique régulière est indispensable dans la prise en charge du syndrome métabolique. En effet, une activité physique modérée aide à la fois à réduire la surcharge pondérale, diminuer les valeurs de la pression artérielle et à améliorer

certaines paramètres métaboliques dont la sensibilité à l'insuline et le profil lipidique contribuant ainsi à l'amélioration du pronostic cardiovasculaire (Geronooz and Krzesinski 2000).

Plusieurs études expérimentales ont souligné une corrélation positive entre la pratique d'une activité physique et la réduction des facteurs de risques cardiovasculaires. Une étude menée sur 621 sujets sédentaires de sexe différent, a montré que la prévalence du syndrome métabolique est passée de 16,9% à 11,8% après 20 semaines d'entraînement (Duclos 2007). Selon cette même étude, 43% des sujets entraînés ont présenté une diminution des triglycérides, 16% une augmentation du HDL-cholestérol, 38% une diminution de la pression artérielle, 9% de la glycémie et 28% une diminution du tour de taille. Par ailleurs, des études expérimentales réalisées sur le rat hypertendu ont prouvé qu'une séance d'exercice de résistance était suffisante pour observer une amélioration de la fonction endothéliale dans divers vaisseaux (Pagan, et al. 2018). Cette amélioration est caractérisée par une augmentation de la production basale de NO et de l'expression de la NOS endothéliale et par une diminution de la production des espèces réactives à l'oxygène (Pagan et al. 2018).

Enfin, une étude réalisée chez l'homme a montré que l'exercice physique entraîne une augmentation de la diversité bactérienne du microbiote intestinal, améliore le ratio Firmicutes/Bacteroidetes qui pourrait potentiellement contribuer à réduire le poids et les risques de pathologies associées à l'obésité et les troubles gastro-intestinaux (Monda et al. 2017).

### 1.3 Les probiotiques

Selon la FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations), les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants, qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante exercent un effet un effet bénéfique sur la santé de l'hôte au-delà de l'effet nutritionnel premier.

L'intérêt des probiotiques dans la prise en charge du syndrome métabolique et des altérations associées est croissant comme le montre de nombreuses publications. Effet, une étude réalisée par Gómez-Guzmán et (al. 2015) a montré que l'administration orale chronique de souches *Lactobacillus* à des SHR a réduit significativement l'hypertension artérielle et a amélioré la fonction endothéliale grâce à la réduction du statut pro-inflammatoire et pro-oxydant vasculaire. Ces effets bénéfiques étaient associées à des changements dans la composition du microbiote intestinal. Une autre étude a montré que l'administration de probiotiques pendant 12 semaines a amélioré les paramètres métaboliques en atténuant l'insulinorésistance, le stress oxydant et l'inflammation chez des rats obèses insulinorésistants (Tunapong et al. 2018).



## 2. Traitements pharmacologiques

Outre les mesures hygiéno-diététiques, il existe des traitements pharmacologiques pour aider les patients obèses à perdre du poids. Etant donné que la surcharge pondérale est le plus souvent la conséquence d'un déséquilibre entre apports alimentaires et dépenses énergétiques, deux approches pharmacologiques peuvent alors être mises en place :

- Les médicaments agissant au niveau du système nerveux central en augmentant la sensation de satiété et en limitant la prise alimentaire ou encore en diminuant l'absorption intestinale des aliments
- La deuxième approche vise à augmenter les dépenses énergétiques en agissant sur le métabolisme de base

Vu la physiopathologie complexe du syndrome métabolique, il existe à l'heure actuelle une difficulté au développement des médicaments qui réconcilient à la fois efficacité et absence d'effets secondaires néfastes. De nombreuses molécules ont été retirées du marché essentiellement en raison d'un rapport bénéfice/risque insuffisant voire négatif (Carette et al. 2012).

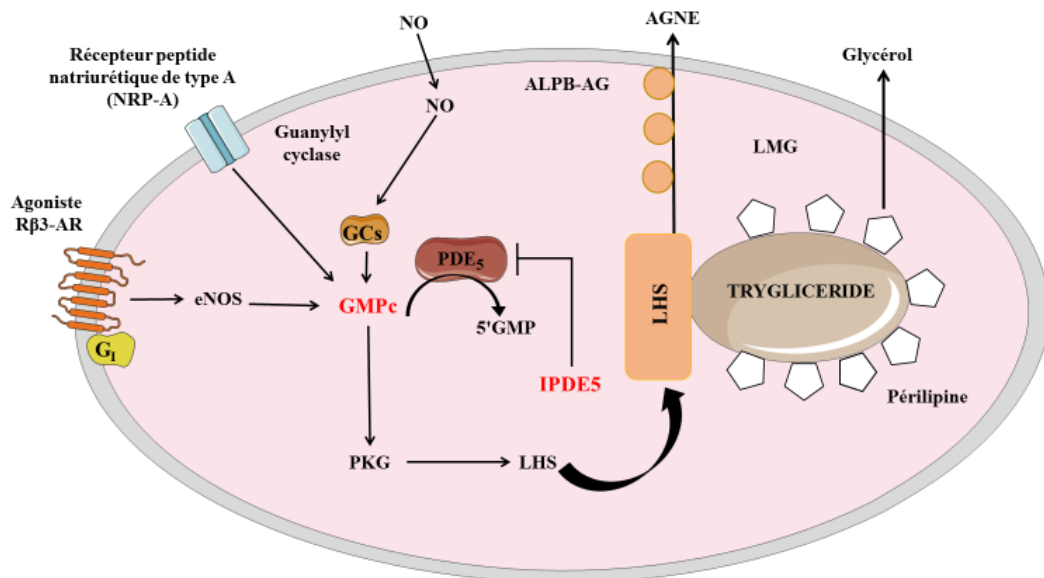
Des travaux ont permis de mettre en évidence un effet lipolytique puissant des peptides natriurétiques (PN) sur des adipocytes humains isolés. Les PN sont des hormones cardiaques qui ciblent un récepteur biologiquement actif de type (NRPA) couplé à une activité guanylyl cyclase intrinsèque entraînant une augmentation intracellulaire de GMPc. Le mécanisme impliqué dans l'effet lipolytique des PN semble être médié par l'augmentation du taux intracellulaire du GMPc suite à l'activation du récepteur NPRA et l'activation de l'une des enzymes limitantes de la lipolyse, la lipase hormonosensible (Moro 2013). Dans ce contexte, des études expérimentales ont décrit la signalisation du GMPc comme une voie permettant la stimulation du métabolisme énergétique. De plus, une étude réalisée sur des souris soumises à un régime hyperlipidique a montré que l'augmentation intracellulaire du GMPc par les PN a permis de prévenir la prise de masse grasse excessive et de prévenir les effets délétères du régime hyperlipidique sur l'homéostasie glucidique de ces souris (Lafontan 2014). Ces résultats suggèrent que l'activation de la voie du GMPc pourrait être une option thérapeutique envisageable dans la prise en charge du syndrome métabolique.

Récemment, de nouvelles molécules de différentes classes thérapeutiques augmentant la génération du GMPc ont été étudiées dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire et les dysfonctions érectiles chez l'homme. Toutefois, des effets anti-obésité de ces molécules

ont été rapportés aussi bien chez les rongeurs que chez l'homme (Hoffmann et al. 2016) (**Figure 15**).

Parmi ces molécules on trouve :

- Les inhibiteurs des phosphodiésterases de type 5 qui empêchent la dégradation du GMPc
- Les stimulateurs de la GCs qui sensibilisent la GCs à de faibles taux de NO biodisponibles en maintenant l'enzyme sous sa forme active.
- Les agonistes  $\beta_3$ -adrénergiques qui augmentent la production du GMPc *via* l'activation de la NOS endothéliale



**Figure 15:** Contrôle de la lipolyse dans l'adipocyte humain *via* la voie de signalisation du GMPc. D'après Moro, 2013

## Position du problème et Objectifs

Le syndrome métabolique multiplie par 3, les risques d'accidents cardiovasculaires qui représentent de nos jours la première cause de mortalité dans le monde. Sa physiopathologie n'est pas univoque mais les causes les plus souvent impliquées sont la sédentarité et la consommation excessive en graisses et en sucres associées à des prédispositions génétiques.

De nombreuses études ont montré une altération dans la voie de signalisation du NO-GCs-GMPc au cours du syndrome métabolique. Cependant, des effets vasculaires protecteurs ont été rapportés dans des modèles animaux d'hypertension pulmonaire et de dysfonction érectile après traitement chronique par des modulateurs de la voie du GMPc. En revanche, les effets de ces traitements pharmacologiques sur les paramètres métaboliques et la fonction circulatoire au cours du syndrome métabolique ne sont pas clairement établis. Nous avons, de ce fait, émis l'hypothèse que l'augmentation du taux cellulaire en GMPc pourrait affecter favorablement le développement du syndrome métabolique et prévenir les altérations cardiovasculaires qui lui sont associées. La voie du GMPc serait donc une cible thérapeutique envisageable pour maintenir l'homéostasie cardiovasculaire.

C'est la raison pour laquelle, nous avons souhaité étudier la modulation de la voie du GMPc par des molécules appartenant à différentes classes thérapeutiques :

- D'abord, le sildénafil citrate, un inhibiteur sélectif et puissant des phosphodiésterases de type 5, qui empêche la dégradation du GMPc
- Ensuite, le BAY 41-2272, un stimulateur hautement spécifique de la GCs, une classe thérapeutique peu explorée dans le syndrome métabolique. Le BAY 41-2272 a un mécanisme d'action double : il sensibilise la GCs au NO endogène en stabilisant la liaison NO-GCs et il stimule directement la GCs pour un site de liaison différent indépendamment du NO (Mittendorf et al. 2009). En tant que stimulateur de la GCs, le BAY 41-2272 permet de pallier le déficit de NO en restaurant la voie NO-GCs-GMPc
- Enfin, le mirabegron, un activateur de la voie du GMPc via ses propriétés  $\beta_3$  agonistes
  - Le premier objectif de cette thèse est d'évaluer la modification de la fonction circulatoire globale chez des rats spontanément hypertendus soumis à un régime hypercalorique de type « cafeteria diet » pendant 12 semaines.

- Le deuxième objectif est d'étudier les effets de la modulation à long-terme de la voie du GMPc sur les paramètres métaboliques et la fonction circulatoire chez les SHR avec un syndrome métabolique induit expérimentalement.

Par ailleurs, de nombreux travaux de recherche se concentrent actuellement sur le lien entre le microbiote intestinal et le syndrome métabolique. Il a été mis en évidence récemment que le microbiote intestinal serait aussi impliqué dans le développement du syndrome métabolique et de ses complications cardiaques et vasculaires.

- Le troisième objectif de cette thèse est d'évaluer la composition du microbiote intestinal des SHR avant et après traitements pharmacologiques.

## **Matériels et méthodes**

## I. Matériel biologique et protocole expérimental

### 1. Animaux

Dans notre étude, les rats ayant servi aux différentes expériences sont fournis de l'élevage Janvier Labs (Le Genest, Sainte Isle) à l'âge de 7 semaines. Les rats sont logés à raison de 1 rat /cage à l'animalerie Rongeurs groupe II d'Oniris. Tous les animaux sont maintenus à température constante ( $22\pm 2^\circ\text{C}$ ) et soumis à un cycle de lumière/obscurité de 12/12 heures avec un accès à l'eau et à l'alimentation standard (KLIBA NAFAG®, Kaiseraugst, Allemagne) dont la composition est retrouvée dans le **Tableau 2**, *ad libitum*. Le protocole expérimental a été validé par le comité d'éthique en expérimentation animale des Pays de Loire (APAFIS N°6445).

**Tableau 2:** Composition de l'aliment standard

Inhaltsstoffe   Substances   Major Nutrients	
Trockensubstanz   Matière sèche   Dry matter	88.0 %
Rohprotein   Protéines brutes   Crude protein	18.5 %
Rohfett   Graisses brutes   Crude fat	4.5 %
Rohfaser   Fibres brutes   Crude fiber	4.5 %
Rohasche   Cendres brutes   Crude ash	6.3 %
NfE   ENA   NFE	54.2 %
Bruttoenergie   Energie brute   Gross energy	16.1 MJ/kg
Umsetzbare Energie   Energie métabolisable   Metabol. energy	13.2 MJ/kg
Stärke   Amidon   Starch	35.0 %

### 2. Modèle animal de syndrome métabolique

Le choix de cette étude s'est porté sur la souche de rats spontanément hypertendus (SHR). Cette souche présente la particularité de développer génétiquement de l'hypertension artérielle à partir de l'âge de 5 à 6 semaines. L'origine de cette hypertension est polygénique avec au moins 3 gènes majeurs impliqués. De plus, le SHR est aussi connu pour être génétiquement insulino-résistant. Du fait de son insulino-résistance et son hypertension artérielle spontanée, le SHR présente 2 des 5 critères indispensables du syndrome métabolique (Reaven and Chang 1991).

Les rats sont exposés à un régime hypercalorique de type « *cafeteria diet* » (CD) pendant 10-12 semaines. Ce régime consiste à permettre aux rats, un libre accès à une alimentation humaine très énergétique, hyper glucidique (Biscuit, chocolat, bonbons...) dont la composition est

représentée dans le **Tableau 3**, en plus de l'alimentation standard. Les aliments sont changés chaque jour afin de stimuler l'hyperphagie volontaire. Ce régime entraîne un gain de poids, une augmentation de la masse grasse, une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline (Lehnen et al. 2013)

**Tableau 3:** Composition du régime « Cafeteria diet »

	<b>Energie (Kcal / 100g)</b>	<b>Lipides (g)</b>	<b>Glucides (g)</b>	<b>Protéines (g)</b>
<b>Snickers (100g)</b>	483	22,8	60,2	8,6
<b>Marshmallow (100g)</b>	326	0,5	80	2,6
<b>Prince (100g)</b>	470	17	73	5,1
<b>Oréo (100g)</b>	480	20	69	5
<b>Sundy (100g)</b>	494	23,2	65,6	4,7
<b>Crunch (100g)</b>	514	25,9	62	6,9

### 3. Traitement pharmacologique

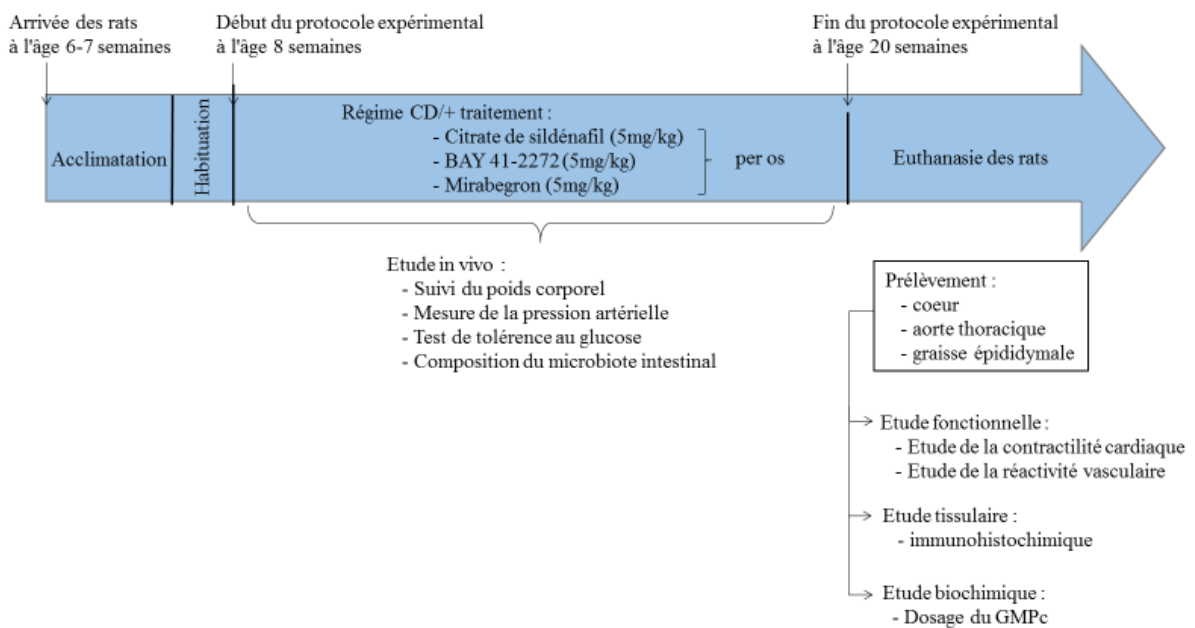
Afin d'étudier les effets des activateurs de la voie du GMPc sur les paramètres métaboliques, la réactivité cardiovasculaire et la composition du microbiote intestinal au cours du syndrome métabolique, les rats sont séparés de façon aléatoire en 5 groupes : un groupe témoin, un groupe soumis au régime CD, les 3 derniers groupes sont également soumis au régime CD et traités respectivement au citrate de sildénafil (un inhibiteur des phosphodiésterases de type 5), au BAY 41-2272 (un activateur de la voie du GMPc à travers la stimulation de la guanylate cyclase soluble) et au mirabegron (un activateur de la voie du GMPc via ses propriétés  $\beta$ 3-adrénergiques) (**Tableau 4**). La quantité de principe actif nécessaire au traitement des rats est pesée et dissoute dans l'eau pour une dose de 5mg/kg. Le traitement est administré aux rats pendant 10-12 semaines, à heure fixe, sous contention et à l'aide de sonde gastrique. Le volume administré chaque jour pour chaque rat est de 0,7 à 0,8 ml.

Les rats sont pesés tous les 2 jours afin d'adapter la dose des médicaments administrés en fonction de leur poids.

**Tableau 4:** Répartition des différents groupes

Groupe	Animaux
1	SHR contrôle
2	SHR + CD
3	SHR + Citrate de sildénafil (5mg/kg)
4	SHR + CD + BAY 41-2272 (5mg/kg)
5	SHR + CD + mirabegron (5mg/kg)

## II. Suivi expérimental



**Figure 16:** Schéma illustrant les différentes étapes du protocole expérimental mis en place pour étudier les effets de l'activation chronique de la voie du GMPc, sur la fonction cardiaque, la réactivité vasculaire et la composition du microbiote intestinal des SHR avec un syndrome métabolique induit expérimentalement.



### III. Etude in vivo

#### 1. Suivi de l'évolution du poids corporel et de la circonférence abdominale

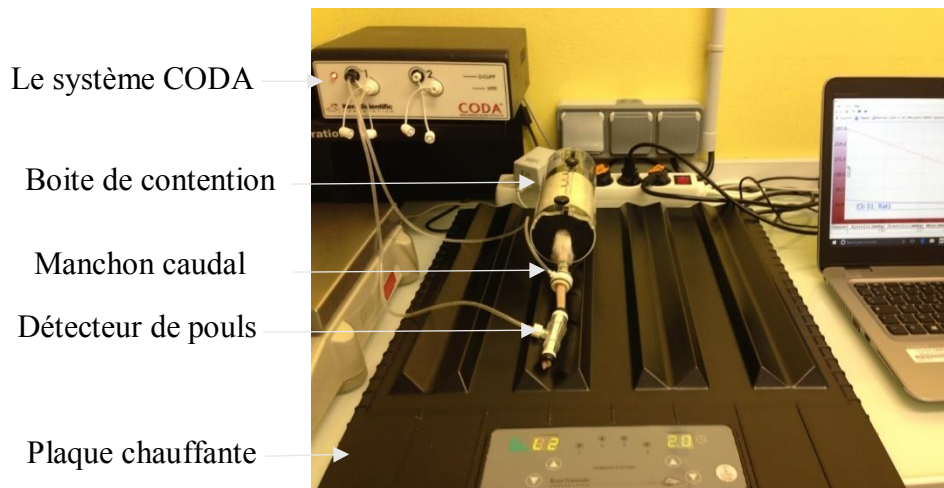
Afin de contrôler leur prise de poids, un suivi de l'évolution du poids corporel et de la circonférence abdominale est réalisé toutes les 2 semaines.

#### 2. Mesure de la pression artérielle

La pression artérielle est mesurée chez des rats vigiles dont le système cardio-vasculaire n'est pas déprimé par un produit anesthésique, selon la méthode de pléthysmographie caudale ou « tail-cuff » automatisée et informatisée (CODA, TemSega, Lormont, France). Similairement à la pléthysmographie chez l'homme, cette technique permet de mesurer de manière non invasive les pressions artérielles systolique (PAS) et diastolique (PAD) au niveau de l'artère caudale des rats grâce à un capteur pression-volume. Le principe de cette technique consiste à déterminer la contre-pression minimale capable d'arrêter le flux sanguin artériel par gonflage d'un manchon placé autour de la queue de l'animal. Le rat est placé dans une boîte de contention adaptée à son poids et déposé sur une plaque chauffante à 37°C afin de dilater l'artère caudale et augmenter de ce fait la sensibilité du signal. Les mesures sont effectuées dans une pièce calme dont la température avoisine les 20°C. Un manchon caudal adéquat est placé autour de la queue du rat et un détecteur de pouls placé en aval du manchon, permet d'enregistrer les variations de flux sanguin de l'artère caudale (**Figure 17**).

Les rats sont habitués à la technique pendant une semaine avant le début des expérimentations afin d'éviter les risques de biais liés au stress des animaux. La pression artérielle est mesurée avant le début du protocole expérimental, au milieu et à la fin du protocole pour chaque rat.

Pour chaque enregistrement, 10 mesures de pression consécutives au minimum sont nécessaires pour obtenir une valeur moyenne représentative de la pression artérielle (mmHg) de chaque rat.



**Figure 17:** Pléthysmographie caudale chez un rat vigile

### 3. Test de tolérance au glucose

Le test de tolérance au glucose est un test simple et non invasif qui permet d'évaluer la capacité de l'organisme à faire diminuer la glycémie après une charge en glucose.

Après un jeûne de 12 heures, une crème anesthésique locale (Lidocaine ®) est appliquée sur la queue du rat afin de limiter la douleur liée aux piqures. Des prélèvements de sang (une goutte de sang) sont effectués pour mesurer la glycémie dans la veine caudale rat avant et à 15, 30,45, 60 et 90 minutes de l'injection intrapéritonéale d'une solution glucosée (1g/kg).

La glycémie est mesurée à l'aide d'un glucomètre (Pura ®).

L'analyse des résultats est effectuée par l'étude de l'aire sous la courbe de la glycémie en fonction du temps).

### 4. Etude de la composition du microbiote intestinal

#### 4.1 Prélèvement de fèces

Le prélèvement des échantillons fécaux est réalisé quotidiennement à la même heure en plaçant les rats dans une cage préalablement nettoyée et désinfectée. Chaque rat a sa propre cage durant toute la durée de l'expérience. Les échantillons prélevés stérilement pour chaque rat (entre 4 et 11 crottes) sont divisés en deux tubes distincts à chaque prélèvement. L'un est destiné aux analyses HPLC et l'autre aux analyses de séquençage 16S. Les tubes sont conservés à -80°C.

## 4.2 Analyse de la composition du microbiote fécal par séquençage 16S

### ➤ Extraction d'ADN et PCR quantitative

L'ADN génomique présent dans les fèces est extraite selon le protocole publié par Godon et al. (1997) avec des modifications apportées par nos collaborateurs de l'équipe MIHA.

L'intégrité et la concentration de l'ADN extrait sont vérifiées par spectrophotométrie à l'aide du NanoDrop® et par électrophorèse sur gel d'agarose. La région V3-V4 est amplifiée au cours de 30 cycles d'amplification à 65°C à partir de l'ADN extrait avec l'amorce directe F343 (CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG) et l'amorce anti-sens R784 (GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT).

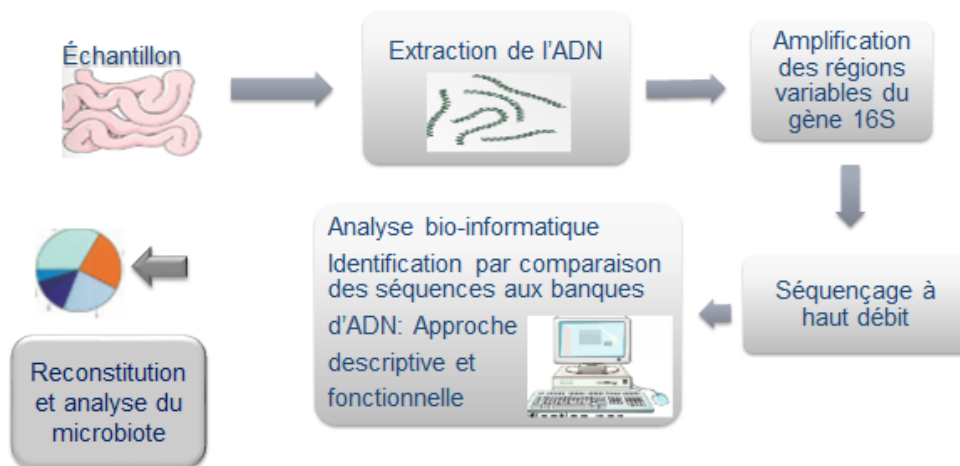
La taille théorique des amplicons est d'environ 510 pb. Les amplicons sont ensuite purifiés afin d'éliminer les amorces et d'autres amplifications non spécifiques.

### ➤ Séquençage de l'ADNr 16S

Les amplicons sont placés dans une plaque de 96 puits puis envoyés à la plateforme de séquençage « Génome et Transcriptome » (Get) de GenoToul (Toulouse, France). Le séquençage de l'ADNr 16S est réalisé en utilisant les amorces suivantes : AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGAC (amorce direct) CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT-index-GTGACTGGAGTTCAGACGTGT (amorce anti-sens) pendant 12 cycles à l'aide de la technologie IlluminaMiseq®.

### ➤ Analyses bio-informatiques

Les séquences obtenues sont ensuite assignées à des OTUs (Operational Taxonomic Units) avec une identité de 97% à l'aide de l'outil Galaxy (Escudié et al. 2018). Chaque OTU obtenu est assigné à un phylum, une famille, un genre donné à l'aide de la base de données Silva et du classificateur RDP (Wang et al. 2007) (**Figure 18**).



**Figure 18** : Schéma récapitulant les différentes étapes de l'analyse du microbiote intestinal

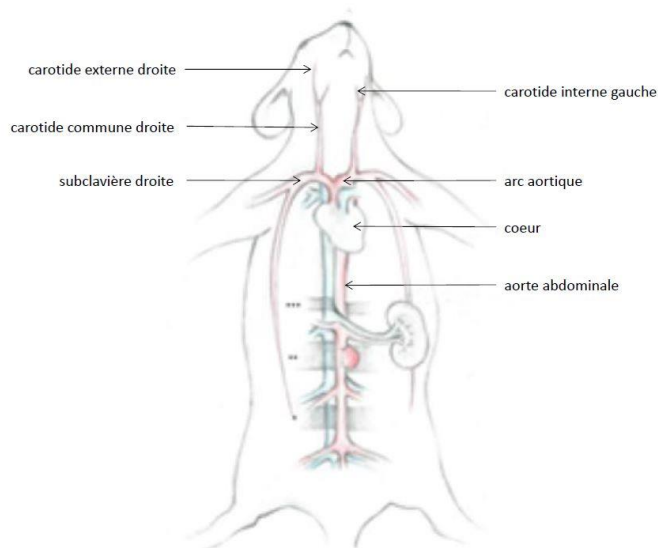
#### IV. Etude ex vivo

##### 1. Evaluation de la fonction cardiovasculaire sur cœur isolé et perfusé

Une étude ex vivo sur cœur isolé perfusé selon la méthode Langendorff est réalisée afin d'étudier l'effet du régime et des différents traitements sur les paramètres cardiaques à la fois à l'état de base et en réponse à une stimulation  $\beta$ -adrénergique. En effet, Langendorff a mis au point une technique en 1897 permettant de perfuser le cœur et de maintenir sa viabilité en dehors de l'organisme.

##### 1.1 Prélèvement du coeur

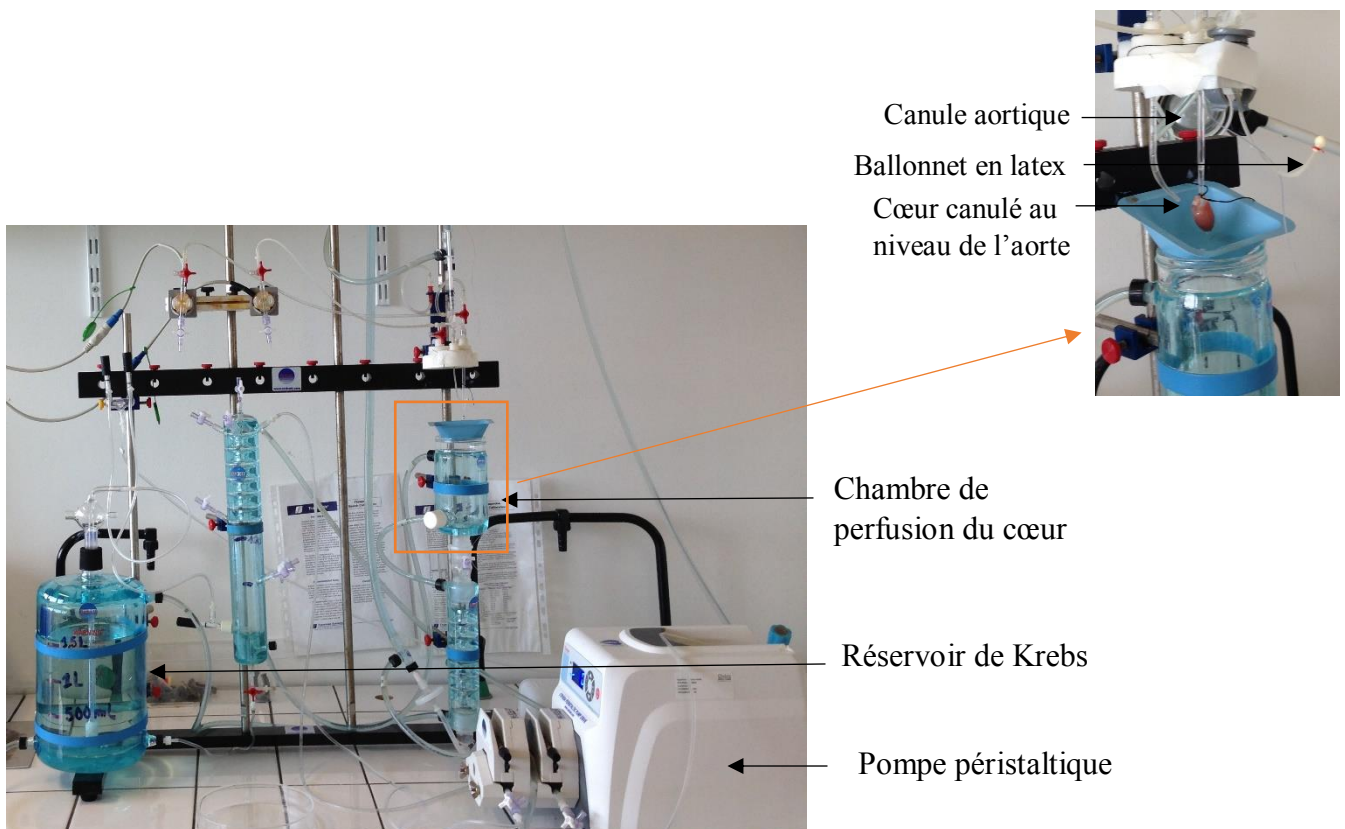
Les rats sont anesthésiés au pentobarbital sodique (50mg/kg) par injection intrapéritonéale. L'anesthésie est vérifiée par la perte du réflexe de redressement de la patte. Une fois anesthésié, une incision cutanée ventrale est effectuée afin de séparer le tissu sous-cutané du plan musculaire. Ensuite, une boutonnière est réalisée sous l'appendice xiphoïde permettant d'accéder à la cavité abdominale et d'exposer la coupole diaphragmatique qui sera alors incisée délicatement. Le rat est sacrifié par exsanguination de l'aorte abdominale. Les côtes sont ensuite coupées au niveau de leur insertion thoracique du bas vers le haut de chaque côté et la cage thoracique ainsi obtenue est réclinée vers le haut afin de mieux visualiser le cœur (**Figure 19**). Une fois visible, l'aorte descendante est saisie à l'aide d'une pince puis sectionnée le plus loin possible de la base du cœur de façon à avoir une distance suffisante pour faciliter la canulation. Enfin, tous les vaisseaux sont sectionnés permettant de libérer le cœur de la cavité thoracique.



**Figure 19:** Schéma montrant le cœur et les vaisseaux d'intérêt pour le prélèvement chez le rat

## 1.2 Principe de la méthode de Langendorff

Une fois prélevé, le cœur est plongé dans une solution de Krebs (**Tableau 5**) afin de le nettoyer et le laver de son sang puis rapidement canulé au niveau de l'aorte. Le cœur est ainsi installé, est perfusé par voie rétrograde à l'aide d'une solution de Krebs bullée au carbogène (95% d'O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>) afin de garder un pH stable et une pression en oxygène adaptée. La température est maintenue à 37°C et est contrôlée à l'aide d'une sonde thermique placée au niveau de l'oreillette droite. La perfusion est à débit constant (11ml/min) (Radnoti Organ Bath Systems, ADInstruments, Australie). Ce débit est mesuré par le recueil de l'effluent coronaire. Quant à la pression intra-ventriculaire gauche, elle est mesurée à l'aide d'un ballonnet en latex rempli d'eau et introduit dans le ventricule gauche à travers la valve mitrale, après avoir incisé l'oreillette gauche. Une fois bien positionné parallèlement à l'axe du cœur, le volume du ballonnet est alors contrôlé et ajusté à l'aide d'une seringue remplie d'eau de manière à ce que la pression minimale du ventricule gauche en fin de diastole atteigne une valeur de 5-10 mmHg (Skrzypiec-Spring et al. 2007). Le ballonnet ventriculaire ainsi que la canule aortique sont reliés à deux capteurs de pression qui à leur tour sont reliés à un système d'enregistrement et au logiciel LabChart (ADInstrument, France) permettant de visualiser et de suivre en continu les différents paramètres cardiaques (**Figure 20**).



**Figure 20:** schéma de montage du cœur isolé et perfusé selon la méthode Langendorff

### 1.3 Substance pharmacologique utilisée

Des solutions de perfusion à l'isoprénaline (un agoniste  $\beta$ -adrénergique non sélectif) sont préalablement préparées par une dilution en cascade à partir d'une solution mère d'isoprénaline de concentration  $10^{-2}$  mol/l. Après une première phase d'équilibration de 30 min permettant la stabilisation et l'enregistrement des paramètres de base, les perfusions sont utilisées de la concentration la moins élevée ( $10^{-9}$  mol/l) à la concentration la plus élevée ( $10^{-6}$  mol/l) pendant 3min suivi d'une phase de stabilisation des paramètres cardiaques qui nécessite une vingtaine de minutes.

**Tableau 5:** Composition de la solution de Krebs

Composants	Concentration en mM
NaCl	118,3
KCL	4,7
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2
NaHCO <sub>3</sub>	20
EDTA	0,016
Glucose	11,1
CaCl <sub>2</sub>	2,5

#### 1.4 Paramètres cardiaques évalués

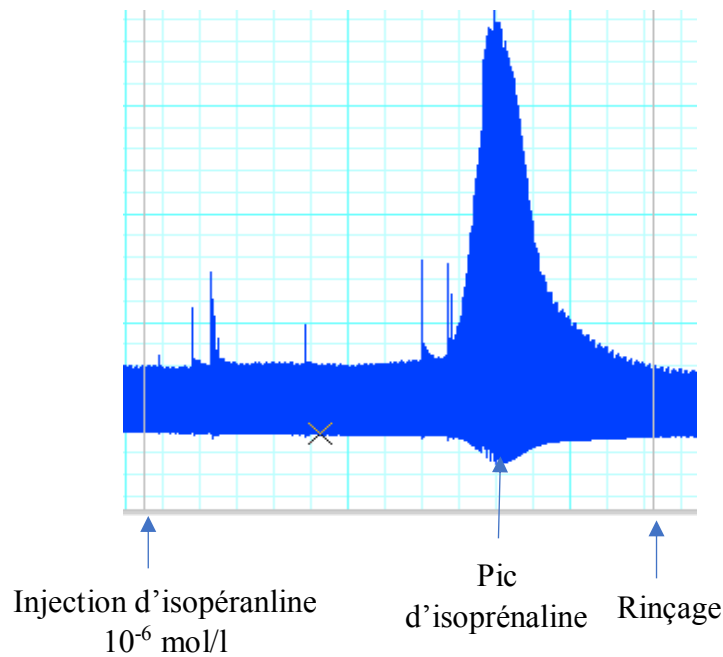
La technique du cœur isolé et perfusé permet d'évaluer :

- La contractilité cardiaque gauche (inotropisme) via les mesures de la pression développée (mmHg) et la dp/dt max (mmHg). La pression développée correspond à la différence entre la pression maximale en systole et la pression minimale en diastole. La dp/dt max correspond à la dérivée première de la pression du ventricule gauche en systole et renseigne sur la vitesse de contraction du cœur gauche.
- La relaxation du cœur (lusitropisme) via la mesure de la dp/dt min qui correspond à la dérivée première de la pression du ventricule gauche en diastole et renseigne sur la vitesse de relaxation du ventricule gauche.
- La fréquence cardiaque ou chronotropisme.
- La vasomotricité coronaire via la mesure de la pression de perfusion (mmHg).

#### 1.5 Traitement des données

Les valeurs moyennes des différents paramètres sont relevées avant et après injection de l'isoprénaline pendant 30 secondes (**Figure 21**). La valeur du paramètre enregistré après chaque injection d'isoprénaline est exprimée en mmHg et calculée comme suit :

$$\Delta \text{ (mmHg)} = \text{Valeur mesurée (mmHg)} - \text{Valeur basale (mmHg)}$$



**Figure 21:** Exemple de tracé obtenu après stimulation  $\beta$ -adrénergique

## 2. Mesure de la réactivité vasculaire sur aorte thoracique isolée

### 2.1 Préparation des anneaux aortiques

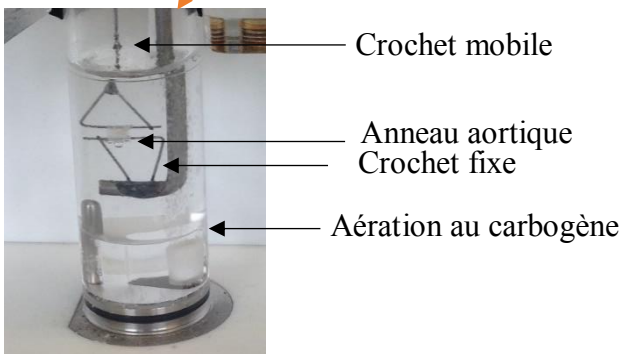
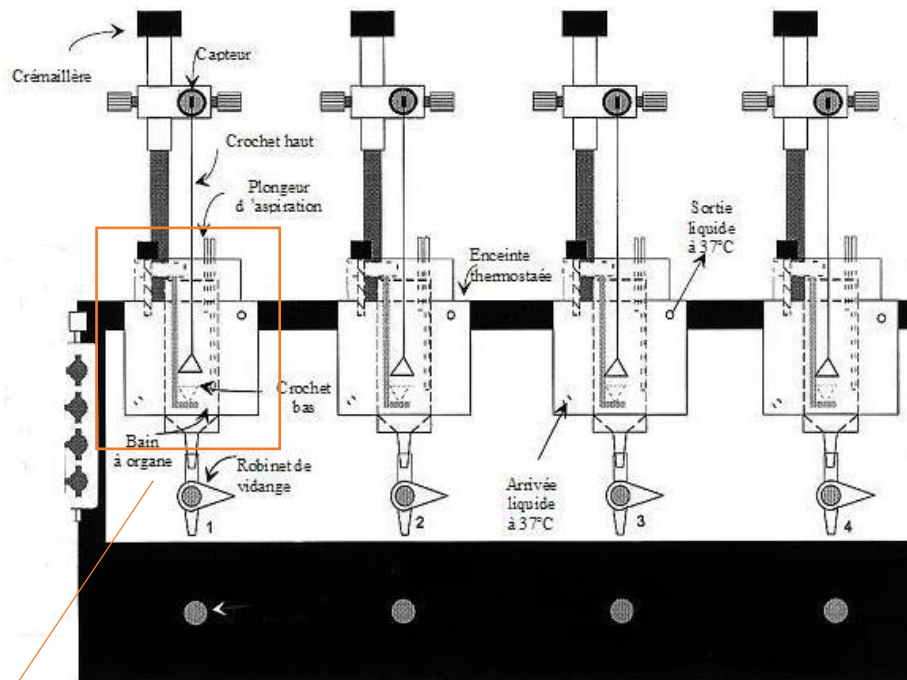
Rapidement après euthanasie des rats et prélèvement du cœur, l'aorte thoracique descendante est isolée, nettoyée du sang, des tissus conjonctifs et graisseux environnants et coupée en petits anneaux de 3 à 4 mm de long. Les anneaux sont par la suite suspendus sur des fils en acier inoxydable, et montés dans des cuves à organes isolés de 10 ml (Emka Technologies, Paris). Les cuves sont remplies d'une solution de Krebs préalablement préchauffée à 37°C grâce à un système de thermorégulation (**Tableau 5**) et continuellement aérée avec un mélange de 95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub> afin de maintenir un pH physiologique de 7,4 (**Figure 22**).

### 2.2 Montage

L'activité contractile des anneaux est enregistrée sous conditions isométriques. Ainsi, seule la variation de la tension sous l'influence des agents pharmacologiques est enregistrée, la longueur de l'anneau restant constante. L'anneau est relié à un crochet amovible. Ce crochet est relié à un capteur de force permettant de détecter les variations de tension. L'autre extrémité est reliée à un crochet fixe.



Les variations de la tension obtenues sont enregistrées grâce à un transducteur isométrique (Emka, Paris), puis enregistrés par un logiciel d'acquisition des données (iOX, emka). Le signal mécanique est transformé en signal graphique, informatique.



**Figure 22:** Schéma de montage des cuves à organes isolés permettant la construction de courbes concentration-réponses cumulatives avec anneaux d'aorte thoracique de rat.

### 2.3 Mesure de la réactivité vasculaire

Après le montage des anneaux dans les cuves, une période de stabilisation de 60 minutes est nécessaire avant de commencer la construction des courbes concentration- réponses cumulatives (CCRC). Pendant ce temps, les anneaux sont soumis à une augmentation de tension par palier de 0,5 g pendant une dizaine de minutes jusqu'à atteindre la tension basale de 2g. Un

rinçage avec la solution de Krebs est effectué entre les différents paliers. Puis, la viabilité de l'endothélium est vérifiée par l'évaluation de la relaxation de l'anneau à l'acétylcholine ( $10^{-6}$  mol/l) après une pré-contraction à la phényléphrine, un agoniste sélectif des  $R\alpha_1$ -A ( $10^{-6}$  mol/l). L'acétylcholine est un agoniste des récepteurs muscariniques. Ces récepteurs sont situés au niveau de la membrane plasmique des cellules endothéliales et leur stimulation entraîne une vasorelaxation. La relaxation de l'anneau doit être de 60% au minimum pour valider l'intégrité fonctionnelle de l'endothélium (Brahmadevara, Shaw, and MacDonald 2003 ; Trochu et al. 1999).

➤ Mesure de la contractilité vasculaire :

Après 30 minutes de rinçage au cours desquels, la tension des différents anneaux retrouve une tension basale de 2g, chaque anneaux est contracté avec des concentrations croissantes afin de construire une CCRC à la phényléphrine (de  $10^{-9}$  mol/l à  $10^{-5}$  mol/l) et d'évaluer ainsi la réponse vasoconstrictrice  $\alpha$ -1 adrénérgique.

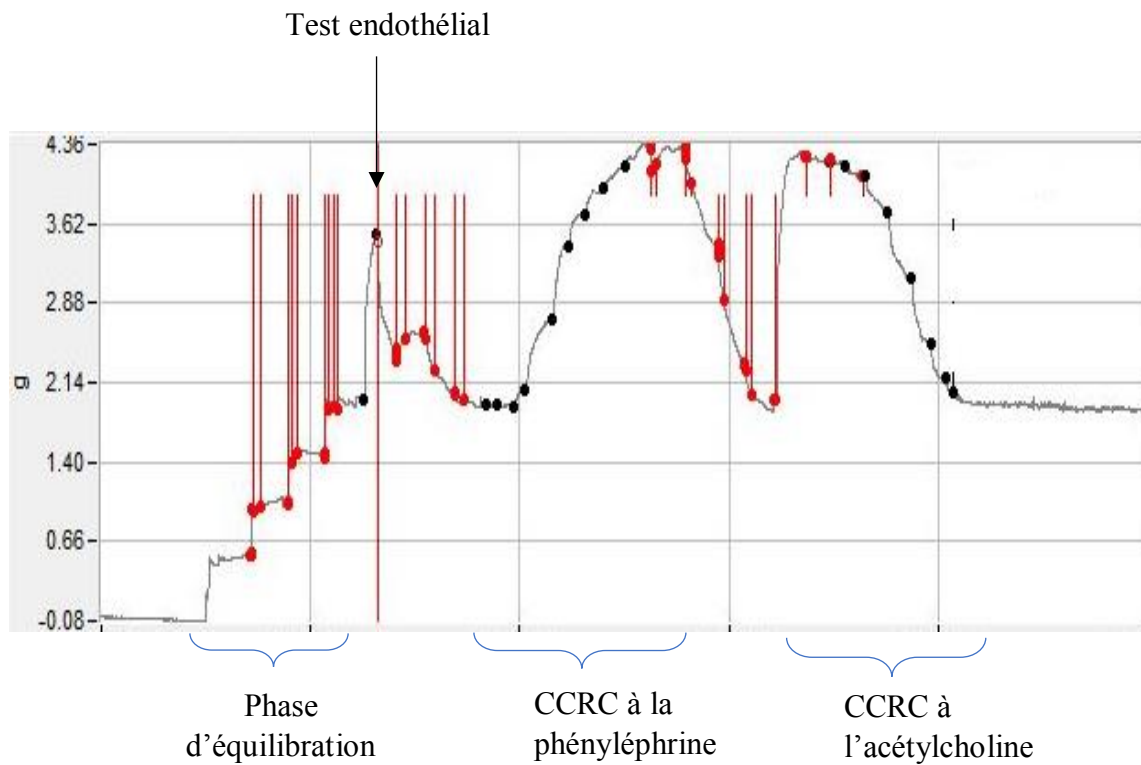
➤ Mesure de la relaxation vasculaire :

Une fois la CCRC à la phényléphrine construite, un lavages de 30 à 40 minutes nécessaire pour que l'anneau retrouve sa tension de base. Ensuite, l'anneaux est pré-contracté à la phényléphrine ( $10^{-6}$  mol/l) pendant une vingtaine de minutes jusqu'à atteindre un plateau. Des CCRC à l'acétylcholine ( $10^{-9}$  mol/l -  $10^{-5}$  mol/l) et à l'insuline ( $10^{-9}$  mol/l -  $3.10^{-6}$  mol/l) sont construites pour l'évaluation de la relaxation dépendante de l'endothélium et une CCRC au nitroprussiate de sodium (NPS) ( $10^{-10}$  mol/l- $10^{-7}$  mol/l) est construite pour l'évaluation de la relaxation indépendante de l'endothélium (**Figure 23**).

#### 2.4 Traitement des données

L'effet produit par chaque concentration de la molécule est mesuré après atteinte d'un plateau d'effet de 2 minutes. Les valeurs sont exprimées en grammes (g) pour les courbes de contraction de l'aorte à la phényléphrine et en pourcentage (%) pour les courbes de relaxation de l'aorte aux différents agents pharmacologiques. Le pourcentage de relaxation est calculé comme suit :

$\Delta$  (%) =  $100 - (((\text{valeur mesurée} - \text{valeur de tension basale}) / (\text{valeur de tension maximale après addition de phényléphrine} / \text{valeur de tension basale})) * 100)$



**Figure 23:** Schéma illustrant un exemple de tracé de CCRC à la phényléphrine et à l'acétylcholine construites sur des anneaux aortiques de SHR.

## 2.5 Agents pharmacologiques

La liste de toutes les substances pharmacologiques utilisées au cours de cette étude pour l'évaluation de la réactivité vasculaire sont présentées dans le tableau suivant (**Tableau 6**).

**Tableau 6:** Liste des substances pharmacologiques utilisées pour l'étude de la réactivité cardiovasculaire

Substances pharmacologiques (Fournisseurs)	Propriétés pharmacologiques	Solvant	Concentration utilisée
Chlorhydrate d'isoprénaline (Sigma)	Agoniste non sélectif des récepteurs $\beta$ -adrénergiques	Eau distillée + acide ascorbique 1%	1nM à 1 $\mu$ M
Chlorhydrate d'acétylcholine (Sigma)	Agoniste des récepteurs muscariniques et nicotiniques	Eau distillée	1nM à 10 $\mu$ M
Chlorhydrate de phényléphrine (Sigma)	Agoniste des récepteurs $\alpha_1$ -adrénergiques	Eau distillée	1nM à 10 $\mu$ M
Insuline humaine (Sigma)	Agoniste des récepteurs à l'insuline	Acide chlorhydrique (0.01 M)	1nM à 10 $\mu$ M
Nitroprussiate de sodium (Sigma)	Donneur de NO	Eau distillée	1nM à 0.1 $\mu$ M
Aminoguanidine (Sigma)	Inhibiteur de la NOS inducible	Eau distillée	100 $\mu$ M
BQ-123 (Sigma)	Antagoniste sélectif du récepteur ET <sub>A</sub> à l'endothéline	Des aliquots prêts à l'emploi	1 $\mu$ M

## V. Etude biochimique

A la 12<sup>ème</sup> semaine du protocole expérimental et après anesthésie des rats au pentobarbital sodique (50mg/kg), des prélèvements de sang (1ml) sont effectués par ponction cardiaque dans des Eppendorfs contenant une microgoutte d'héparine. Le sang prélevé est centrifugé à 5000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Le plasma ainsi obtenu est conservé à -80°C pour des dosages biochimiques.

L'aorte thoracique, le cœur et la graisse épидидymale sont soigneusement prélevés, séchés puis congelés dans de l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$  pour empêcher la dégradation du GMPc et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour des dosages ultérieurs.

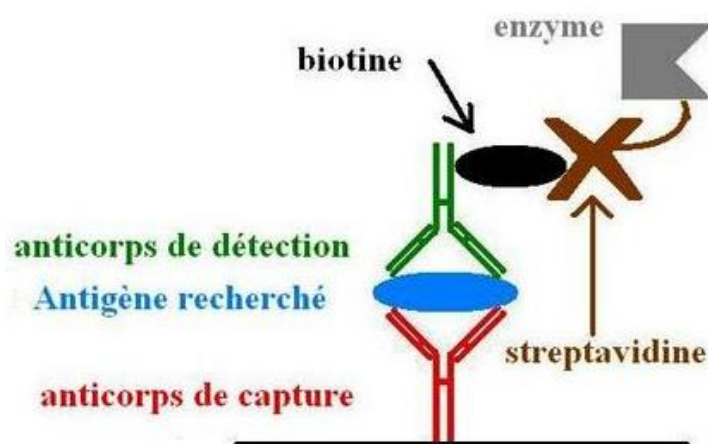
### 1. Evaluation du profil lipidique

Les dosages des triglycérides et du cholestérol total dans le plasma sont réalisés à l'aide de tests enzymatiques photométrique et colorimétrique respectivement (DiaSys Diagnostic System, Germany).

### 2. Détermination des concentrations en insuline dans le plasma

Les concentrations en insuline du plasma sont déterminées par la méthode immuno-enzymatique via un kit ELISA (Rat Insulin Kit ELISA, ThermoScientific, USA).

Le principe du kit Insulin ELISA est basé sur une réaction immuno-enzymatique en sandwich en phase solide. Les microplaques sont recouvertes avec un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène spécifique de la molécule insuline. L'insuline présente dans l'échantillon va se lier aux anticorps spécifiques qui recouvrent la microplaque. Après incubation, les éléments non liés seront éliminés durant les lavages des puits. Un second anticorps biotinylé va se lier à l'insuline fixée au premier anticorps. Après les lavages, les éléments non liés sont éliminés. L'ajout de la streptavidine-HRP va détecter l'anticorps biotinylé. Suite à l'addition d'une solution de substrat (TBM), la HRP va agir sur le TBM pour produire une réaction colorimétrique après acidification avec le STOP. L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la concentration d'insuline présente dans l'échantillon (**Figure 24**).

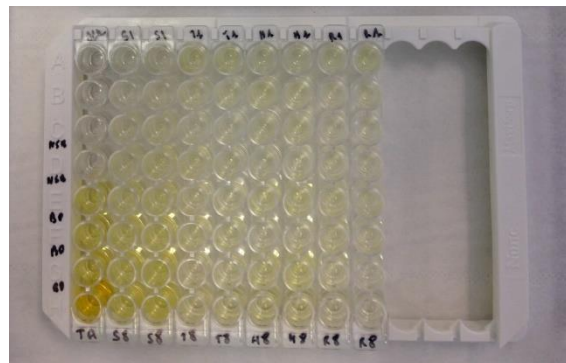


**Figure 24:** Schéma illustrant les différentes étapes du test ELISA.

### 3. Dosage du GMPc dans le tissu aortique, le cœur et la graisse épидидymale

Les anneaux de l'aorte thoracique, le cœur et la graisse épидидymale sont broyés et homogénéisés dans une solution froide d'acide trichloroacétique (TCA) à 6% puis centrifugés à 1500 g pendant 10 min à 4 ° C.

L'extraction de l'acide trichloroacétique est réalisée en lavant les fractions surnageantes trois fois avec une solution d'éther diéthylique saturée d'eau (5 volumes d'éther diéthylique pour 1 volume de surnageant). Le diéthyléther résiduel est évaporé en chauffant les échantillons à 70°C pendant 5 min. L'extrait séché est dissous dans un volume adéquat de tampon d'essai et les concentrations de GMPc de chaque échantillon sont mesurées par des dosages colorimétriques à l'aide d'un kit de dosage immuno-enzymatique (Cayman Chemical Company). L'absorbance de chaque échantillon est lue au spectrophotomètre à 405 nm (**Figure 25**). La valeur moyenne du GMPc est calculée à partir des mesures en double de chaque échantillon et rapportée aux concentrations totales de protéines cellulaires précédemment mesurées à l'aide d'un kit de réactifs de dosage de protéines (micro-BCA, Pierce Biotechnology, Rockford, USA).



**Figure 25:** Dosage immunoenzymatique ELISA.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du GMPc dans l'échantillon

### VI. Etude immunohistochimique

L'expression et la localisation des deux protéines, la NOS endothéliale et la NOS inducible sont étudiées dans l'aorte thoracique des rats des différents groupes.

Les étapes de fixation et de perméabilisation des tissus sont réalisées selon les protocoles de Bittencourt et al. (1992).

### 1. Fixation et inclusion des tissus

Rapidement après l'euthanasie des rats, des anneaux d'aorte thoracique nettoyés du tissu conjonctif, graisseux et du sang sont immergés dans 5ml de PBS-PFA 4% et placés à 4°C pendant 4heures. Ensuite un rinçage au PBS est effectué et les anneaux sont par la suite immergés dans 5ml de PBS sucrose 20% pendant 24heures à 4°C.

Le lendemain, les anneaux sont inclus en position verticale dans un milieu d'inclusion (« Shandon Cryomatrix ») puis rapidement congelés dans de l'isopentane liquide dont la température avoisine les -65°C.

Après congélation, les anneaux sont conservés à -80°C.

### 2. Coupe des tissus

Des coupes transversales de 10µM d'épaisseur sont réalisées au moyen d'un cryostat à une température de -20°C. Les lames sont par la suite conservées à -80°C.

### 3. Immunomarquage

Les coupes sont d'abord perméabilisées avec une solution de PBS contenant 0,5% Triton 100X pendant 5 minutes. Ensuite, elles sont incubées avec une solution de PBS contenant 0,5% Triton et 2% BSA pendant une heure à température ambiante. Cette étape permet de saturer les sites non spécifiques.

Les lames sont incubées avec les anticorps primaires de lapin / ou de souris (**Tableau 7**), dilués dans la solution de saturation pendant une nuit à 4°C. L'intégrité de l'endothélium est vérifiée en incubant les coupes avec un anticorps polyclonal de souris dirigé contre le facteur VIII (Von Willebrand) . Le lendemain, 5 rinçages de 3 minutes sont réalisés avec du PBS puis les coupes sont mises en contact des anticorps secondaires (**Tableau 7**) pendant une heure à température ambiante et à l'obscurité. Enfin, les coupes sont rincées 5 fois à raison de 3 minutes par rinçage avec du PBS puis montées entre lame et lamelle avec un milieu de montage aqueux adapté à la préservation de la fluorescence (MwioI, Calbiochem, SanDiego, CA, USA).

Le contrôle négatif des immunomarquages est réalisé en incubant les coupes avec les anticorps secondaires uniquement.

**Tableau 7:** liste des anticorps primaires et secondaires utilisés dans cette étude

<b>Anticorps</b>	<b>Dilution</b>
Les anticorps primaires	
Anti-NOS endothéliale Anticorps Monoclonal de souris classe Ig G1 Abcam	1/1000
<b>Anti-NOS inductible</b> Anticorps Polyclonal de lapin Abcam	1/100
<b>Anti-facteur Von Willebrand</b> Anticorps monoclonal de souris Abcam	1/1000
Les anticorps secondaires	
<b>Anti-IgG (H+L) de souris couplé à l'Alexafluor 647</b> Life Technologies	1/300
<b>Anti-IgG de lapin couplé à l'Alexafluor 555</b> Life Technologies	1/300

#### 4. Acquisition des images

Les images d'aorte sont réalisés en utilisant un Scanner de lames Axio Scan. Z1 (Zeiss, France) équipé de 4 lasers 405, 488, 561 et 633nm. Le laser à 488 nm a permis de visualiser l'auto-fluorescence des fibres élastiques, celui à 561 nm pour visualiser l'Alexa Fluor 555 (Facteur IIIV et la iNOS) et enfin celui à 633 nm pour visualiser l'Alexa Fluor 647 (la eNOS).

Toutes les acquisitions sont effectuées dans les mêmes conditions après réglage des paramètres pour une prise d'image optimale (**Figure 26**).

#### 5. Quantification du marquage de la eNOS et la iNOS dans l'aorte thoracique du rat

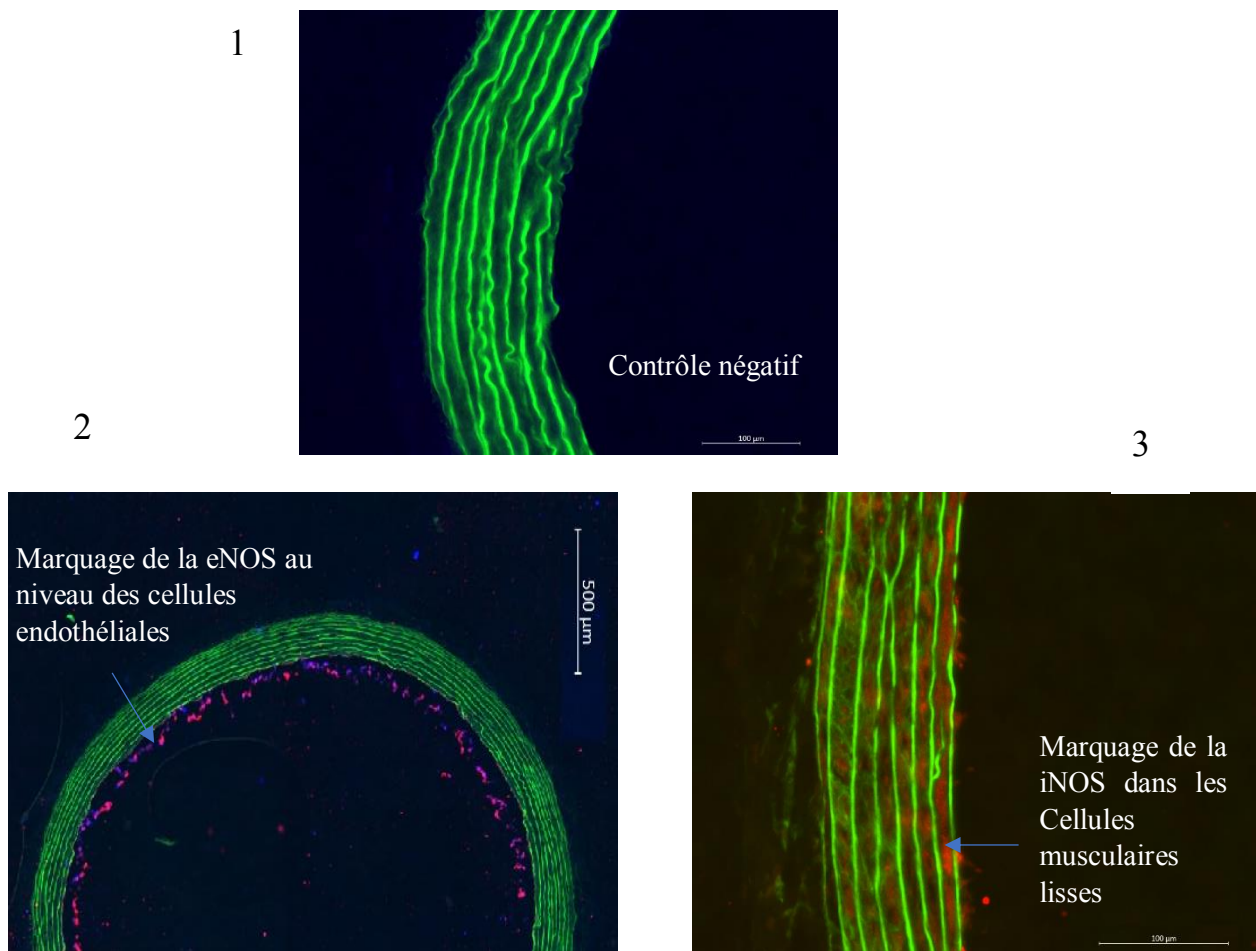
L'expression de la NOS endothéliale et de la NOS inductible dans les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales de l'aorte thoracique est quantifiée en mesurant l'intensité moyenne de la fluorescence (MFI) à l'aide du logiciel d'analyse d'image Fiji. Dans chaque condition, 5



images par coupe d'aorte sont analysées. Les images sélectionnées correspondent à 5 zones de la coupe indépendamment de l'intensité du marquage.

Pour chaque image, la quantification s'est effectuée de la manière suivante :

- Un seuillage du signal a été choisi en appliquant toujours la même valeur à chaque image afin de ne quantifier que le marquage spécifique de la eNOS et la iNOS ;
- La surface occupée par la fluorescence ainsi que la somme des intensités de fluorescence sont mesurées ;
- Enfin, l'intensité moyenne de fluorescence est calculée.



**Figure 26:** Image d'une coupe d'aorte thoracique (1) contrôle négatif, marquée avec un anticorps anti-NOS endothéliale (2) et avec un anticorps anti-NOS inducible (3).

## VII. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (S.E.M) où « n » correspond au nombre de rats étudiés.

Lorsque les S.E.M ne sont pas visibles sur les graphiques, cela signifie que les barres d'erreurs sont plus petites que le diamètre des symboles.

Les données de l'étude biochimique, des tests de tolérance au glucose ainsi que les valeurs basales des paramètres cardiaques sont comparées en utilisant le ANOVA à une voie pour comparaisons multiples. Dans la situation où des différences significatives entre les groupes sont observées, nous avons réalisé en complément un test Tukey. Ces tests sont effectués avec le logiciel PRISM®.

Concernant les graphes où les courbes ne montrent pas une allure de sigmoïde complète, la comparaison entre les groupes est réalisée par des modèles linéaires à effets mixtes (LME) (logiciel R). C'est la méthode d'analyse statistique adaptée au traitement des données de protocoles à mesures répétées. La comparaison entre les différents groupes se fait dans ce cas par la comparaison des pentes. La normalité des résidus et des effets aléatoires est vérifiée et validée pour chaque modèle au moyen de graphiques préconisés par les auteurs des modèles à effets mixtes.

Concernant les CCRC complètes réalisées sur les anneaux d'aorte, les courbes sont ajustées selon l'équation de Hill. L'effet maximal ( $E_{max}$ ), le facteur de Hill ( $\eta$ ), et la concentration induisant la moitié de la réponse ( $EC_{50}$ ,  $pD_2 = -\log EC_{50}$  : -logarithme de la concentration d'agoniste efficace pour induire 50% de la réponse maximale) des différentes courbes ont été calculées selon un modèle non linéaire à effet mixte (NLME) (logiciel R) (Thorin et al. 2010)

Ces analyses ont été réalisées avec le logiciel R (R Development Core Team, 2012).

Enfin, Les analyses statistiques portant sur les données de séquençage 16S, sont réalisées avec le logiciel R (R Core Team, 2019, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Le test statistique utilisé pour étudier la composition du microbiote fécal est le test de Mann Whitney suivant la méthode Benjamini and Hochberg (1995) pour les tests de comparaisons multiples. Les paramètres étudiés sont les différences d'abondance aux niveaux des phyla, familles et genres bactériens.

Quel que soit le modèle statistique utilisé, une valeur de  $p < 0.05$  est considérée comme statistiquement significative.

## Résultats

**Article 1: Sildenafil citrate long-term treatment effects on cardiovascular reactivity in a SHR experimental model of metabolic syndrome**

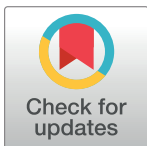
## RESEARCH ARTICLE

# Sildenafil citrate long-term treatment effects on cardiovascular reactivity in a SHR experimental model of metabolic syndrome

Yosra Doghri<sup>1\*</sup>, Fabien Chetaneau<sup>1</sup>, Moez Rhimi<sup>2</sup>, Aicha Kriaa<sup>2</sup>, Valérie Lalanne<sup>1</sup>, Chantal Thorin<sup>1</sup>, Emmanuelle Maguin<sup>2</sup>, M. Yassine Mallem<sup>1</sup>, Jean-Claude Desfontis<sup>1</sup>

**1** UPSP NP3 (2017.B146), Nutrition, Pathophysiology and Pharmacology, Oniris, College of Veterinary Medicine, Food Sciences and Engineering, Atlanpôle—La Chantrerie, Route de Gachet, 5 BP, Nantes, France, **2** UMR 1319 Micalis, INRA, Microbiota Interaction with Human and Animal Team (MIHA), AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

\* [yosra.doghri@oniris-nantes.fr](mailto:yosra.doghri@oniris-nantes.fr)



## Abstract

Much evidence indicates that metabolic syndrome is strongly correlated with a decrease in nitric oxide and an increase in oxidative stress leading to cardiovascular alterations. In recent years, gut microbiota has emerged as a new contributor to the metabolic syndrome establishment and associated cardiovascular diseases, but the underlying mechanisms remain unclear. We hypothesized that a positive modulation of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway, through phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibition could prevent cardiovascular alterations and gut dysbiosis that may be associated to metabolic syndrome. Spontaneously hypertensive rats (SHR) were randomly divided into 4 groups: control, *cafeteria diet* (CD) and sildenafil citrate treated groups (5mg/kg per os) were given either a CD or a standard chow diet for 10 weeks. Body weight, arterial blood pressure and glucose tolerance test were monitored. At the 10<sup>th</sup> week, cardiac inotropy and coronary perfusion pressure were evaluated on isolated heart according to Langendorff method. Cumulative concentration response curves to phenylephrine and acetylcholine were determined on thoracic aorta rings for vascular reactivity evaluation. Faecal samples were collected for the gut microbiota analysis. Compared to the control group, CD-fed rats showed a significant increase in body weight gain, arterial blood pressure and were glucose intolerant. This group showed also a decrease in  $\beta$ -adrenoceptor-induced cardiac inotropy and coronary vasodilation. Gut microbiota analysis revealed a significant reduction in the abundance of *Lactobocillus* spp in *cafeteria diet*-fed rats when compared to the control ones. Sildenafil citrate long-term treatment decreased weight gain and arterial blood pressure, improved coronary vasodilation and reduced  $\alpha_1$ -adrenoceptor-induced vasoconstriction in CD group. However, it did not reverse gut dysbiosis induced by chronic CD feeding. These results suggest that cGMP pathway targeting may be a potential therapeutic strategy for the management of the metabolic syndrome and associated cardiovascular disorders.

## OPEN ACCESS

**Citation:** Doghri Y, Chetaneau F, Rhimi M, Kriaa A, Lalanne V, Thorin C, et al. (2019) Sildenafil citrate long-term treatment effects on cardiovascular reactivity in a SHR experimental model of metabolic syndrome. PLoS ONE 14(11): e0223914. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223914>

**Editor:** Frank T. Spradley, University of Mississippi Medical Center, UNITED STATES

**Received:** May 15, 2019

**Accepted:** October 1, 2019

**Published:** November 7, 2019

**Copyright:** © 2019 Doghri et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information file.

**Funding:** The author(s) received no specific funding for this work.

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

## Introduction

Metabolic syndrome is a complex systemic disorder characterized by a cluster of inter-related factors including abdominal obesity, abnormal glucose metabolism, hypertension, insulin resistance, endothelial dysfunction and inflammatory reaction [1,2]. It's closely associated with the onset and development of cardiovascular diseases [3]. Recently, thermogenic, weight reducing and insulin sensitizing effects of phosphodiesterase 5 inhibitors have been reported, suggesting that a pharmacotherapy that elevates intracellular levels of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) might be a promising approach to treat metabolic disorders [4,5]. Sildenafil citrate marketed as Viagra® is the first phosphodiesterase-5 inhibitor that has been widely used for the treatment of erectile dysfunction [6]. However, to the best of our knowledge, its metabolic and cardiovascular effects in an experimentally-induced metabolic syndrome in rats are not well known yet.

To date, recent studies have proposed the potential role of gut microbiota as a pathogenic factor affecting host metabolic balance and contributing to the development of metabolic syndrome [7,8]. Normal gut microbiota harbors the greatest density of microorganisms in the adult body [9] with *Firmicutes*, *Bacteroidetes* and *Actinobacteria* constituting the main dominant phyla [10]. It plays a crucial role to ensure the host homeostasis through several pathways including: Digestion and absorption of nutrients, gut permeability maintenance and intestinal immune system maturation [10,11]. Its composition is strongly influenced by diet as confirmed by studies conducted both on humans and animal models [12]. An altered gut microbiota composition has been demonstrated to cause devastating pathophysiological consequences such as obesity, metabolic disorders or type 2 diabetes [13]. However, the underlying mechanisms remain unclear until now.

Considering the intimate connection between intestine function and gut microbiota [14], the role played by cyclic nucleotides (i.e. cGMP) in the control of gut motricity, gut nutrient absorption and fluid-ion secretion [15], and the possible deregulation of these pathways that may occur under metabolic disorders [16], gut microbiota might be expected to undergo some changes following treatment with the nucleotide cyclic modulators.

Thus, the aim of this study is to evaluate the effects of chronic sildenafil citrate treatment on cardiovascular reactivity in spontaneously hypertensive rats (SHR) developing an experimentally-induced metabolic syndrome. We also attempted to analyze whether gut microbiota composition may be modified by sildenafil citrate chronic treatment, with the hypothesis that it could reverse the potential gut dysbiosis that may occur during metabolic syndrome.

## Materials and methods

### Animals

The experiments were performed in 32 male SHR (nine-week-old). All rats were obtained from Janvier Labs (Le Genest St Isle, France) and housed under a 12-hour light/ dark cycle at a constant temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and humidity (50%). Rats were acclimatized for one week before starting the experiments and were allowed access to standard chow and drinking water *ad libitum*.

All protocols used in this study were approved by the the Institutional care and Use Committee of Pays de La Loire, France (APAFIS N° 2884) and were carried out in strict accordance with the guidelines for the care and use of laboratory animals.

### Experimental procedures

Rats were randomly divided into 4 groups ( $n = 8$  for each group): Control rats fed standard chow diet (4.5% total fat, 54.2% carbohydrates, 18.5% protein) (KLIBA NAFAG®),

Kaiseraugst, Germany), Control SHR treated daily with Sildenafil citrate (5mg/Kg) [17] for 10 weeks by gastric gavage. The last 2 groups included *cafeteria diet-fed* (CD) group and CD-fed rats treated daily with Sildenafil citrate (5mg/Kg) for 10 weeks.

For *cafeteria diet* groups, rats were allowed to have free access to either *cafeteria diet* (6 different commercial chocolate, cookie and cereal bars, consisting of 18.2% total fat, 68.3% carbohydrates, 5.48% protein) or standard chow diet for 10 weeks. Rats received only one high calorie food per day that was switched daily to promote hyperphagia.

During the experimental protocol, body weight and abdominal circumference of all rats were monitored weekly.

### Arterial blood pressure measurement

Systolic and diastolic blood pressures were determined using the tail-cuff plethysmography, at Baseline, during and at the end of the study protocol. This method allows non-invasive measurement of the arterial blood pressure in the tail of conscious rats using volume pressure recording sensor technology (CODA<sup>®</sup>, Kent Scientific, USA).

### Glucose tolerance test

Before sacrifice, a glucose tolerance test was performed on fasted rats for 20 hours. The rats received an intraperitoneal injection of a glucose solution (1g/kg).

Blood samplings (one blood drop) were performed for glucose measurements (glucometer, Pura<sup>®</sup>) on the rat's tail vein before and 15, 30, 45, 60 and 90 minutes after the glucose loading. The area under the curve (AUC) was then calculated using Prism software (GrapPadPrism 5.0).

### Blood analysis

Blood samples were centrifuged at 5000g for 10 min at 4°C. Plasma was then collected and stored at -80°C until analysis. Total cholesterol and triglycerides were determined by automated enzymatic kits.

### Isolated heart preparation

At the 10<sup>th</sup> week, rats were anesthetized with pentobarbital (54mg/kg i.p) and sacrificed by exsanguination of abdominal aorta. Hearts were quickly excised and put into a cold *Krebs-Henseleit* solution. The aorta was immediately cannulated and secured with a knot. The aortic cannula is connected with the Langendorff system allowing a retrograde perfusion of the heart at a constant flow rate of 12 ml min<sup>-1</sup>, with a *Krebs-Henseleit* solution previously filtered (0.2 μm filter funnel) and continuously oxygenated with 95% O<sub>2</sub>–5% CO<sub>2</sub> gas mixture [18]. *Krebs-Henseleit* solution composition in mM: NaCl, 118.3; KCl, 4.7; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; NaHCO<sub>3</sub>, 20; EDTA, 0.016; glucose, 11.1; and CaCl<sub>2</sub>, 2.5, (pH 7.4). Left ventricular pressure is measured via a water-filled latex balloon carefully inserted into the left ventricular after atrium incision. Both left ventricular balloon and aortic cannula were connected to a pressure transducer. Perfusion pressure and left ventricular pressure were assessed using a PowerLab recorder and LabChart 7.0 software (ADInstruments). In order to assess the cardiac function, cumulative concentration-response curves to isoproterenol (a non-selective β-adrenergic agonist) were constructed (1nM–1μM). Cardiac parameters have first been stabilized for 20 min with *Krebs-Henseleit* solution, then, the heart was perfused with each concentration of isoproterenol for 3 minutes. A washing with *Krebs-Henseleit* solution was done between each isoproterenol concentration. The heart's contractile activity was assessed by analyzing the left

ventricular developed pressure (LVDepP in mmHg), which was calculated as the difference between maximal systolic pressure and end-diastolic pressure whereas coronary vasodilation was assessed by analyzing perfusion pressure.

### Thoracic aorta preparation and vascular reactivity measurement

Descending thoracic aorta was rapidly isolated after exsanguination and placed in Krebs solution. The aorta is dissected, cleaned of fat and adherent connective tissue and cut into 3mm rings. Briefly, the rings were mounted in a 5ml organ bath containing *Krebs-Henseleit* thermostated at  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  [19]. The isometric tension variation of each ring was detected by an isometric tension sensor (EMKA Technologies, Paris, France) and recorded by data Acquisition software (Acknowledge 4.1, BIOPAC system, MP 150, CEROM, Paris France). After a 60-min of equilibration at a resting tension of 2g, the viability of the endothelium of the control group was confirmed by obtaining at least 60% relaxation to acetylcholine ( $1 \mu\text{M}$ ) in rings that had already been pre-contracted with phenylephrine ( $1 \mu\text{M}$ ), a selective  $\alpha_1$ -adrenoceptor agonist. In order to assess vascular reactivity, cumulative concentration-response curves (CCRC) to phenylephrine ( $1 \mu\text{M}$ –  $10 \mu\text{M}$ ) have been performed. After a wash out and reequilibration, rings were precontracted to 80% of the maximal phenylephrine-induced contraction. Once the contraction reached a plateau, a cumulative concentration-response curve to acetylcholine ( $1 \mu\text{M}$ – $10 \mu\text{M}$ ) was then constructed.

### Determination of cGMP production in thoracic aortic rings and epididymal fat

Immediately after the rats' sacrifice, thoracic aorta rings and epididymal fat samples were frozen in liquid nitrogen to prevent cGMP degradation and were kept at  $-80^\circ\text{C}$ . The samples were then treated with 6% cold trichloroacetic acid and centrifuged at 1500g for 10 min at  $4^\circ\text{C}$ . The supernatant fractions were extracted three times with water saturated diethyl ether (5 volumes of diethyl ether to 1 volume of supernatant). Residual diethyl ether was evaporated by heating samples to  $70^\circ\text{C}$  for 5 min. The dried extract was dissolved in an assay buffer and the cGMP concentrations were measured colorimetrically by use of an immunoenzymatic assay kit (Cayman Chemical Company). Absorbance was read on a spectrophotometer at 405nm. The mean value was calculated from duplicate measurements of each sample and normalized to total cell protein levels previously measured using a protein assay reagent kit (micro BCA-Pierce) [20].

### Gut microbiota analysis

Fecal samples were taken before and at the end of the experimental protocol from all rats. The samples were frozen in liquid nitrogen and stored at a temperature of  $-80^\circ\text{C}$ .

The V3-V4 region was amplified from purified DNA with the primers F343 (CTTTCC CTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG) and R784 (GGAGTTCAGACGT GTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT) using 30 amplification cycles with an annealing temperature of  $65^\circ\text{C}$ . The amplicon lengths were about 510 bp (the exact length varies depending on the species). Because MiSeq sequencing enables paired 250-bp reads, the ends of each read overlap and can be stitched together to generate extremely high-quality, full-length reads covering the entire V3-V4 region. Single multiplexing was performed using a home-made 6 bp index, which was added to the R784 primer during a second PCR with 12 cycles using the forward primer (AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTAC ACGAC) and the modified reverse primer (CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-index-GT GACTGGAGTTCAGACGTGT). The resulting PCR products were purified and loaded onto the Illumina MiSeq cartridge according to the manufacturer instructions. The quality of the



run was checked internally using PhiX, and for further analysis, each pair-end sequence was assigned to its sample using the previously integrated index.

## Drugs

Pentobarbital solution was purchased from CEVA santé animale (France); phenylephrine hydrochloride, acetylcholine chloride and isoproterenol were provided by Sigma Aldrich Chimie® (Saint Quentin-Fallavier, France), sildenafil citrate (Sandoz®) is a human medicine.

All drugs were prepared as stock solutions in distilled water.

## Statistical analysis

Results were expressed as a mean  $\pm$  SEM of *n* experiments, where *n* is the number of rats. Statistical analysis was performed using two-way analysis of variance for multiple group comparisons followed by Tukey post-hoc test where appropriate.

Measurement of body weight, abdominal circumference, arterial blood pressure and data from isolated perfused heart were evaluated by a linear mixed effect model (LME) using R software. Relaxation was expressed as the percentage relaxation of the phenylephrine-induced pre-contraction. Different CCRCs and their parameters (maximum effect:  $E_{max}$  and the negative logarithm of the concentration producing 50% of the maximum effect or  $pD_2$ ) were compared using a non-linear mixed effect model using R software (NLME) [21]. All graphs have been performed using (PRISM® software version 5).

Microbiome statistical analysis following rarefaction of all communities to even sampling depths, the abundances of all families were computed by agglomerating the OTUs assigned to those families. For each comparison between all groups, the difference of the microbiota composition at phylum, family and genus level were assessed using kruskal-wallis test with BH correction [22] for multiple comparisons.

$P < 0.05$  was considered to indicate a statistically significant difference.

## Results

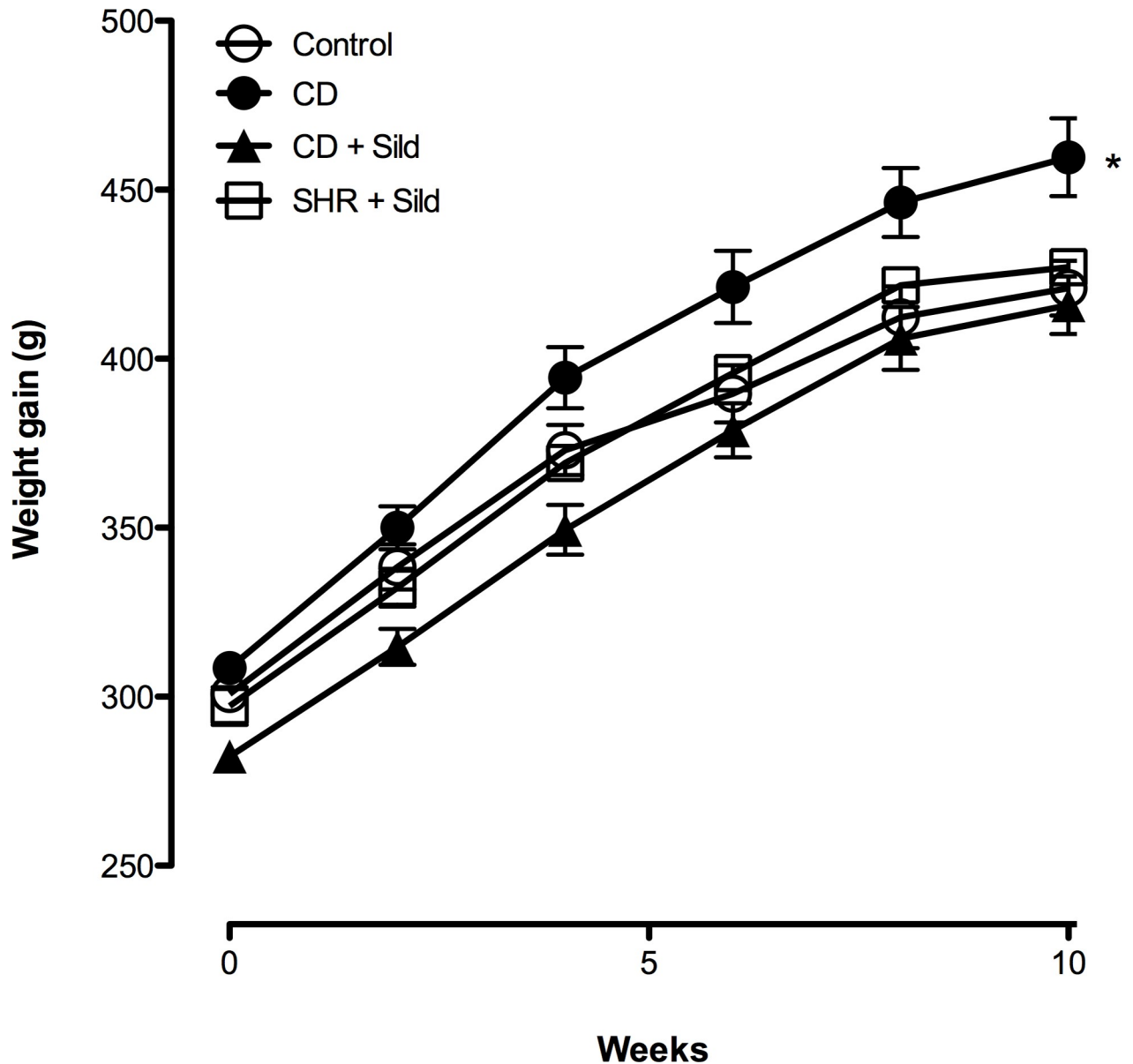
### Weight gain, arterial blood pressure, glucose tolerance and blood analysis

Within 10 weeks, CD feeding significantly increased the body weight of CD fed rats compared to the standard chow diet-fed group ( $151.3 \pm 11.4g$  Vs  $120.0 \pm 5.7g$ ) (Fig 1). This weight gain was associated with a significant increase in abdominal circumference and epididymal fat mass. Chronic sildenafil citrate treatment resulted in lower weight gain compared with untreated CD- fed rats (Fig 1).

CD-fed rats also presented elevated arterial systolic and diastolic blood pressure at the end point of the experiment ( $187.63 \pm 3.42$  mmHg Vs  $170.68 \pm 5.53$  mmHg,  $154.93 \pm 2.23$  mmHg Vs  $137.96 \pm 5.80$  arterial systolic and diastolic blood pressure in CD- fed group and control group respectively). Long-term treatment with sildenafil citrate significantly reduced blood pressure in both control and CD group. However, the decrease in sildenafil-induced arterial blood pressure was greater in the CD group than in the control group (Fig 2A and 2B).

Chronic cafeteria diet feeding showed enhanced elevation of blood glucose during glucose tolerance tests in comparison with control group (Fig 3). The increase reached its peak after 15 min followed by a delayed and slow decrease. On the other hand, sildenafil citrate long-term treatment significantly reduced fasting blood glucose ( $150.6 \pm 6.78$  mg/dl Vs  $111.8 \pm 9.98$  mg/dl in CD group and Sild + SHR respectively) and improved glucose intolerance only in the control group (Fig 3).

Blood analysis revealed that CD-fed rats had elevated fasting glucose level when compared to SHR sildenafil citrate treated ones with unchanged total cholesterol and triglyceride levels (Table 1).



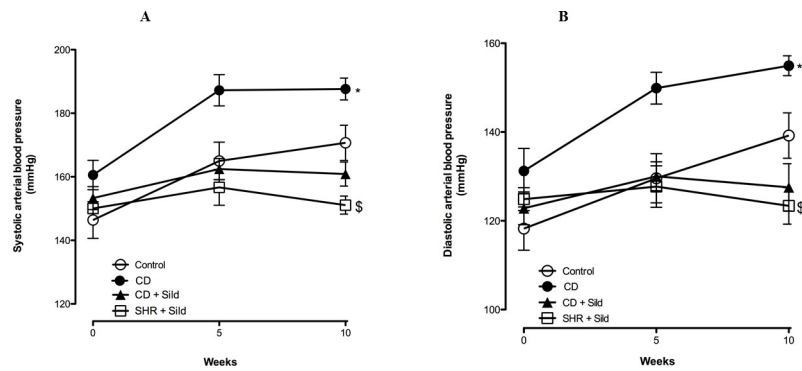
**Fig 1. Effect of Cafeteria diet (CD) and long-term treatment with Sildenafil Citrate (Sild) on body weight.** Compared to standard diet-fed rats, CD-fed group had a higher weight gain. Sildenafil citrate treatment reduced excessive weight gain. Data are represented as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  Vs control group using a LME model.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223914.g001>

### $\beta$ adrenoceptor stimulation on isolated perfused heart

To completely eliminate the effects of *in vivo* regulatory mechanisms on cardiac function, perfused hearts on Langendorff apparatus were used to examine intrinsic cardiac contractility and coronary perfusion pressure at baseline and after increasing concentrations of isoproterenol stimulation *ex vivo*. At baseline, cardiac contractility determined by LDevP, was significantly reduced in CD-fed rats when compared to the control ones ( $p = 0.003$ ) (Table 2). On the other hand, long-term treatment with sildenafil citrate restored this parameter to control values.

To determine the effects of  $\beta$ -adrenoceptor stimulation on cardiac contractility, different concentrations of isoproterenol were applied to the hearts. There were concentration-



**Fig 2. Effect of Cafeteria diet (CD) and long-term treatment with Sildenafil Citrate (Sild) on arterial blood pressure.** Rats fed CD for 10 weeks showed increased systolic arterial blood pressure (A) and diastolic blood pressure (B) when compared to rats fed a standard diet. Sildenafil citrate chronic treatment significantly reduced blood pressure in both control and CD group. Data are represented as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  Vs control or CD + Sild \$ $p < 0.05$  Vs control compared by a LME model.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223914.g002>

dependent increases of cardiac inotropy in all groups. However, the isoproterenol-induced positive inotropic effect was significantly attenuated in CD-fed rats ( $p = 0.009$ ) compared to the control SHR group (Fig 4A) suggesting an alteration of the  $\beta$ -adrenergic response in this group.

On the other hand, isoproterenol induced a concentration-dependent coronary vasodilation in all groups. This effect was significantly reduced in CD-fed SHR compared to the control group ( $p = 0.017$ ) (Fig 4B).

Sildenafil citrate long-term treatment significantly improved cardiac positive inotropy ( $p = 0.016$ ) and coronary vasodilation ( $p < 0.001$ ) in control SHR in comparison with untreated CD group, but only improved coronary vasodilation in CD-fed group ( $p = 0.026$ ) (Fig 4).

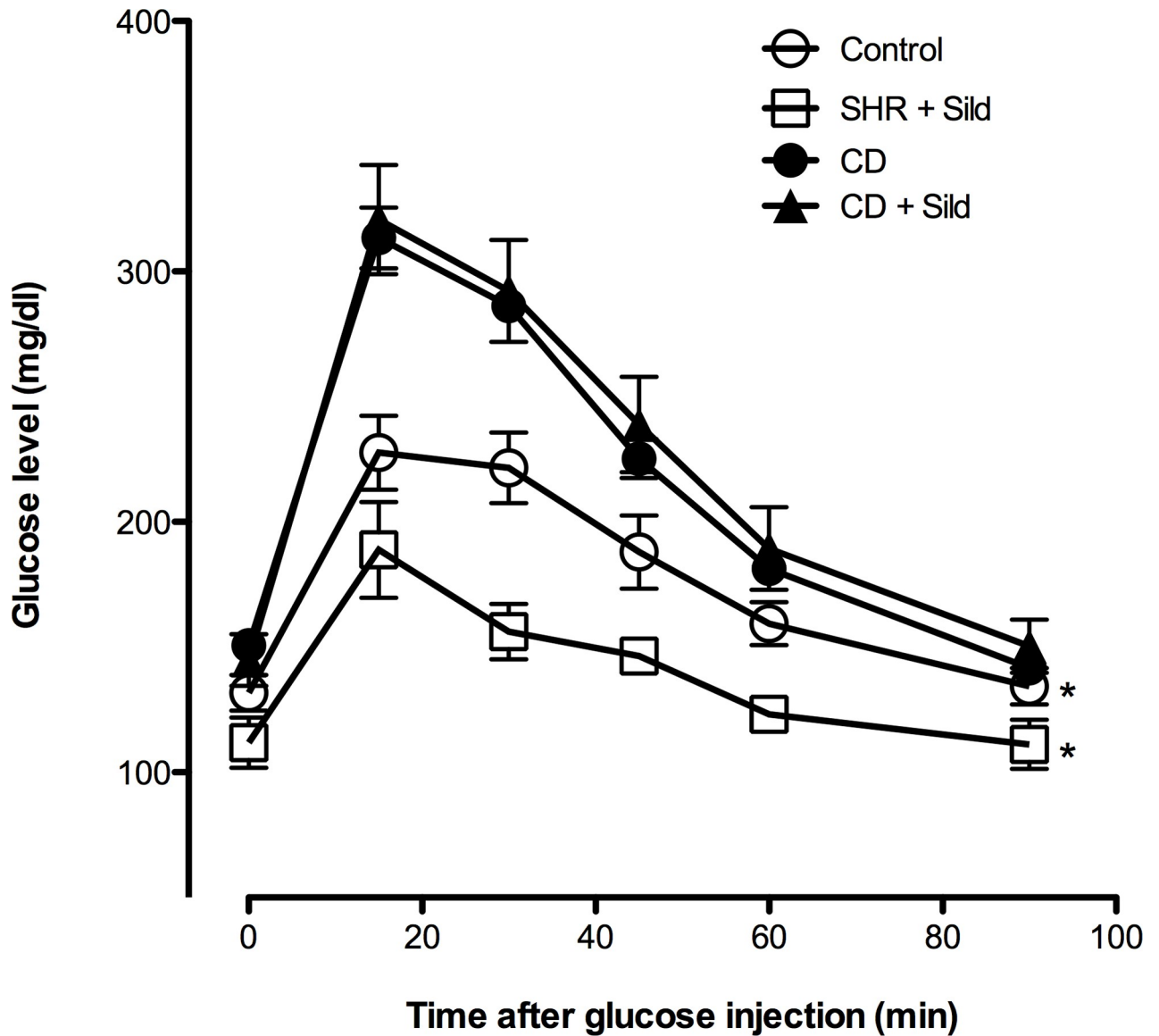
## Vascular reactivity

In this study, we examined the effect of sildenafil citrate chronic treatment on the aortic contractile response to phenylephrine, a selective  $\alpha_1$ -AR agonist. The CCRC to phenylephrine obtained in isolated aortic rings of CD group treated with sildenafil citrate was significantly shifted to the right and the bottom when compared to the control rats (Fig 5A; Table 3). Surprisingly, phenylephrine-induced maximal contractile response ( $E_{max}$ ) and  $pD_2$  value were significantly higher in aortic rings isolated from SHR treated with sildenafil citrate than control rats (Table 3, Fig 5A). However, there was no change neither in the maximal contractile response nor in  $pD_2$  value between control and CD group.

The cumulative dose response curves to acetylcholine-induced endothelium-dependent vasorelaxation are shown in (Fig 5B). Vasorelaxation response to acetylcholine did not show any significant difference either by cafeteria diet feeding or sildenafil citrate treatment, indicating that vasodilator action of acetylcholine was not impaired in thoracic aortic rings SHR. However, the maximal relaxation in response to acetylcholine was slightly higher in CD-fed rats treated with sildenafil citrate.

## cGMP levels

cGMP intracellular concentrations were determined in thoracic aortic rings. There was a slight decrease in cGMP levels but not statistically significant, in both thoracic aorta and epididymal fat samples, in Cafeteria diet- fed group compared to the control group. No difference was observed in sildenafil citrate treated rats either (Table 4).



**Fig 3. Effects of cafeteria-diet feeding and sildenafil citrate treatment on blood glucose concentrations during glucose tolerance test.** Blood glucose concentration measured during an intraperitoneal glucose tolerance test performed on fasted rats at the end of the 10<sup>th</sup> week of the protocol. AUC compared with CD group by two-way ANOVA followed by Tukey's Post hoc test \**p* < 0.05.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223914.g003>

**Table 1. Blood analysis.**

	Control	SHR + Sild	CD	CD + Sild
Blood glucose (mg/ dl)	131.8±7.17	111.8±9.98 *	150.6±6.78	144.9±10.3
Total cholesterol (g/l)	0.99±0.04	0.83±0.05	0.89±0.02	0.89± 0.017
Triglyceride (g/l)	0.896±0.11	0.86-±0.08	0.947± 0.06	1.038±0.1

Fasting blood glucose, plasmatic total cholesterol and triglyceride measured at the end of the protocol. Data are expressed as mean ±SEM.

\**p* < 0.05 compared with the CD group by two-way ANOVA test followed by Tukey's Post hoc test when appropriate.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223914.t001>

**Table 2. Basal values of cardiac inotropy and coronary perfusion pressure.**

	Control	CD	CD + Sild	SHR + Sild
LVDevP (mmHg)	78.27 ± 5.83 *	48.08 ± 5.38	73.79 ± 4.69 *	56.25 ± 2.006
Coronary perfusion pressure (mmHg)	31.43 ± 2.41	27.23 ± 3.22	31.98 ± 3.61	35.87 ± 3.12

Data are represented as mean ±SEM. \* $p < 0.05$  Vs CD

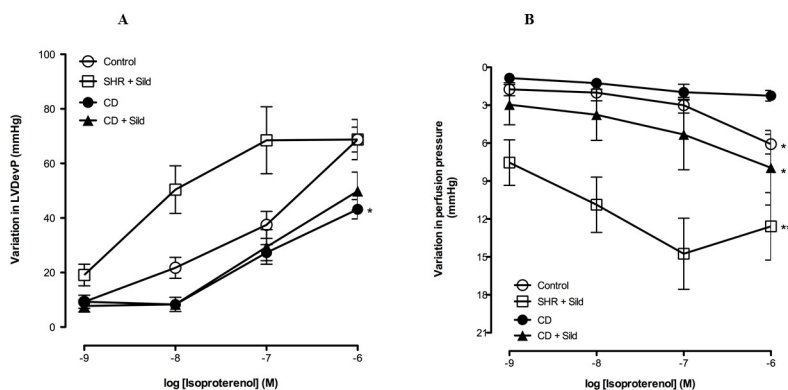
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223914.t002>

### Gut microbiota analysis

Several studies performed on animals and humans have reported a link between gut microbiota composition and components of the metabolic syndrome. In our study, gut microbiota analysis revealed the presence of the main phyla such as *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* and *Proteobacteria* in all rats. Thus, cafeteria diet feeding for 10 weeks did not alter the gut communities at the phylum level. However, we observed significant differences in the abundance of some bacterial families. The gut microbiota analysis showed that cafeteria diet-fed rats had less abundance of *Rikenellaceae* ( $p = 0.029$ ) and *Lactobacillaceae* ( $p = 0.019$ ) than control SHR. On the other hand, the sildenafil citrate long-term treatment did not restore gut dysbiosis induced by chronic cafeteria diet feeding (Fig 6).

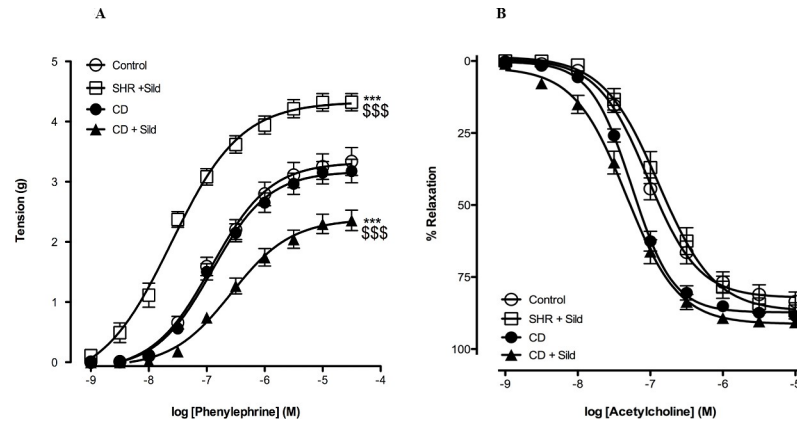
### Discussion

In the present study, we showed that 10 weeks of CD induced metabolic syndrome in rats by causing abdominal obesity, glucose intolerance and arterial hypertension. These results are consistent with the findings of Miesel et al. [23] who demonstrated that cafeteria diet-fed SHRs feature arterial hypertension, obesity and an altered glucose levels in response to the oral glucose tolerance test (OGTT), mimicking the human metabolic syndrome. CD consists mainly of a palatable diet with a more balanced caloric composition that resembles a Western diet. These disorders are also found in other studies of diet-induced metabolic syndrome models [24]. Miesel et al. [23] showed that SHR became hyperlipidemic when fed with cafeteria diet. Our findings regarding the cholesterol and triglyceride levels of SHR were in consistency with the results of Rehakova et al. [25]. However, in our study, rats did not develop dyslipidemia



**Fig 4. Effects of cafeteria-diet feeding and sildenafil citrate treatment on cardiac function.** Cardiac inotropy (A), coronary vasodilatation (B). Compared to control rats, CD-fed rats showed reduced cardiac inotropy and coronary vasodilatation. Sildenafil citrate treatment significantly improved cardiac inotropy and coronary vasodilatation in control SHR but only improved coronary vasodilatation in CD-fed rats. LVDevP: left ventricular developed pressure, CD: Cafeteria diet. Values are expressed as mean ±SEM. (A) \* $p < 0.05$  CD Vs Control, SHR+Sild (B) \* $p < 0.05$  CD Vs Control, CD + Sild, \*\*\*  $p < 0.001$  CD Vs SHR + Sild.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223914.g004>



**Fig 5. Effect of cafeteria diet feeding and sildenafil citrate treatment on vascular reactivity.** Cumulative concentration response curve (CCRC) to phenylephrine in thoracic aortic rings isolated from all groups (A), Concentration-response curves to acetylcholine in thoracic aortic rings precontracted with phenylephrine (B). Data are represented as mean  $\pm$ SEM. \*\*\*  $p < 0.001$  Vs Control / CD group for Emax. \$\$\$  $p < 0.001$  Vs Control / CD group for  $pD_2$  compared by NLME model.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223914.g005>

over the feeding periods. It has already been shown that SHR generally do not develop hypercholesterolemia and hyperlipidemia unless they are exposed to a special diet such as high-cholesterol or high-fructose high-fat diet [26]. The absence of dyslipidemia in rats despite the high caloric diet could well be due to the fact that cholesterol transport through the vascular wall and reverse cholesterol transport is so efficient in rats that it prevents the development of severe hypercholesterolemia [27].

Sildenafil citrate long-term treatment reduced body weight gain and visceral fat in CD-fed rats. The present results are consistent with those of Ayala et al. [4] who showed that treatment with sildenafil for 12 weeks prevented excessive weight gain in high fat-fed mice by preventing diet-induced energy imbalance. Moreover, Ryu et al. [28] showed that PDE5 inhibitor treatment was able to suppress inflammatory markers expression that play a critical role in the induction of obesity. Thus, long-term sildenafil citrate treatment may reduce weight gain by different mechanisms than fat cell lipolysis. This would explain epididymal fat cGMP levels not significantly different between untreated and sildenafil citrate-treated rats.

Even though the CD did not induce fasting hyperglycemia in our experimental conditions, the CD-fed group presented impaired glucose tolerance as previously reported [29]. Although 10 weeks of chronic sildenafil citrate treatment significantly reduced weight gain and abdominal obesity in the CD-fed SHR, the impairment of glucose tolerance was not attenuated. It has been shown in previous studies that long-term PDE5 inhibition plays a role in countering the effects of high-fat diet-induced insulin resistance and improving pancreatic  $\beta$ -cell function as assessed by oral glucose tolerance testing [4,30]. However, almost all studies were either conducted on lean animals or before the onset of insulin resistance which could explain the lack of

**Table 3.  $pD_2$  and  $E_{max}$  of phenylephrine responses in aortic rings isolated from all groups.**

	Control	SHR + Sild	CD	CD + Sild
$E_{max}$	3.27 $\pm$ 0.21	4.17 $\pm$ 0.16 ***	3.14 $\pm$ 0.18	2.35 $\pm$ 0.17 ***
$pD_2$	6.87 $\pm$ 0.04	7.69 $\pm$ 0.09 ***	6.84 $\pm$ 0.04	6.54 $\pm$ 0.06 ***

Values are means  $\pm$ SEM.

\*\*\*  $p < 0.0001$  compared with the control group by NLME model

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223914.t003>

**Table 4. Intracellular cGMP levels in thoracic aortic rings and epididymal fat samples.**

	cGMP (pmol/mg protein) Thoracic aorta	cGMP (pmol/mg protein) Epididymal fat
Control group	15.67 ±2.26	1.86 ±0.65
CD-fed group	11.04 ±2.30	0.86 ± 0.17
CD group treated with sildenafil citrate	9.63 ± 1.45	1.22 ± 0.19

Data are represented as mean ±SEM

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223914.t004>

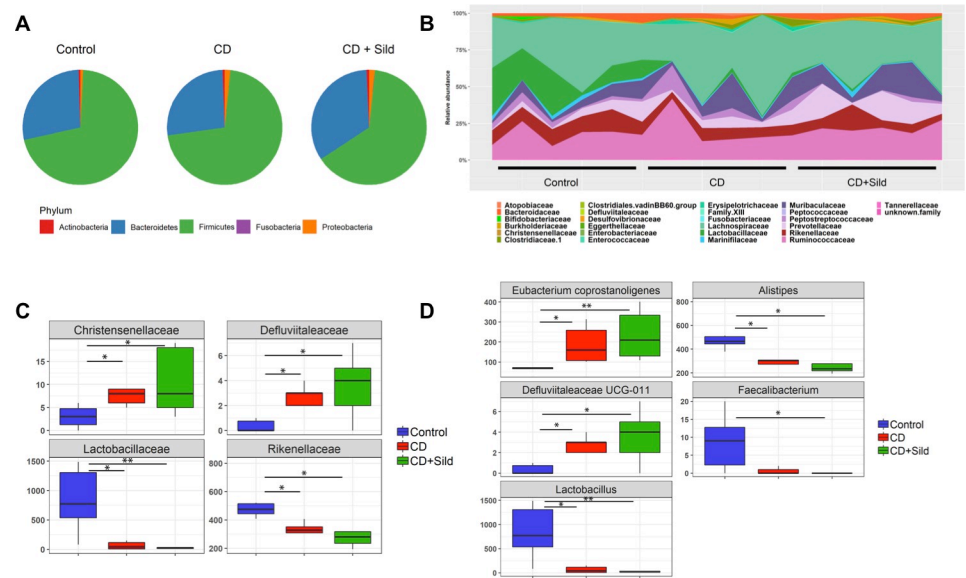
glucose intolerance improvement observed in our study. The resulting effects of sildenafil citrate treatment may differ between healthy and pathological states [5]. Our results support this hypothesis since sildenafil citrate chronic treatment significantly restored glucose metabolism in standard chow diet-fed rats.

It is already well known that obesity is characterized by sympathetic nervous activation [31] which in turn may induce  $\beta$ -adrenergic receptor dysregulation [32]. In the present study, we aimed to compare the effects of  $\beta$ -adrenoceptor stimulation in SHR, CD-fed rats and in sildenafil citrate treated rats that were exposed to either CD or standard chow diet, using Langendorff method on isolated heart. We precisely assessed the effects of  $\beta$ -adrenergic stimulation on cardiac inotropy and coronary arteries vasodilation through LVDevP evaluation and perfusion pressure variations respectively. Our data showed a significant decrease in the positive inotropic effect of  $\beta$ -adrenoceptor stimulation as well as a significant decrease in coronary vasodilation in CD-fed rats. The mechanisms underlying impaired  $\beta$ -responsiveness remain unclear. It's not well known whether this attenuated response to isoproterenol stimulation is due to decreased expression of  $\beta$ -adrenoceptors [33], to altered  $\beta$ -adrenergic signaling pathways or to impaired  $\text{Ca}^{2+}$  handling [34,35]. Only complementary studies could allow to better understand these divergent findings.

In the current study, we did not show any change neither in cardiac inotropy nor in coronary vasodilation between SHR group treated with sildenafil citrate and control group. However, we showed that chronic sildenafil citrate treatment significantly restored coronary vasodilation, and slightly although not significantly ameliorated cardiac inotropy in CD group suggesting that chronic PDE5 inhibition was able to prevent cardiac alteration due to the metabolic syndrome.

Several studies have previously demonstrated that long-term PDE5 inhibition resulted in a lower adrenergic vasoconstrictive response of the vascular bed [36]. Unexpectedly, the present results showed a leftward shift of the phenylephrine curve in aorta from sildenafil citrate-treated SHRs. According to the work of Teixeira-da-Silva et al.[36], treatment with sildenafil citrate reduced phenylephrine-induced contraction in aortic rings taken from SHR. However, in that study, the authors used the dose of 45mg/kg for 60 days which is 9 times higher than that used in our study. Moreover, all rats were treated before the onset of the hypertensive state while rats included in our protocol were hypertensive from the start of the experiments. The increase in  $E_{\text{max}}$  and  $\text{pD}_2$  values of phenylephrine in aortas from sildenafil citrate-treated SHR may suggest an increased  $\alpha_1$ -AR density and /or sensitivity that was likely developed to offset the effect of prolonged PDE5 inhibition. Interestingly, we found that the phenylephrine-induced vasoconstriction was reduced by sildenafil citrate treatment in CD-fed group, suggesting that compensatory mechanisms linked to metabolic syndrome might have been developed in CD-treated rats to limit the phenylephrine hyper-responsiveness observed in control SHRs. From these results, it can be suggested that PDE5 inhibition, under our experimental conditions, plays a functional role by modulating aortic reactivity probably *via* a change in cGMP





**Fig 6. Gut bacterial community analysis by 16S rRNA gene high-throughput sequencing.** (A) Composition of abundant bacterial phyla identified in the microbiota of the three different groups. (B-C) Different bacterial families in each sample among Control, CD and CD+Sild groups. (D) Various bacterial genera in each sample among each group of rats. Data are presented as box plots. ‘\*’ and ‘\*\*’ indicate a significant difference ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  respectively).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223914.g006>

intracellular level. Since sildenafil citrate treatment is expected to increase intracellular cGMP level, it was reasonable to compare tissular aortic cGMP content between untreated and treated rats with sildenafil citrate. Our results showed vascular cGMP levels in the same range as those reported in previous studies [37]. But unexpectedly, we failed to detect any significant accumulation of vascular cGMP in aortic rings from sildenafil citrate-treated rats. This result suggests that the change of aortic rings response to phenylephrine observed in our study may result from other mechanisms of action than direct inhibition of PDE5, as described elsewhere, PDE5 inhibition, during sildenafil citrate treatment has coordinated stimulatory action on both cAMP and cGMP signaling pathways [38].

In the present work we showed that sildenafil citrate prevented the development of arterial hypertension in both control-treated and CD-treated group. Although the mechanism involved in this finding has not been specifically addressed, reduction in vascular resistance could be considered as a contributing mechanism accounting for the ability of sildenafil citrate to limit the development of arterial hypertension. Proximal resistance vessels such as the mesenteric arteries, contribute substantially to the peripheral resistance and play an important role in the maintenance of arterial pressure. It has already been shown that both PDE5 expression and activity were significantly higher in mesenteric arteries in SHR rats when compared to normotensive rats, and that sildenafil citrate was able to suppress PDE5 activity in these arteries [39].

Interestingly we found that the prevention of the time-dependent increase of arterial hypertension by sildenafil citrate treatment was more marked in the CD group than in the control one. The reason of this discrepancy is not readily apparent. The extent of drugs-induced anti-hypertensive effect has been reported to closely depend upon the level of blood pressure [40,41]. Thus, it is not unlikely to postulate that differences in sildenafil citrate effect observed in our study might be due to the level of blood pressure and/or the pre-existing level of cardiovascular alterations (*i.e. increase of sympathetic tone*) that could have been developed during



the metabolic syndrome in CD group. We cannot however rule out the possibility that the difference observed between control-treated and CD-treated group could involve the ability of sildenafil citrate to reduce blood pressure by additional mechanisms that may occur independently of its vascular effects. In support of this assumption, sildenafil was reported to exert its effect on blood pressure by reducing angiotensin II levels and restoring the baroreflex sensitivity [42].

Conversely to previous report describing a decreased NO bioavailability in vascular wall of adult SHR [43], our study did not reveal any alteration in acetylcholine-induced vasorelaxation neither in control rats nor in CD-fed rats. We did not observe significant change in intracellular cGMP levels between the different groups as previously mentioned, suggesting that CD feeding did not induce endothelial dysfunction in SHR aorta. The lack of impairment of the endothelium-dependent relaxation observed in our experimental conditions, does not necessarily confirm the absence of endothelial dysfunction. It may be possible that rats were only in a very stage of the pathology development and that duration of the diet may not be severe enough to exhibit the impaired response to acetylcholine [44]. Nonetheless, Berenyiova et al. [45] showed that SHR develop an adaptive mechanism to preserve NO-dependent vasorelaxation and NOS activity level.

Gut microbiota is emerging during the last decade, as a new major contributor to the development of metabolic syndrome. Different studies have already shown that diet-induced metabolic syndrome is associated with decreased gut microbiota diversity and richness. In this context, several studies have reported that *cafeteria diet* feeding induces large gut microbiota changes with a significant reduction in *Bacteroidetes* and a corresponding increase in *Firmicutes* [46,47]. The shift in the relative abundance in these phyla has been proposed as linked to the increased capacity to harvest energy from food and with increased low-grade inflammation [48]. Conversely to those findings, our data did not reveal marked changes in the gut microbiota composition at the phylum level after chronic CD feeding. These discrepancies could be attributed to the difference in the strain of rats used. In fact, in the previously mentioned studies, the experiments were conducted on normotensive rats whereas in our study we worked on the SHR. In this regard, Yang et al. [49] has reported a significant decrease in gut microbiota diversity, richness and evenness in SHR when compared to normotensive rats, in addition to an increased *Firmicutes* to *Bacteroidetes* ratio. That study has also shown a decrease in acetate- and butyrate-producing bacteria in SHR. Therefore, the preexistence of a gut dysbiosis in the SHR may hide the impact of the CD on the gut microbiota composition at the phylum level. Nonetheless, other studies have found no differences either between *Firmicutes* and *Bacteroidetes* at the phylum level [48]. However, our study showed significant differences at the family and species level between groups. Indeed, we observed a remarkable decrease in *Lactobacillus* spp in *cafeteria diet*-fed rats when compared to control ones. These results are consistent with findings of Lecomte et al. [50] who showed a reduction in the abundance of the *Lactobacillus* species in a rat model of metabolic syndrome. This reduced abundance of *Lactobacillus* species has been shown to be negatively correlated with fat mass and body weight. Moreover, according to Lecomte et al. [50], lactobacilli play a critical role in preserving intestinal barrier integrity through maintenance of cell-to-cell junctions. Thus, a lower abundance of this species is assumed to promote the passage of endotoxins such as lipopolysaccharides into the bloodstream increasing the proinflammatory molecules release and maintaining insulin resistance [51]. Furthermore, it has been reported in previous study that long-term ingestion of *Lactobacillus* spp was able to enhance lipolysis and to reduce body weight as well as abdominal fat weight [52]. Collectively, these findings may involve a role of *Lactobacillus* spp in promoting the metabolic syndrome development. To the best of our knowledge, our study is the first to investigate the effects of sildenafil citrate long-term treatment on gut microbiota composition.

Although, long-term sildenafil citrate treatment prevented excessive weight gain in CD-fed rats, it did not reverse gut dysbiosis induced by chronic CD feeding. Yet, it has been shown that cGMP is considered as a key factor in regulating the immune function in the intestine and in maintaining the intestinal barrier integrity [15]. It would be likely that the duration of sildenafil citrate treatment may not have been sufficient to modify gut microbiota composition of treated rats. Further studies are necessary to better understand the interaction between gut microbiota and sildenafil citrate treatment.

In conclusion, the current study demonstrated that CD feeding induced metabolic abnormalities, an impairment of cardiac contractility and decreased several bacterial species of the gut microbiota, especially *Lactobacillus* spp. in SHR. Chronic treatment with sildenafil citrate showed metabolic protective effects in our rat model of metabolic syndrome. However, its beneficial effects on cardiovascular activity are less evident. The potential of PDE5 inhibition as a pharmacotherapeutic option in the treatment of metabolic syndrome warrants further investigation.

## Author Contributions

**Conceptualization:** M. Yassine Mallem.

**Data curation:** Chantal Thorin.

**Formal analysis:** Yosra Doghri, Moez Rhimi, Aicha Kriaa, Valérie Lalanne.

**Investigation:** Yosra Doghri, Fabien Chetaneau, M. Yassine Mallem.

**Methodology:** Yosra Doghri, M. Yassine Mallem.

**Project administration:** Jean-Claude Desfontis.

**Software:** Moez Rhimi, Chantal Thorin.

**Supervision:** M. Yassine Mallem, Jean-Claude Desfontis.

**Validation:** Chantal Thorin, Emmanuelle Maguin, M. Yassine Mallem, Jean-Claude Desfontis.

**Visualization:** Emmanuelle Maguin, Jean-Claude Desfontis.

**Writing – original draft:** Yosra Doghri, M. Yassine Mallem.

**Writing – review & editing:** Jean-Claude Desfontis.

## References

1. Weiss R, Bremer AA, Lustig RH. What is metabolic syndrome, and why are children getting it? *Ann N Y Acad Sci.* 2013 Apr; 1281:123–40. <https://doi.org/10.1111/nyas.12030> PMID: 23356701
2. Rentoukas E, Tsarouhas K, Kaplanis I, Korou E, Nikolaou M, Marathonitis G, et al. Connection between telomerase activity in PBMC and markers of inflammation and endothelial dysfunction in patients with metabolic syndrome. *PLoS ONE.* 2012; 7(4):e35739. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035739> PMID: 22558213
3. Ahirwar AK, Jain A, Singh A, Goswami B, Bhatnagar MK, Bhattacharjee J. The study of markers of endothelial dysfunction in metabolic syndrome. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2015 Dec; 24(3):131–6. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2015-0039> PMID: 26516933
4. Ayala JE, Bracy DP, Julien BM, Rottman JN, Fueger PT, Wasserman DH. Chronic treatment with sildenafil improves energy balance and insulin action in high fat-fed conscious mice. *Diabetes.* 2007 Apr; 56(4):1025–33. <https://doi.org/10.2337/db06-0883> PMID: 17229936
5. Johann K, Reis MC, Harder L, Herrmann B, Gachkar S, Mittag J, et al. Effects of sildenafil treatment on thermogenesis and glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Nutr Diabetes.* 2018 Mar 13; 8(1):9. <https://doi.org/10.1038/s41387-018-0026-0> PMID: 29549244

6. Goldstein I, Tseng L-J, Creanga D, Stecher V, Kaminetsky JC. Efficacy and Safety of Sildenafil by Age in Men With Erectile Dysfunction. *J Sex Med.* 2016; 13(5):852–9. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2016.02.166> PMID: 27114196
7. Everard A, Cani PD. Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2013 Feb; 27(1):73–83. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.007> PMID: 23768554
8. Festi D, Schiumerini R, Eusebi LH, Marasco G, Taddia M, Colecchia A. Gut microbiota and metabolic syndrome. *World J Gastroenterol.* 2014 Nov 21; 20(43):16079–94. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i43.16079> PMID: 25473159
9. Round JL, Palm NW. Causal effects of the microbiota on immune-mediated diseases. *Sci Immunol.* 2018 Feb 9; 3(20).
10. He M, Shi B. Gut microbiota as a potential target of metabolic syndrome: the role of probiotics and prebiotics. *Cell Biosci.* 2017; 7:54. <https://doi.org/10.1186/s13578-017-0183-1> PMID: 29090088
11. Okubo H, Nakatsu Y, Kushiyama A, Yamamotoya T, Matsunaga Y, Inoue M-K, et al. Gut Microbiota as a Therapeutic Target for Metabolic Disorders. *Curr Med Chem.* 2018; 25(9):984–1001. <https://doi.org/10.2174/0929867324666171009121702> PMID: 28990516
12. Velasquez MT. Altered Gut Microbiota: A Link Between Diet and the Metabolic Syndrome. *Metab Syndr Relat Disord.* 2018 Sep; 16(7):321–8. <https://doi.org/10.1089/met.2017.0163> PMID: 29957105
13. Bleau C, Karelis AD, St-Pierre DH, Lamontagne L. Crosstalk between intestinal microbiota, adipose tissue and skeletal muscle as an early event in systemic low-grade inflammation and the development of obesity and diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2015 Sep; 31(6):545–61. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2617> PMID: 25352002
14. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol.* 2015 Aug 7; 21(29):8787–803. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787> PMID: 26269668
15. Arshad N, Visweswariah SS. Cyclic nucleotide signaling in intestinal epithelia: getting to the gut of the matter. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2013 Aug; 5(4):409–24. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1223> PMID: 23610087
16. Buglioni A, Burnett JC. New Pharmacological Strategies to Increase cGMP. *Annu Rev Med.* 2016; 67:229–43. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-052914-091923> PMID: 26473417
17. Yaguas K, Bautista R, Quiroz Y, Ferrebuz A, Pons H, Franco M, et al. Chronic sildenafil treatment corrects endothelial dysfunction and improves hypertension. *Am J Nephrol.* 2010; 31(4):283–91. <https://doi.org/10.1159/000279307> PMID: 20110668
18. Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, Szelag A, Schulz R. Isolated heart perfusion according to Langendorff—still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2007 Apr; 55(2):113–26. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.05.006> PMID: 16844390
19. Sauvaget F, Mallem MY, Bucas V, Gogny M, Desfontis J-C, Noireaud J. Positive influence of AT(1) receptor antagonism upon the impaired celiprolol-induced vasodilatation in aorta from spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2010 Oct 10; 644(1–3):169–75. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.07.003> PMID: 20637193
20. Kanso H, Mallem MY, Rabesona H, Thorin C, Haertle T, Chobert J-M, et al. Vasorelaxant effects of camel and bovine casein hydrolysates in rat thoracic aorta and mesenteric artery. *International Dairy Journal.* 2014 Nov 1; 39(1):113–20.
21. Thorin C, Mallem MY, Noireaud J, Gogny M, Desfontis J-C. Nonlinear mixed effects models applied to cumulative concentration-response curves. *J Pharm Pharmacol.* 2010 Mar; 62(3):339–45. <https://doi.org/10.1211/jpp.62.03.0008> PMID: 20487217
22. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: A Practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Statist Soc.* 1995; 57:289–300.
23. Miesel A, Müller H, Thermann M, Heidbreder M, Dominiak P, Raasch W. Overfeeding-induced obesity in spontaneously hypertensive rats: an animal model of the human metabolic syndrome. *Ann Nutr Metab.* 2010; 56(2):127–42. <https://doi.org/10.1159/000278748> PMID: 20134158
24. Moreno-Fernández S, Garcés-Rimón M, Vera G, Astier J, Landrier JF, Miguel M. High Fat/High Glucose Diet Induces Metabolic Syndrome in an Experimental Rat Model. *Nutrients.* 2018 Oct 14; 10(10).
25. Rehakova R, Klimentova J, Cebova M, Barta A, Matuskova Z, Labas P, et al. Effect of deuterium-depleted water on selected cardiometabolic parameters in fructose-treated rats. *Physiol Res.* 2016 Oct 24; 65(Supplementum 3):S401–7. PMID: 27775425
26. Wong SK, Chin K-Y, Suhaimi FH, Fairus A, Ima-Nirwana S. Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr Metab (Lond).* 2016; 13:65.

27. Lorkowska B, Bartus M, Franczyk M, Kostogryś RB, Jawien J, Pisulewski PM, et al. Hypercholesterolemia does not alter endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Jun; 317(3):1019–26. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.098798> PMID: 16547168
28. Ryu SY, Choi YJ, Park SY, Kim JY, Kim YD, Kim YW. Udenafil, a Phosphodiesterase 5 Inhibitor, Reduces Body Weight in High-Fat-Fed Mice. *World J Mens Health*. 2018 Jan; 36(1):41–9. <https://doi.org/10.5534/wjmh.17028> PMID: 29164831
29. Brandt N, De Bock K, Richter EA, Hespel P. Cafeteria diet-induced insulin resistance is not associated with decreased insulin signaling or AMPK activity and is alleviated by physical training in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010 Aug; 299(2):E215–224. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00098.2010> PMID: 20484011
30. Ho JE, Arora P, Walford GA, Ghorbani A, Guanaga DP, Dhakal BP, et al. Effect of phosphodiesterase inhibition on insulin resistance in obese individuals. *J Am Heart Assoc*. 2014 Sep 11; 3(5):e001001. <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.001001> PMID: 25213566
31. Lambert GW, Straznicki NE, Lambert EA, Dixon JB, Schlaich MP. Sympathetic nervous activation in obesity and the metabolic syndrome—causes, consequences and therapeutic implications. *Pharmacol Ther*. 2010 May; 126(2):159–72. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.02.002> PMID: 20171982
32. Rengo G. The adrenergic system in cardiovascular pathophysiology: a translational science point of view. *Front Physiol*. 2014; 5:356. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00356> PMID: 25278905
33. Jiang C, Carillion A, Na N, De Jong A, Feldman S, Lacorte J-M, et al. Modification of the  $\beta$ -Adrenoceptor Stimulation Pathway in Zucker Obese and Obese Diabetic Rat Myocardium. *Crit Care Med*. 2015 Jul; 43(7):e241–249. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000999> PMID: 26079096
34. Nevelsteen I, Bito V, Van der Mieren G, Vanderper A, Van den Bergh A, Sipido KR, et al. ACE-inhibition, but not weight reduction restores cardiomyocyte response to  $\beta$ -adrenergic stimulation in the metabolic syndrome. *BMC Cardiovasc Disord*. 2013 Jul 12; 13:51. <https://doi.org/10.1186/1471-2261-13-51> PMID: 23848952
35. Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Sugizaki MM, Bruno A, Nascimento AF, Luvizotto RAM, et al. Myocardial dysfunction and abnormalities in intracellular calcium handling in obese rats. *Arq Bras Cardiol*. 2011 Sep; 97(3):232–40. <https://doi.org/10.1590/s0066-782x2011005000061> PMID: 21584481
36. Teixeira-da-Silva JJ, Nunes-Moreira HS, Silva CO, Lahlou S, Naro F, Xavier FE, et al. Chronic administration of sildenafil improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats by decreasing COX-2 expression and oxidative stress. *Life Sci*. 2019 May 15; 225:29–38. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.03.074> PMID: 30940538
37. Lunardi CN, Vercesi JA, da Silva RS, Bendhack LM. Vasorelaxation induced by the new nitric oxide donor cis-[Ru(Cl)(bpy)(2)(NO)](PF(6)) is due to activation of K(Ca) by a cGMP-dependent pathway. *Vascul Pharmacol*. 2007 Sep; 47(2–3):139–44. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2007.05.003> PMID: 17602893
38. Andric SA, Janjic MM, Stojkov NJ, Kostic TS. Sildenafil treatment in vivo stimulates Leydig cell steroidogenesis via the cAMP/cGMP signaling pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010 Oct; 299(4):E544–550. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00337.2010> PMID: 20663985
39. Yu J, Zhang B, Su X-L, Tie R, Chang P, Zhang X-C, et al. Natriuretic peptide resistance of mesenteric arteries in spontaneous hypertensive rat is alleviated by exercise. *Physiol Res*. 2016 Jun 20; 65(2):209–17. PMID: 26447511
40. Sannajust F, Barrès C, Koenig-Bérard E, Sassard J. Sympathoinhibitory effects of rilmenidine may be mediated by sites located below the brainstem. *Br J Pharmacol*. 1992 Mar; 105(3):535–41. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1992.tb09015.x> PMID: 1352718
41. Schirmer M, Taube C. Different effects of aspirin on blood pressure of spontaneously hypertensive rats (SHR) with high and spontaneously low levels of blood pressure. *Br J Pharmacol*. 1993 Aug; 109(4):900–1. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb13704.x> PMID: 8401941
42. Mergia E, Stegbauer J. Role of Phosphodiesterase 5 and Cyclic GMP in Hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2016 Apr; 18(5):39. <https://doi.org/10.1007/s11906-016-0646-5> PMID: 27079836
43. Graham DA, Rush JWE. Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. *J Appl Physiol*. 2004 Jun; 96(6):2088–96. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01252.2003> PMID: 14752124
44. Kim J-A, Jang H-J, Hwang DH. Toll-like receptor 4-induced endoplasmic reticulum stress contributes to impairment of vasodilator action of insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015 Nov 1; 309(9):E767–776. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00369.2015> PMID: 26522062
45. Berenyiova A, Dovinova I, Kvandova M, Kristek F, Jansen E, Majzunova M, et al. The Effect of Chronic NO Synthase Inhibition on the Vasoactive and Structural Properties of Thoracic Aorta, NO Synthase Activity, and Oxidative Stress Biomarkers in Young SHR. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 2018:2502843. <https://doi.org/10.1155/2018/2502843> PMID: 30050647

46. Del Bas JM, Guirro M, Boqué N, Cereto A, Ras R, Crescenti A, et al. Alterations in gut microbiota associated with a cafeteria diet and the physiological consequences in the host. *Int J Obes (Lond)*. 2018 Apr; 42(4):746–54.
47. Bortolin RC, Vargas AR, Gasparotto J, Chaves PR, Schnorr CE, Martinello KB, et al. A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. *Int J Obes (Lond)*. 2018 Mar; 42(3):525–34.
48. Moreno-Indias I, Cardona F, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Front Microbiol*. 2014; 5:190. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00190> PMID: 24808896
49. Yang T, Santisteban MM, Rodriguez V, Li E, Ahmari N, Carvajal JM, et al. GUT MICROBIOTA DYSBIOSIS IS LINKED TO HYPERTENSION. *Hypertension*. 2015 Jun; 65(6):1331–40. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05315> PMID: 25870193
50. Lecomte V, Kaakoush NO, Maloney CA, Raipuria M, Huinao KD, Mitchell HM, et al. Changes in gut microbiota in rats fed a high fat diet correlate with obesity-associated metabolic parameters. *PLoS ONE*. 2015; 10(5):e0126931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126931> PMID: 25992554
51. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007 Jul; 56(7):1761–72. <https://doi.org/10.2337/db06-1491> PMID: 17456850
52. Tanida M, Shen J, Maeda K, Horii Y, Yamano T, Fukushima Y, et al. High-fat diet-induced obesity is attenuated by probiotic strain *Lactobacillus paracasei* ST11 (NCC2461) in rats. *Obes Res Clin Pract*. 2008 Sep; 2(3):I–II.

**Article 2: Effects of soluble guanylate cyclase chronic stimulation on cardiovascular reactivity in spontaneously hypertensive rats with metabolic syndrome**

(En cours de soumission)

**Yosra Doghri <sup>1\*</sup>, Laurence Dubreil <sup>2</sup>, Romain Fleurisson <sup>2</sup>, Ophélie Héliissen <sup>1</sup>, Chantal Thorin <sup>1</sup>, M. Yassine Mallem <sup>1</sup>, Jean-Claude Desfontis <sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> UPSP NP3 (2017.B146), Nutrition, Pathophysiology and Pharmacology, Oniris, College of Veterinary Medicine, Food Sciences and Engineering, Atlanpôle – La Chantrerie, BP 40706, 44307 Nantes, France.

<sup>2</sup> INRA UMR U703, PAnTher, Oniris, College of Veterinary Medicine, Food Sciences and Engineering, Atlanpôle- La Chantrerie, BP 40706, 44307 Nantes, France

**\* Correspondence:**

Corresponding Author:

[yosra.doghri@oniris-nantes.fr](mailto:yosra.doghri@oniris-nantes.fr)

## Abstract

### Introduction

Metabolic syndrome is related to increased risk of early death due to cardiovascular complications. Several studies have shown that all components of metabolic syndrome have adverse effects on the endothelium leading to vascular reactivity dysregulations

### Objective

To further develop this scientific point and as little is known about the impact of metabolic syndrome on cardiovascular function in the spontaneously hypertensive rats (SHR), this study aimed to investigate the effects of long-term administration of BAY 41-2272, a soluble guanylate cyclase stimulator, on the cardiovascular reactivity of SHR submitted to 12 weeks of cafeteria diet (CD).

### Method

Eight-week old male SHR were randomly divided into 3 groups: Control group, CD-fed group and CD-fed group treated daily with BAY 41-2272 (5mg/Kg) by gastric gavage. *In vivo* measurements of body weight, abdominal circumference, blood pressure and glucose tolerance test were performed. At the end of the experimental protocol, *ex vivo* cumulative concentration-response curves were determined on isolated perfused heart (isoproterenol (0.1nM - 1 $\mu$ M)) and thoracic aorta (acetylcholine (1nM – 10  $\mu$ M), phenylephrine (1nM – 10  $\mu$ M), insulin (1nM – 3 $\mu$ M) and sodium nitroprusside (SNP) (0.1nM – 0.1 $\mu$ M)).

### Results

We showed that chronic CD feeding induced abdominal obesity, hypertriglyceridemia, glucose intolerance and exacerbated arterial hypertension in SHR. Compared to control group, CD-fed group showed decreased  $\beta$ -adrenoceptor-induced cardiac inotropy and coronary vasodilation and decreased aorta contraction to phenylephrine. Insulin-mediated relaxation was depressed in CD-fed group while relaxing effects of acetylcholine and SNP were unchanged. BAY 41-2272 long-term treatment improved markedly arterial hypertension and glucose intolerance, enhanced the  $\alpha$ -1 adrenoceptor-induced vasoconstriction and restored cardiac inotropy and coronary vasodilation

## Conclusion

These findings suggest that NO/sGC/cGMP pathway modulation could serve as a potential therapeutic target for protection against cardiovascular alterations associated with metabolic syndrome.

**Key words: metabolic syndrome, sGC stimulation, SHR, Cafeteria diet, cardiovascular reactivity**



## Introduction

Metabolic syndrome is defined as a cluster of risk factors that predisposes to cardiovascular disease and type II diabetes mellitus (Galassi et al. 2006; Aschner 2010). The risk factors of metabolic syndrome include central obesity, insulin resistance, hypertension, dyslipidaemia, and an impaired glucose tolerance (O'Neill and O'Driscoll 2015).

It has been shown that an altered endothelium-dependent vasorelaxation also known as endothelial dysfunction is an early indicator of cardiovascular events risk such stroke and heart attack (Shayo et al. 2019). Currently, an association is clearly established between endothelial dysfunction and metabolic syndrome (Abd El Aziz et al. 2018). Moreover, it's widely known that an increasing number of metabolic syndrome components is associated with more severe impairment in endothelial function (Tziomalos et al. 2010).

The endothelium generates several vasoactive compounds and signals which act locally to adjust blood flow including nitric oxide (Khaddaj Mallat et al. 2017; Fernandes et al. 2017). Once released by the endothelium, nitric oxide diffuses into the smooth muscle cell, activates soluble guanylate cyclase (sGC) thereby catalyzing cyclic guanosine monophosphate (cGMP) synthesis. cGMP induces vasorelaxation via lowering intracellular calcium levels (B. Kim et al. 2019). It has already been reported that endothelial dysfunction associated with the metabolic syndrome is mainly due the reduced NO bioavailability and an impairment in NO-sGC-cGMP signalling pathway. It is correlated with the onset and progression of cardiovascular disease (Matthews et al. 2018; Breitenstein et al. 2017).

Recent studies have shown that chronic treatment with sildenafil citrate, a phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitor, improves energy balance contributing to weight loss in high fat-fed mice (Ayala et al. 2007), reduces hyperinsulinemia and up-regulates endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in a rat model of insulin resistance (Oudot et al. 2010). This suggests that NO-cGMP pathway modulation may constitute a key link between its metabolic and vascular protective effects. However, protective effects of PDE5 inhibitors are dependent on endogenous NO production. Currently, different classes of drugs have been developed, which increase cGMP intracellular levels independently of NO availability by targeting the NO receptor sGC (Breitenstein et al. 2017). BAY 41-2272 is a sGC stimulator that has been shown to promote antihypertensive action, to attenuate remodelling in models of systemic arterial hypertension and to reduce pulmonary vascular resistance (Boerrigter and Burnett 2007). Furthermore, potential antiobesity and insulin sensitizing effects of cGMP signalling have been

postulated (Mitschke et al. 2013). These findings suggest that cGMP pathway modulation through sGC stimulation could be a promising therapeutic alternative to treat metabolic disorders and prevent cardiovascular complications associated with the metabolic syndrome. However, to the best of our knowledge, few studies have evaluated metabolic and cardiovascular effects of chronic treatment with BAY 41-2272 in spontaneously hypertensive rats (SHR) with an induced metabolic syndrome.

Thus, the aim of this study is to investigate the effects of chronic sGC stimulation by BAY 41-2272 on metabolic parameters and cardiovascular reactivity in a SHR experimental model of metabolic syndrome.

## **Materials and methods**

### Animals and experimental protocol

All the experiments were performed in accordance with Institutional Guidelines from the ethical committee of Pays de la Loire, France (Ministry authorisation, APAFIS N° 6445).

Eight-week old, male spontaneously hypertensive rats (SHR) obtained from Janvier Labs (Le Genest St Isle, France), were used for this study. All rats were housed under a 12-hour light/dark cycle, at a controlled temperature (22°C) and humidity (50%). Rats were allowed free access to standard chow (4.5% total fat, 54.2% carbohydrates 18.5% protein) (KLIBA NAFAG®, Kaiseraugst, Germany) and drinking water. An adaptation period of 1 week was allowed before any experiment was initiated.

Rats were randomly separated into 3 groups: control chow diet- fed rats, Cafeteria diet (CD)- fed rats and CD-fed rats treated daily with BAY 41-2272 *per os* for 12 weeks.

CD included different commercial variety of chocolate, cookie and cereal bars. The resulting CD provided an average of 68.3% energy from carbohydrates, 5.83% from protein and 18.2% from total fat. The foods provided were changed daily to stimulate hyperphagia.

During the feeding protocol, body weight and abdominal circumference of all rats were monitored weekly.

### Arterial blood pressure measurement

Measures of systolic (SBP) and diastolic (DBP) arterial pressure were recorded at the beginning, middle and at the end of the experimental protocol in awake rats using tail plethysmography technique (CODA, Kent Scientific Co., Torrington, CT, USA). All rats were conditioned to the procedures during one week before data collection.

Before starting measurements, rats were placed in a restraining box and preheated at 37° C in order to dilate the tail arteries. ten consecutive pressure measurements were recorded for each rat and averaged to obtain a representative value of SBP and DBP (mmHg)

#### Glucose tolerance test

At the 12<sup>th</sup> week, a glucose tolerance test was performed by means of glucose solution injection (1g/kg body weight, intraperitoneally)

Blood sampling (one drop) was performed from tail vein (under ointment lidocaine application) before and at 15, 30, 45, 60 and 90 min after glucose injection. The concentration of blood glucose was determined with a blood glucose meter (Glucometer, Pura ®). The area under the curve (AUC) was calculated.

#### Ex vivo cardiac function

At the end of the experimental protocol, rats were anesthetized with pentobarbital (54mg/kg i.p). Anaesthesia of the rat was checked by the paw withdrawal reflex. Rats were then sacrificed by exsanguination of abdominal aorta.

The hearts were quickly and thoroughly excised and immersed in a cold *Krebs-Henseleit* buffer previously filtered (0.2 µm filter funnel) and oxygenated with 95% O<sub>2</sub>- 5% CO<sub>2</sub> gas mixture. *Krebs-Henseleit* buffer composition in mM is: NaCl, 118.3; KCL, 4.7; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; NaHCO<sub>3</sub>, 20; EDTA, 0.016; Glucose, 11.1 and CaCl<sub>2</sub>, 2.5; PH 7.4. The aortic canula was connected in order to allow a retrograde perfusion at a constant flow rate of 12 ml/min, using Langendorff method (Skrzypiec-Spring et al. 2007). To determine left ventricular function, a water-filled latex balloon was inserted into the left ventricle through the mitral valve. An equilibration period of 30 min was required to ensure the stability of the parameters recorded before any molecule addition. Left ventricular developed pressure (LVDevP) was determined as the difference between left ventricular systolic pressure and left ventricular end-diastolic pressure. Coronary vasodilation was determined by perfusion pressure variation. Each parameter was recorded initially and after the addition of increasing concentrations of isoproterenol (1nM- 1µm).

All the parameters recorded were analysed by LabChart ®Pro software (V7, ADInstruments, France).

### Vascular reactivity experiments

Immediately after the sacrifice, thoracic aorta (TA) was rapidly removed and placed in ice-cold *Krebs-Henseleit* solution. The aorta was then dissected, cleaned of fat and connective tissue and cut into rings (2-3 mm long). TA rings were suspended on stainless-steel wires in a 10 ml organ bath containing a *Krebs* solution heated to 37°C and continuously oxygenated with a 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> gas mixture. TA rings were progressively stretched to a resting tension of 2g. Isometric tension was detected using a force displacement transducer (Emka Technologies, Paris, France) and recorded by data acquisition software (iOX, Paris, France).

Briefly, after a one-hour equilibration phase at a resting tension of 2g, the viability of the endothelium was verified by the observation of at least 60% relaxation to acetylcholine (1 μM) in TA rings (precontracted with 1 μM of phenylephrine, a selective α<sub>1</sub>- adrenoceptor agonist) (Sauvaget et al. 2010).

After a washing period of 30 min with *Krebs-Henseleit* solution, TA rings were contracted again with 1 μM phenylephrine. Once contraction reached a plateau, cumulative concentration response curves (CCRCs) to acetylcholine (1nM-10 μM), insulin (1nM- 3 μM) and sodium nitroprusside (a nitric oxide donor, 10nM- 0.3 μM) were performed. Values were expressed as the percentage relaxation of the phenylephrine-induced precontraction.

### Blood parameters

Insulin levels were measured using a rat insulin ELISA kit (Thermo Fisher Scientific, France), triglycerides and cholesterol levels were determined using an automatic biochemical analyser in the Veterinary University Hospital Centre of ONIRIS, Nantes, France.

### cGMP levels in thoracic aorta

Immediately after the sacrifice, the resting TA was frozen in liquid nitrogen to prevent cGMP degradation and was kept at -80°C. The samples were then treated with 6% cold trichloroacetic acid and centrifuged at 1500g for 10 min at 4°C.

The supernatant fractions were extracted three times with water saturated diethyl ether (5 volumes of diethyl ether to 1 volume of supernatant). Residual diethyl ether was evaporated by heating samples to 70°C for 5 min. The dried extract was dissolved in an assay buffer and the cGMP concentrations were measured calorimetrically using an immunoenzymatique assay kit (Cayman Chemical Company). Absorbance was read using a spectrophotometer at 405nm. The mean value was calculated from duplicate measurements of each sample and normalized to total

cell protein levels previously measured using a protein assay reagent kit (micro BCA-Pierce) (Kanso et al. 2014).

#### Immunofluorescence and quantification of iNOS and eNOS expression

Thoracic aorta rings were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 4 hours at 4°C. After 3 washings in PBS, the aortic rings were incubated in PBS containing 20% sucrose for one night. Then, they were embedded in tissue Tek OCT medium ®(Sakura, USA) and frozen by immersion in liquid isopentane and conserved at -80°C. Frozen section (10 µm) were permeabilized with 0.5 % Triton 100X in PBS for 5min and treated with a PBS solution containing 0.5% Triton 100X and 2% bovine serum albumin (BSA) for 1 hour to block the nonspecific antigen binding.

Sections were then incubated in the blocking buffer with a rabbit polyclonal antibody against iNOS (1 :100, Abcam, Cambridge, United Kingdom) or a mice monoclonal antibody against eNOS (1 :1000, Abcam, Cambridge, United Kingdom) for one night. After 5 washings of 3 min each in PBS, the sections were incubated with secondary antibody, AlexaFluor 647 donkey anti- mice IgG (1 :300, life Technologie, Saint Aubin, France) or AlexaFluor 555- conjugated donkey anti-rabbit (1 :300, life Technologie, Saint Aubin, France) for 1 hour at room temperature. Slides were mounted in Mowiol (Calbiocgem, San Diego, CA, USA). The immunolabeled sections were scanned using the helium neon laser (448 nm) to observe elastic lamina autofluorescence, the helium neon laser 561 nm for AlexFluor 555 detection (iNOS immunolabeling) and the helium neon laser 633 nm to observe AlexaFluor 647 (eNOS immunolabeling). Acquisitions were performed using a spectral confocal microscope (Zeiss LSM 780, Zeiss, France). Image analysis were performed to evaluate iNOS and eNOS expression level in the thoracic aorta of all rats by using Fiji Software. Fluorescence Mean Intensity (FMI) values were acquired from 5 different fields of immunolabeled thoracic aorta sections in each condition. The same threshold was used to measure the sum intensity fluorescence of iNOS and eNOS immunolabelling in each section. Finally, the MFI was reported to total area of analysed section.

#### Drugs

Pentobarbital solution was purchased from Ceva, Libourne, France. Phenylephrine hydrochloride, acetylcholine chloride, sodium nitroprusside, human insulin and isoproterenol were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France). BAY 41-2272 was provided from Bayer

All drugs were prepared as stock solutions in distilled water except for insulin, which was dissolved in 0.01M hydrochloric acid.

### Statistical analysis

All the results were expressed as a mean  $\pm$ SEM of n experiments where n represents the number of rats.

Data of body weight, abdominal circumference and arterial blood pressure were compared using a linear mixed effect (LME) model on R software

Data of blood parameters (insulin, glucose, triglyceride and cholesterol), cGMP levels and the area under the curve were compared between groups using One-way ANOVA. When a significant effect was found, post hoc multiple comparisons were made using Tukey's post-hoc analysis.

For the immunofluorescence analysis, differences were determined using nonparametric Mann-Whitney test.

CCRC parameters (maximum effect: Emax, negative logarithm of the concentration producing 50% of the maximum effect  $pD_2$ ) were analysed using a non-linear mixed effect (NLME) model on R software for acetylcholine, phenylephrine, sodium nitroprusside and linear mixed effect (LME) model for insulin and isoproterenol.

(Thorin et al. 2010).

All graphs were performed on PRISM <sup>®</sup> software version 5.

## **Results**

### Body weight gain, abdominal circumference and arterial blood pressure

As shown in Fig 1A, after 12 weeks of CD feeding, the CD-fed group had greater weight gain than the standard chow diet-fed group (248g  $\pm$ 33.56 vs 144g  $\pm$  20.01  $p < 0.05$ ). This weight gain was correlated to an increased abdominal circumference (Fig 1B). Long-term treatment with BAY 41-2272 reduced both body weight gain and abdominal circumference (Fig 1).

CD feeding raised significantly SBP of CD-fed rats compared with their littermates assigned to the standard chow diet-fed group (180.0 mmHg  $\pm$ 2.6 Vs 164.4mmHg  $\pm$  2.2  $p < 0.05$ ) (Fig 2A). Similar results were observed for diastolic arterial blood pressure (Fig 2B) Compared to the CD-fed rats, BAY 41-2272 long-term treatment markedly decreased both SBP and DBP below

the control values (SBP :131.6 ±3.7 vs180.0.4± 2.6  $p<0.01$  in BAY 41-2272 treated-group and CD group respectively) (Fig 2).

### Glucose tolerance

Changes in the glycaemic curve were clearly observed in CD-fed rats in comparison with control ones. Indeed, a significant increase in the AUC was observed in the CD-fed group. The increase in blood glucose level during glucose tolerance test was followed by a slower decrease to the basal values (Fig 3). Moreover, the results showed a significant improvement in the AUC in CD-fed rats treated with BAY 41-2272 as shown in Fig 3. There was a significant reduction in glucose blood level at the time point of 45 min after glucose injection compared to CD-fed rats. Difference in AUC between the BAY 41-2272 treated group and standard chow diet-fed group was not statistically significant.

### Plasma biochemical analysis

Plasma metabolic parameters at the end of the experimental protocol are shown in Table 1. Triglycerides levels in the CD-fed group were higher than those in the control group ( $p<0.001$ ). However, total cholesterol level was lower in the CD-fed group when compared to the control one. There was no significant difference in blood glucose and insulin levels between the 2 groups. On the other hand, long-term treatment of CD-fed rats with BAY 41-2272 did not improve plasma triglycerides levels but tended to reduce fasted glucose level compared to the CD-fed group.

Table 1 : Plasma biochemical parameters

Parameters	Control	CD	CD + BAY 41-2272
Triglycerides (g/l)	0.79± 0.08	1.34± 0.16 ***	1.37± 0.17
Total cholesterol (g/l)	0.83± 0.09	0.62± 0.06 *	0.75± 0.04
Insulin (µUI/ml)	9.21± 1.32	11.83± 2.52	9.86 ± 2.37
Glucose (mg/dl)	103.60± 2.48	107.30± 4.52	96.71 ± 3.43

Fasting blood glucose, insulin, total cholesterol and triglycerides levels measured at the end of experimental protocol. Values are expressed as means ±SEM (\* $p<0.05$ , \*\*\* $p<0.001$  vs Control group, determined by one-way ANOVA, followed by Tukey multiple comparison test).

### Isolated heart function

To further characterize our model and evaluate the cardiovascular effect of BAY 41-2272 long-term treatment, myocardial function was evaluated using an isolated Langendorff heart preparation. As shown in Table 2, basal left ventricular developed pressure (LVDevP) and coronary perfusion pressure were not statistically different between the 3 groups.

Table 2: Basal function of isolated heart

	Control	CD	CD + BAY 41-2272
LVDevP (mmHg)	77.0± 8.22	60.55± 3.27	67.04± 5.2
Coronary perfusion pressure (mmHg)	25.88± 1.40	23.73 ± 3.29	22.45± 5.84

The hearts were perfused with oxygenated Krebs-Henseleit solution as previously described. LVDevP, Left ventricular developed pressure. Values are expressed as means ±SEM

To determine whether metabolic syndrome induces  $\beta$ -adrenergic dysfunction, increasing concentrations of isoproterenol were applied to the heart.  $\beta$ -adrenoceptor stimulation induced a marked positive inotropic effect in control rats determined by LVDevP (Fig 4A). In contrast, the response to  $\beta$ -adrenoceptor stimulation was significantly reduced in CD-fed group ( $p<0.001$ ).

Thus, in our rat model of metabolic syndrome, basal cardiac function is preserved but the inotropic reserve in response to  $\beta$ -adrenoceptor stimulation is reduced suggesting an impairment of the  $\beta$ -adrenoceptor signalling in this model. Otherwise, chronic treatment with BAY 41-2272 significantly restored LVDevP indicating an improvement in LV contractility (Fig 4A). Similar results were obtained for isoproterenol-induced coronary vasodilation. Indeed, coronary blood flow decreased in response to  $\beta$ -adrenoceptor stimulation in the control group. This response was significantly altered in CD-fed rats ( $p<0.05$ ) whereas it remained unchanged in the CD-fed group treated with BAY 41-2272 ( $p<0.001$  CD vs CD + BAY 41-2272) (Fig 4B). These results suggest an improvement in  $\beta$ -adrenergic function following *in vivo* chronic sGC stimulation.

### Vascular reactivity

In order to evaluate whether metabolic abnormalities influenced the vasoconstriction mediated by  $\alpha_1$ -AR in thoracic aorta, CCRC to phenylephrine were constructed. The aorta of the CD-fed group showed a significant reduction in the maximal contractile response ( $E_{max}$ ) to



phenylephrine when compared to the control one ( $p<0.001$ ) (Fig 5A, Table 3). However, the addition of the iNOS inhibitor aminoguanidine (AMN, 100 $\mu$ M) in the bathing solution normalized the contraction elicited by phenylephrine in aortic rings from CD-fed group. Maximal contraction was increased to 4.46g $\pm$  0.29 ( $p< 0.001$  vs in the absence of iNOS inhibitor) (Fig 5B) suggesting an iNOS-dependent NO-mediated reduction in contractile response in aorta from CD-fed rats (Fig 5B). Contrarily, the phenylephrine- concentration response curve was significantly restored in aortic rings isolated from CD-fed rats treated with BAY 41-2272 (Fig 5A, Table 3).

Table 3: pD<sub>2</sub> and E max of phenylephrine responses in aortic rings isolated from all groups

	Control	CD	CD + BAY 41-2272
E <sub>max</sub> (g)	4.15 $\pm$ 0.065	3.77 $\pm$ 0.08*	4.30 $\pm$ 0.07
pD <sub>2</sub>	7.26 $\pm$ 0.04	7.29 $\pm$ 0.05	7.60 $\pm$ 0.06

Values are means  $\pm$ SEM. \* $p<0.001$  vs Control, CD + BAY 41-2272 by NLME model

#### Vasorelaxation to insulin

In order to evaluate the vasorelaxation to insulin *ex vivo*, CCRC to insulin were performed on precontracted aortic rings with phenylephrine. In control group, the maximal vasodilation with insulin was significantly higher than that in CD-fed group ( $p<0.05$ ) (Fig 6A). In order to investigate the role of endothelin-1 (ET-1) in the vascular response of CD-fed group to insulin, we evaluated the insulin concentration-response curve in the presence of ET-1 receptors blocker (BQ 123, 1 $\mu$ M). Pretreatment of CD-fed group aortic ring with BQ-123 significantly enhanced the vasodilatory action of insulin (Fig 6B) resulting in a CCRC comparable to that observed in the control group. These observations suggest that the altered vasodilatory response to insulin during metabolic syndrome may involve the ET-1 mediated signalling pathway. However, CD-fed rats treated with BAY 41-2272 did not show any improvement in the vasodilator response to insulin (Fig 6A)

#### Endothelial response to acetylcholine and sodium nitroprusside (SNP)

In order to assess whether our model of metabolic syndrome exhibit an endothelial dysfunction, CCRC to acetylcholine were performed (Fig 7A). Maximum endothelial-dependent relaxation to acetylcholine following phenylephrine precontraction was not significantly altered by chronic CD feeding compared to aorta from control rats indicating that endothelial function is not impaired in our model of metabolic syndrome. Similarly, no significant difference was

observed between CD-fed untreated and treated rats ( $E_{max} = 79.8\% \pm 3.16$  vs  $77.38\% \pm 3.38$  respectively).

Moreover, the endothelium-independent vasodilatory response was evaluated using the SNP. Increasing concentration of SNP produced a marked relaxation but there was no significant difference between the 3 groups (Fig 7B).

#### Determination of intracellular cGMP levels in thoracic aorta

The cGMP content is shown in Table 4. There was no significant difference between CD-fed group and control group. However, cGMP levels were slightly but not significantly increased in CD-fed rats treated with BAY 41-2272.

Table 4: Intracellular level of cGMP measured in thoracic aorta

	Control	CD	CD + BAY 41-2272
cGMP (pmol/mg protein)	1.20±0.23	0.89±0.12	1.40 ±0.27

Results are expressed as mean ± SEM

#### Quantification of eNOS and iNOS expression in thoracic aorta

An immunofluorescence labelling was performed to determine the expression of iNOS in thoracic aorta isolated from all groups. Our results did not show higher expression of iNOS in CD-fed group compared to other groups (Fig 8A).

We next evaluated whether thoracic eNOS expression were modified under metabolic syndrome condition or after chronic treatment with BAY 41-2272. There was no significant difference in endothelial expression of eNOS between the 3 groups. These results were in agreement with the results of our *ex vivo* study as well as with thoracic aorta cGMP content (Fig 8B).

## **Discussion**

Several rodent models of diet- induced metabolic syndrome are used in experimental studies to assess the underlying mechanisms of cardiovascular alterations that may occur during metabolic disturbances (Lehnen et al. 2013). CD is considered as a robust model in terms of examining the human diet in rodents (Sampey et al. 2011). In, our study, chronic CD feeding induces abdominal obesity, hypertriglyceridemia, glucose intolerance and exacerbates arterial hypertension in SHR. These findings are consistent with those of La Russa et al. (2019) who

demonstrated that CD is the most appropriate regime to induce severe obesity, glucose intolerance, insulin resistance, and high plasma triglyceride levels in rodents. However, they are partially inconsistent with the findings of Miesel et al. (2010) who reported that insulin resistance in SHR was more pronounced over the feeding period. It's well documented that SHR are already hypertensive and insulin-resistant (Reaven and Chang 1991). Unchanged insulin levels between control and CD-fed group in our study could be explained by a long fasting period as rats were fasted for 16-18 hours before blood sampling (Oliveira Junior et al. 2010).

Our results demonstrated that chronic BAY 41-2272 treatment simultaneously with CD feeding tended to reduce excessive weight gain and abdominal fat. Weight gain reduction in BAY 41-2272 treated rats seems to be more related to increased energy expenditure than to decreased energy intake since food consumption between untreated and treated groups was not statistically different (data not shown). Increasing evidence suggests that cGMP pathway modulation may regulate energy balance directly through promoting mitochondrial biogenesis and protection of mitochondrial function from vascular damage (G. W. Kim et al. 2014). In this regard, it has been shown that pharmacological stimulation of sGC increases the function of brown adipocyte and induces an energy-combusting phenotype in white adipocyte in mice with diet-induced obesity. This mechanism has been reported to reduce body weight and an improved metabolic phenotype (Hoffmann et al. 2015).

On the other hand, it's largely known that impaired NO/sGC/cGMP is a key feature of systemic arterial hypertension (Stasch et al. 2011). In the present study, long-term sGC stimulation with BAY 41-2272 was able to produce a significant decrease in arterial blood pressure in hypertensive rats. These results are also consistent with studies that showed that chronic administration of BAY 41-2272 inhibited the development of arterial hypertension and prevented heart abnormalities in a rat model of arterial hypertension, probably by decreasing oxidative stress and by increasing NO bioavailability and sGC expression (Prawez et al. 2016; Zanfolin et al. 2006) which seems to be decreased during obesity (Alexandre et al. 2014).

In the present study, we investigated vascular reactivity in SHR model of metabolic syndrome. Our results revealed that CD-fed rats exhibited an altered vasoconstrictor response characterized by a reduced maximal force of contraction compared to their counterparts in the control group, with no difference in vessel sensitivity. Reduced contractility is also reported in aortic rings from obese Zucker rats, another animal model of metabolic syndrome (Vendrame et al. 2014) and from high sugar-fed mice (Silva et al. 2016). Moreover, in our experiments,

incubation of isolated aortic rings from CD-fed group with iNOS inhibitor normalized the maximal contractile force in this group suggesting an increase in iNOS-induced NO production in CD-fed group. It has already been shown a significant increase in iNOS expression and NO generation during diet-induced obesity (Pathak et al. 2019). Nonetheless, our immunohistochemical results did not reveal higher iNOS expression in thoracic aorta of CD-fed group in comparison with the control group. Thus, these findings do not exclude the hypothesis of increased NO formation mediated by iNOS, given that iNOS activity has not been investigated. However, several animal and human studies have reported that overfeeding can modulate sympathetic nerve activity (Thorp and Schlaich 2015). Indeed, it has been demonstrated that obesity is generally associated with an increase in sympathetic nerve activity and a decrease in parasympathetic activity (Thorp and Schlaich 2015). Thus, it is likely that the lower vascular contractile response observed in CD-fed group would represent a compensatory mechanism to counteract the blood pressure elevation (Battault et al. 2018). Chronic activation of sympathetic nervous system is accompanied by a lower  $\alpha$ -1D adrenoceptor gene expression leading to  $\alpha$ -adrenergic desensitization in thoracic aorta (Belin de Chantemèle et al. 2009). NO plays a crucial role in maintaining the vascular homeostasis through several mechanism among which, the modulation of the autonomic nervous system activity (Battault et al. 2018). In this regard, a study conducted by Gamboa et al. (2012) showed that altered vascular contraction observed during hypertension is due to the loss of NO tonic suppression of sympathetic activity. These observations are in line with our results. We showed that long-term treatment with BAY 41-2272 has restored the adrenoceptor-mediated vasoconstrictive response in CD-fed group. This suggests that NO/sGC/cGMP pathway stimulation through BAY 41-2272 would have prevented the adrenoceptor desensitization that may occur during metabolic disorders.

Since insulin stimulated NO production in vascular endothelium via endothelial NOS activation, we aimed to evaluate the insulin-induced vasorelaxation on isolated thoracic aortic rings. In the present work we found that the relaxant effect of insulin was significantly depressed in CD-fed group. These observations have also been described in other studies (Lyoussi et al. 2018; Yang et al. 2007). However, pretreatment of aortic rings with an ET-1 receptors blocker significantly improved insulin-mediated vasorelaxation in the CD-fed group. These results are consistent with those of Potenza et al. (2005) who showed that endothelin-1 (ET-1) receptor blockade can unmask the vasodilatory action of insulin in insulin resistant rats. It's already well know that insulin resistance is associated with activation of MAP kinase signalling pathway in vascular cells leading to increased ET-1 secretion and vasoconstriction

(Pardo et al. 2019). Thus, our results suggest that elevated ET-1 secretion in the endothelium in response to insulin stimulation may be involved in the alteration of insulin-induced vasodilation in CD-fed group. Nonetheless, other studies showed that the decreased-insulin mediated vasorelaxation could also be due to the reduced release of NO from the PI3 kinase pathway (Yang et al. 2007; Kobayashi et al. 2004). In the present work, chronic treatment with BAY 41-2272 significantly improved vascular reactivity to phenylephrine. However, the insulin-mediated vasorelaxation was not improved.

In contrast to the decrease in the insulin-induced vasodilation response, in the present work, no modification in acetylcholine-evoked relaxation between the control and CD-fed groups was observed. These results contradict previous findings that showed an impairment in endothelium-dependent relaxation in SHR (Anishchenko et al. 2015) and in other animal models of metabolic syndrome (Bhatta et al. 2017; El-Bassossy et al. 2014). However, our results are in line with the findings of Vendrame et al. (2014) who showed that obese Zucker rats did not exhibit impaired endothelium-dependent relaxation in response to acetylcholine. Moreover, Berenyiova et al. (2018) concluded that SHR developed adaptative vasoactive mechanisms leading to a preserved NOS activity level. Our results are in agreement with this hypothesis since immunohistochemical analysis for the determination of eNOS expression level and cGMP assays in the thoracic aorta did not reveal any difference between the different groups. SNP-induced vasorelaxation remained unchanged between the 3 groups indicating that smooth muscle response to NO was not altered.

Taken together, these results suggest that impaired insulin-stimulated vasorelaxation may be an early feature of endothelial dysfunction that precedes impaired response to acetylcholine and vascular wall damage. Furthermore, it has been widely documented that resistance arteries played an important role in the regulation of blood pressure in SHR (Yu et al. 2016). Thus, further studies are needed to assess changes in reactivity of resistance arteries during metabolic syndrome.

Otherwise, we also investigated the cardiac  $\beta$ -adrenoceptor responsiveness of control group, CD-fed group and CD-fed group treated with BAY 41-2272 on isolated perfused hearts according to the Langendorff method. Our study showed a significant attenuation of the positive inotropic effect after  $\beta$ -adrenoceptor stimulation in CD-fed group in comparison with the control one. As previously mentioned, metabolic syndrome is generally associated with high-adrenergic tone which can lead to  $\beta$ -adrenoceptor downregulation. Downregulation of  $\beta_1$ / $\beta_2$  adrenoceptors have already been reported in animal models of metabolic syndrome (Jiang et al.

2015). According to other studies, this downregulation is accompanied by a significant increase in  $\beta$ -3 adrenoceptor expression which shows a relative resistance to desensitization (Mongillo et al. 2006). However, these findings are inconsistent with those of Lima-Leopoldo et al. (2011) who showed that decreased positive inotropic effect of  $\beta$ -adrenoceptor stimulation was not due to  $\beta$ -adrenoceptor downregulation but to impaired calcium handling. Further studies are needed to better understand the underlying mechanisms of cardiac inotropy alteration during metabolic syndrome. On the other hand, chronic treatment with BAY 41-2272 significantly improved  $\beta$ -adrenoceptor responsiveness compared to CD-fed group. BAY 41-2272-induced increase in cGMP levels has been shown to modulate  $\beta$ -adrenoceptor stimulated cAMP (Mongillo et al. 2006). Moreover, it has been also shown that increasing levels of cGMP suppress cAMP hydrolysis rate by phosphodiesterase 1,2 and 3, resulting in amplified cAMP signalling (Zhao, et al. 2015; Adderley et al. 2012). Thus, BAY 41-2272 would have improved  $\beta$ -adrenergic responsiveness probably indirectly through a mechanism that involves isoenzymes phosphodiesterase regulation.

In conclusion, the present study showed that long-term treatment with BAY 41-2272 improved metabolic disorders and restored cardiac and aortic contractility probably by different mechanisms other than direct cGMP activation. These findings suggest that BAY 41-2272 could be a potential therapeutic mean to prevent cardiovascular alterations associated to metabolic syndrome.

## **Acknowledgements**

The authors would like to thank Mireille Ledevin and Valérie Lalanne for their technical assistance.

## **Conflict of interest**

The authors declare that no competing interests exist

## **References**

Abd El Aziz, Rokayaa, Mary Wadie Fawzy, Noha Khalil, Sahar Abdel Atty, and Zainab Sabra. 2018. "Vascular Affection in Relation to Oxidative DNA Damage in Metabolic Syndrome." *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism* 9 (2): 43–51. <https://doi.org/10.1177/2042018817750823>.

Adderley, Shaquria P., Chintamani N. Joshi, Danielle N. Martin, and David Anthony Tulis. 2012. “Phosphodiesterases Regulate BAY 41-2272-Induced VASP Phosphorylation in Vascular Smooth Muscle Cells.” *Frontiers in Pharmacology* 3: 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00010>.

Alexandre EC, Leiria LO, Silva FH, Mendes-Silvério CB, Calmasini FB, Davel AP. et al 2014. Soluble guanylyl cyclase (sGC) degradation and impairment of nitric oxide-mediated responses in urethra from obese mice: reversal by the sGC activator BAY 60-2770. *J Pharmacol Exp Ther.* 2014 Apr;349(1):2-9. doi: 10.1124/jpet.113.211029

Anishchenko, A. M., O. I. Aliev, A. V. Sidekhmenova, A. Yu Shamanaev, and M. B. Plotnikov. 2015. “Dynamics of Blood Pressure Elevation and Endothelial Dysfunction in SHR Rats During the Development of Arterial Hypertension.” *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 159 (5): 591–93. <https://doi.org/10.1007/s10517-015-3020-8>.

Aschner, Pablo. 2010. “Metabolic Syndrome as a Risk Factor for Diabetes.” *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 8 (3): 407–12. <https://doi.org/10.1586/erc.10.13>.

Ayala, Julio E., Deanna P. Bracy, Brianna M. Julien, Jeffrey N. Rottman, Patrick T. Fueger, and David H. Wasserman. 2007. “Chronic Treatment with Sildenafil Improves Energy Balance and Insulin Action in High Fat-Fed Conscious Mice.” *Diabetes* 56 (4): 1025–33. <https://doi.org/10.2337/db06-0883>.

Battault, Sylvain, Cindy Meziat, Allesandro Nascimento, Laura Braud, Sandrine Gayraud, Christian Legros, Frederic De Nardi, et al. 2018. “Vascular Endothelial Function Masks Increased Sympathetic Vasopressor Activity in Rats with Metabolic Syndrome.” *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 314 (3): H497–507. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00217.2017>.

Belin de Chantemèle, Eric J., Kenjiro Muta, James Mintz, Michel L. Tremblay, Mario B. Marrero, David J. Fulton, and David W. Stepp. 2009. “Protein Tyrosine Phosphatase 1B, a Major Regulator of Leptin-Mediated Control of Cardiovascular Function.” *Circulation* 120(9):753–63. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.853077>.

Berenyiova, Andrea, Ima Dovinova, Miroslava Kvandova, Frantisek Kristek, Eugene Jansen, Miroslava Majzunova, and Sona Cacanyiova. 2018. “The Effect of Chronic NO Synthase Inhibition on the Vasoactive and Structural Properties of Thoracic Aorta, NO Synthase Activity,

and Oxidative Stress Biomarkers in Young SHR.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018: 2502843. <https://doi.org/10.1155/2018/2502843>.

Bhatta, Anil, Lin Yao, Zhimin Xu, Haroldo A. Toque, Jijun Chen, Reem T. Atawia, Abdelrahman Y. Fouda, et al. 2017. “Obesity-Induced Vascular Dysfunction and Arterial Stiffening Requires Endothelial Cell Arginase 1.” *Cardiovascular Research* 113 (13): 1664–76. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx164>.

Boerrigter, Guido, and John C. Burnett. 2007. “Nitric Oxide-Independent Stimulation of Soluble Guanylate Cyclase with BAY 41-2272 in Cardiovascular Disease.” *Cardiovascular Drug Reviews* 25 (1): 30–45. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3466.2007.00003.x>.

Breitenstein, Stefanie, Lothar Roessig, Peter Sandner, and Kelly S. Lewis. 2017. “Novel SGC Stimulators and SGC Activators for the Treatment of Heart Failure.” *Handbook of Experimental Pharmacology* 243: 225–47. [https://doi.org/10.1007/164\\_2016\\_100](https://doi.org/10.1007/164_2016_100).

El-Bassossy, Hany M., Nora Dsokey, and Ahmed Fahmy. 2014. “Characterization of Vascular Complications in Experimental Model of Fructose-Induced Metabolic Syndrome.” *Toxicology Mechanisms and Methods* 24 (8): 536–43. <https://doi.org/10.3109/15376516.2014.945109>.

Fernandes, Tiago, Camila V. Gomes-Gatto, Noemy P. Pereira, Yahya R. Alayafi, Vander J. das Neves, and Edilamar M. Oliveira. 2017. “NO Signaling in the Cardiovascular System and Exercise.” *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1000: 211–45. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-4304-8\\_13](https://doi.org/10.1007/978-981-10-4304-8_13).

Galassi, Andrea, Kristi Reynolds, and Jiang He. 2006. “Metabolic Syndrome and Risk of Cardiovascular Disease: A Meta-Analysis.” *The American Journal of Medicine* 119 (10): 812–19. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.02.031>.

Gamboa, Alfredo, Luis E. Okamoto, André Diedrich, Leena Choi, David Robertson, Ginnie Farley, Sachin Paranjape, and Italo Biaggioni. 2012. “Sympathetic Activation and Nitric Oxide Function in Early Hypertension.” *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 302 (7): H1438-1443. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01020.2011>.

Hoffmann, Linda S., Jennifer Etzrodt, Lena Willkomm, Abhishek Sanyal, Ludger Scheja, Alexander W. C. Fischer, Johannes-Peter Stasch, et al. 2015. “Stimulation of Soluble Guanylyl Cyclase Protects against Obesity by Recruiting Brown Adipose Tissue.” *Nature Communications* 6 (May): 7235. <https://doi.org/10.1038/ncomms8235>.



Jiang, Cheng, Aude Carillion, Na Na, Audrey De Jong, Sarah Feldman, Jean-Marc Lacorte, Dominique Bonnefont-Rousselot, Bruno Riou, and Julien Amour. 2015. "Modification of the  $\beta$ -Adrenoceptor Stimulation Pathway in Zucker Obese and Obese Diabetic Rat Myocardium." *Critical Care Medicine* 43 (7): e241-249. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000999>.

Kanso, Hassan, Mohamed Yassine Mallem, Hanitra Rabesona, Chantal Thorin, Thomas Haertle, Jean-Marc Chobert, François Guerrero, and Jean-Claude Desfontis. 2014. "Vasorelaxant Effects of Camel and Bovine Casein Hydrolysates in Rat Thoracic Aorta and Mesenteric Artery." *International Dairy Journal* 39 (1): 113–20. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.05.004>.

Khaddaj Mallat, Rayan, Cini Mathew John, Dylan J. Kendrick, and Andrew P. Braun. 2017. "The Vascular Endothelium: A Regulator of Arterial Tone and Interface for the Immune System." *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 54 (7–8): 458–70. <https://doi.org/10.1080/10408363.2017.1394267>.

Kim, Bumjung, Kwang-Woo Kim, Somin Lee, Cheolmin Jo, Kyungjin Lee, Inhye Ham, and Ho-Young Choi. 2019. "Endothelium-Dependent Vasorelaxant Effect of Prunus Persica Branch on Isolated Rat Thoracic Aorta." *Nutrients* 11 (8). <https://doi.org/10.3390/nu11081816>.

Kim, G. W., J. E. Lin, E. S. Blomain, and S. A. Waldman. 2014. "Antiobesity Pharmacotherapy: New Drugs and Emerging Targets." *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 95 (1): 53–66. <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.204>.

Kobayashi, Tsuneo, Kumiko Taguchi, Takenouchi Yasuhiro, Takayuki Matsumoto, and Katsuo Kamata. 2004. "Impairment of PI3-K/Akt Pathway Underlies Attenuated Endothelial Function in Aorta of Type 2 Diabetic Mouse Model." *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 44 (6): 956–62. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000147559.10261.a7>.

La Russa, Daniele, Francesca Giordano, Alessandro Marrone, Maddalena Parafati, Elzbieta Janda, and Daniela Pellegrino. 2019. "Oxidative Imbalance and Kidney Damage in Cafeteria Diet-Induced Rat Model of Metabolic Syndrome: Effect of Bergamot Polyphenolic Fraction." *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 8 (3). <https://doi.org/10.3390/antiox8030066>.

Lehnen, Alexandre M., Bruno Rodrigues, Maria Cláudia Irigoyen, Kátia De Angelis, and Beatriz D'Agord Schaan. 2013. "Cardiovascular Changes in Animal Models of Metabolic Syndrome." *Journal of Diabetes Research* 2013: 761314. <https://doi.org/10.1155/2013/761314>.

Lima-Leopoldo, Ana Paula, André S. Leopoldo, Mário M. Sugizaki, Alessandro Bruno, André F. Nascimento, Renata A. M. Luvizotto, Silvio A. de Oliveira Júnior, Edson Castardeli, Carlos R. Padovani, and Antonio C. Cicogna. 2011. "Myocardial Dysfunction and Abnormalities in Intracellular Calcium Handling in Obese Rats." *Arquivos Brasileiros De Cardiologia* 97 (3): 232–40.

Lyoussi, Badiia, Khadija Cherkaoui-Tangi, Nicole Morel, and Maurice Wibo. 2018. "Characterization of Vascular Dysregulation in Meriones Shawi after High-Calorie Diet Feeding." *Clinical and Experimental Hypertension (New York, N.Y.: 1993)* 40 (4): 353–62. <https://doi.org/10.1080/10641963.2017.1377219>.

Matthews, V. B., R. Hollingshead, H. Koch, K. D. Croft, and N. C. Ward. 2018. "Long-Term Dietary Nitrate Supplementation Does Not Prevent Development of the Metabolic Syndrome in Mice Fed a High-Fat Diet." *International Journal of Endocrinology* 2018: 7969750. <https://doi.org/10.1155/2018/7969750>.

Miesel, Anja, Helge Müller, Margot Thermann, Marc Heidbreder, Peter Dominiak, and Walter Raasch. 2010. "Overfeeding-Induced Obesity in Spontaneously Hypertensive Rats: An Animal Model of the Human Metabolic Syndrome." *Annals of Nutrition & Metabolism* 56 (2): 127–42. <https://doi.org/10.1159/000278748>.

Mitschke, Michaela M., Linda S. Hoffmann, Thorsten Gnad, Daniela Scholz, Katja Kruthoff, Peter Mayer, Bodo Haas, Antonia Sassmann, Alexander Pfeifer, and Ana Kilic. 2013. "Increased CGMP Promotes Healthy Expansion and Browning of White Adipose Tissue." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27 (4): 1621–30. <https://doi.org/10.1096/fj.12-221580>.

Mongillo, Marco, Carlo G. Tocchetti, Anna Terrin, Valentina Lissandron, York-Fong Cheung, Wolfgang R. Dostmann, Tullio Pozzan, et al. 2006. "Compartmentalized Phosphodiesterase-2 Activity Blunts Beta-Adrenergic Cardiac Inotropy via an NO/CGMP-Dependent Pathway." *Circulation Research* 98 (2): 226–34. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000200178.34179.93>.

Oliveira Junior, Silvio A., Maeli Dal Pai-Silva, Paula F. Martinez, Ana P. Lima-Leopoldo, Dijon H. S. Campos, André S. Leopoldo, Marina P. Okoshi, Katashi Okoshi, Carlos R. Padovani, and Antonio C. Cicogna. 2010. "Diet-Induced Obesity Causes Metabolic, Endocrine and Cardiac Alterations in Spontaneously Hypertensive Rats." *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 16 (12): BR367-373.

O'Neill, S., and L. O'Driscoll. 2015. "Metabolic Syndrome: A Closer Look at the Growing Epidemic and Its Associated Pathologies." *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity* 16 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1111/obr.12229>.

Oudot, Alexandra, Delphine Behr-Roussel, Olivier Le Coz, Sarah Poirier, Jacques Bernabe, Laurent Alexandre, and François Giuliano. 2010. "How Does Chronic Sildenafil Prevent Vascular Oxidative Stress in Insulin-Resistant Rats?" *The Journal of Sexual Medicine* 7 (1 Pt 1): 79–88. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2009.01551.x>.

Pardo, Fabián, Mario Subiabre, Gonzalo Fuentes, Fernando Toledo, Luis Silva, Roberto Villalobos-Labra, and Luis Sobrevia. 2019. "Altered Foetoplacental Vascular Endothelial Signalling to Insulin in Diabetes." *Molecular Aspects of Medicine* 66 (April): 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.02.003>.

Pathak, Priya, Jitendra S. Kanshana, BabuNageswar Kanuri, Sanjay C. Rebello, Hobby Aggarwal, Kumaravelu Jagavelu, and Madhu Dikshit. 2019. "Vasoreactivity of Isolated Aortic Rings from Dyslipidemic and Insulin Resistant Inducible Nitric Oxide Synthase Knockout Mice." *European Journal of Pharmacology* 855 (July): 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.05.005>.

Potenza, Maria A., Flora L. Marasciulo, Delia Mitolo Chieppa, Giovanni Siro Brigiani, Gloria Formoso, Michael J. Quon, and Monica Montagnani. 2005. "Insulin Resistance in Spontaneously Hypertensive Rats Is Associated with Endothelial Dysfunction Characterized by Imbalance between NO and ET-1 Production." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 289 (2): H813-822. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00092.2005>.

Prawez, Shahid, Azad Ahmad Ahanger, Thakur Uttam Singh, Santosh Kumar Mishra, Souvendra Nath Sarkar, and Dinesh Kumar. 2016. "BAY 41-2272 Treatment Improves Acetylcholine-Induced Aortic Relaxation in L-NAME Hypertensive Rats." *The International Journal of Angiology: Official Publication of the International College of Angiology, Inc* 25 (4): 235–40. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1579625>.

Reaven, G. M., and H. Chang. 1991. "Relationship between Blood Pressure, Plasma Insulin and Triglyceride Concentration, and Insulin Action in Spontaneous Hypertensive and Wistar-Kyoto Rats." *American Journal of Hypertension* 4 (1 Pt 1): 34–38. <https://doi.org/10.1093/ajh/4.1.34>.

Sampey, Brante P., Amanda M. Vanhose, Helena M. Winfield, Alex J. Freerman, Michael J. Muehlbauer, Patrick T. Fueger, Christopher B. Newgard, and Liza Makowski. 2011. "Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome with Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet." *Obesity (Silver Spring, Md.)* 19 (6): 1109–17. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.18>.

Sauvaget, Frédérique, Mohamed Yassine Mallem, Véronique Bucas, Marc Gogny, Jean-Claude Desfontis, and Jacques Noireaud. 2010. "Positive Influence of AT(1) Receptor Antagonism upon the Impaired Celiprolol-Induced Vasodilatation in Aorta from Spontaneously Hypertensive Rats." *European Journal of Pharmacology* 644 (1–3): 169–75. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.07.003>.

Shayo, Sigfrid Casmir, Shigeru Kawade, Kazuma Ogiso, and Nishio Yoshihiko. 2019. "Strategies to Ameliorate Endothelial Dysfunction Associated with Metabolic Syndrome, Where Are We?" *Diabetes & Metabolic Syndrome* 13 (3): 2164–69. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.05.005>.

Silva, Josiane F., Izabella C. Correa, Thiago F. Diniz, Paulo M. Lima, Roger L. Santos, Steyner F. Cortes, Cândido C. Coimbra, and Virginia S. Lemos. 2016. "Obesity, Inflammation, and Exercise Training: Relative Contribution of INOS and ENOS in the Modulation of Vascular Function in the Mouse Aorta." *Frontiers in Physiology* 7: 386. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00386>.

Skrzypiec-Spring, Monika, Bartosz Grotthus, Adam Szelag, and Richard Schulz. 2007. "Isolated Heart Perfusion According to Langendorff---Still Viable in the New Millennium." *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 55 (2): 113–26. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.05.006>.

Stasch, Johannes-Peter, Pál Pacher, and Oleg V. Evgenov. 2011. "Soluble Guanylate Cyclase as an Emerging Therapeutic Target in Cardiopulmonary Disease." *Circulation* 123 (20): 2263–73. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.981738>.

Thorin, Chantal, Mohamed Yassine Mallem, Jacques Noireaud, Marc Gogny, and Jean-Claude Desfontis. 2010. "Nonlinear Mixed Effects Models Applied to Cumulative Concentration-Response Curves." *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 62 (3): 339–45. <https://doi.org/10.1211/jpp.62.03.0008>.

Thorp, Alicia A., and Markus P. Schlaich. 2015. "Relevance of Sympathetic Nervous System Activation in Obesity and Metabolic Syndrome." *Journal of Diabetes Research* 2015: 341583. <https://doi.org/10.1155/2015/341583>.

Tziomalos, K., V. G. Athyros, A. Karagiannis, and D. P. Mikhailidis. 2010. "Endothelial Dysfunction in Metabolic Syndrome: Prevalence, Pathogenesis and Management." *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD* 20 (2): 140–46. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2009.08.006>.

Vendrame, Stefano, Aleksandra S. Kristo, Dale A. Schuschke, and Dorothy Klimis-Zacas. 2014. "Wild Blueberry Consumption Affects Aortic Vascular Function in the Obese Zucker Rat." *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme* 39 (2): 255–61. <https://doi.org/10.1139/apnm-2013-0249>.

Yang, A.-L., J.-I. Chao, and S.-D. Lee. 2007. "Altered Insulin-Mediated and Insulin-like Growth Factor-1-Mediated Vasorelaxation in Aortas of Obese Zucker Rats." *International Journal of Obesity (2005)* 31 (1): 72–77. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803364>.

Yu, J., B. Zhang, X.-L. Su, R. Tie, P. Chang, X.-C. Zhang, J.-B. Wang, et al. 2016. "Natriuretic Peptide Resistance of Mesenteric Arteries in Spontaneous Hypertensive Rat Is Alleviated by Exercise." *Physiological Research* 65 (2): 209–17.

Zanfolin, Marcos, Renato Faro, Eugênio G. Araujo, Ana Maria Aparecida Guaraldo, Edson Antunes, and Gilberto De Nucci. 2006. "Protective Effects of BAY 41-2272 (SGC Stimulator) on Hypertension, Heart, and Cardiomyocyte Hypertrophy Induced by Chronic L-NAME Treatment in Rats." *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 47 (3): 391–95. <https://doi.org/fjc.0000210071.54828.9b>.

Zhao, Claire Y., Joseph L. Greenstein, and Raimond L. Winslow. 2015. "Interaction between Phosphodiesterases in the Regulation of the Cardiac  $\beta$ -Adrenergic Pathway." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 88 (November): 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.09.011>.

## Figures and legends

**Fig 1: Follow up body weight gain (A) and abdominal circumference (B) during the 12 weeks of CD or standard diet.** Compared to control group, CD-fed group had a higher weight gain and an increased abdominal circumference. Data are expressed as mean  $\pm$ SEM. \* $p$ <0.05 compared with the Control group by LME model.

**Fig 2: Effects of CD feeding and BAY 41-2272 chronic treatment on (A) Systolic arterial blood pressure and (B) Diastolic arterial blood pressure.** After CD feeding, both systolic and diastolic arterial blood pressures further increased in comparison with control rats but significantly decreased after long-term treatment with BAY 41-2272. Data are presented as mean  $\pm$ SEM. ‘\*’ and ‘\*\*’ indicate a significant difference ( $p$ <0.05 and  $p$ <0.01 respectively *Vs* CD group).

**Fig 3: Intraperitoneal glucose tolerance test performed at the end of experimental protocol in all groups.** AUC were calculated using Graph Pad Prism Version 5. \* $p$ <0.05 *Vs* CD

**Fig 4: Effect of BAY 41-2272 chronic treatment on cardiac reactivity.** Cardiac inotropy determined by LVDevP (A) and coronary vasodilation evaluated using coronary perfusion pressure variation (B). Chronic treatment with BAY 41-2272 significantly improved both cardiac contractility and coronary vasodilation in CD-fed rats. Values are expressed as mean  $\pm$ SEM. Comparison was performed using LME model. (A) \* $p$ <0.001 *Vs* CD. (B) \* $p$ <0.05 *Vs* CD, \*\* $p$ <0.001 *Vs* CD.

**Fig 5: Cumulative-concentration response curve to phenylephrine in thoracic aortic rings.** (A) in the absence of aminoguanidine. (B) in the presence of aminoguanidine. Data are expressed as mean  $\pm$ SEM. Comparison was performed using a NLME model. (A) \* $p$ <0.001 *Vs* CD. (B) \* $p$ <0.001 *Vs* CD

**Fig 6: Cumulative-concentration response curve to insulin in thoracic aortic rings.** (A) in the absence of BQ-123, (B) in the presence of BQ-123. Data are presented as mean  $\pm$ SEM. comparison was performed using LME model. (A) \* $p$ <0.05 *Vs* CD. (B) \* $p$ <0.01 *Vs* CD

**Fig 7: Evaluation of dependent and independent endothelium vasorelaxation.** (A) cumulative-concentration response curves to acetylcholine. (B) cumulative concentration response curves to SNP. Data are expressed as mean  $\pm$ SEM compared using NLME model.

**Fig 8: Evaluation of iNOS expression (A) and eNOS expression (B) in thoracic aorta.** Control group (n = 4), CD-fed group (n = 3) and CD-fed group treated with BAY 41-2272 (n=3). Values were represented as mean  $\pm$  SEM of mean fluorescence intensity (U.I.). \*p<0.05 *Vs* control group determined by nonparametric Mann-Whitney test.

Fig 1A

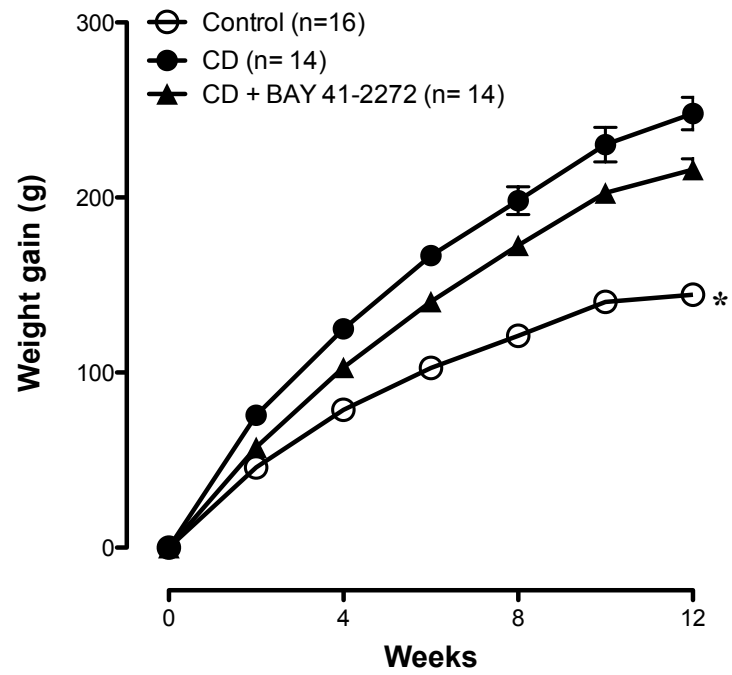


Fig 1B

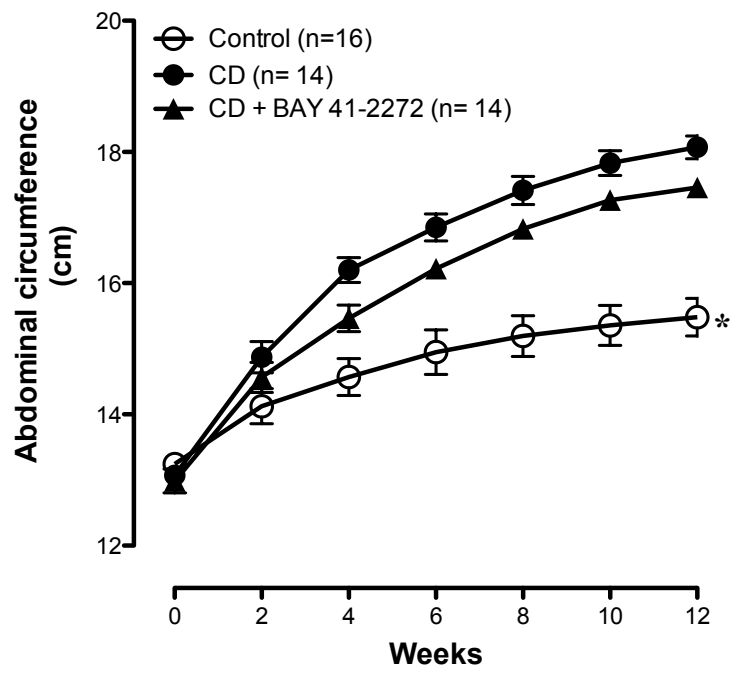




Fig 2A

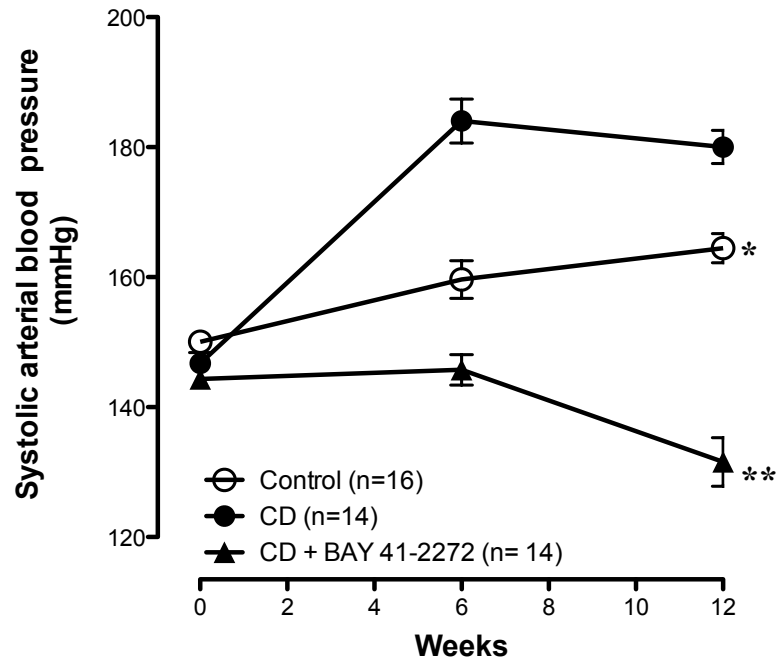


Fig 2B

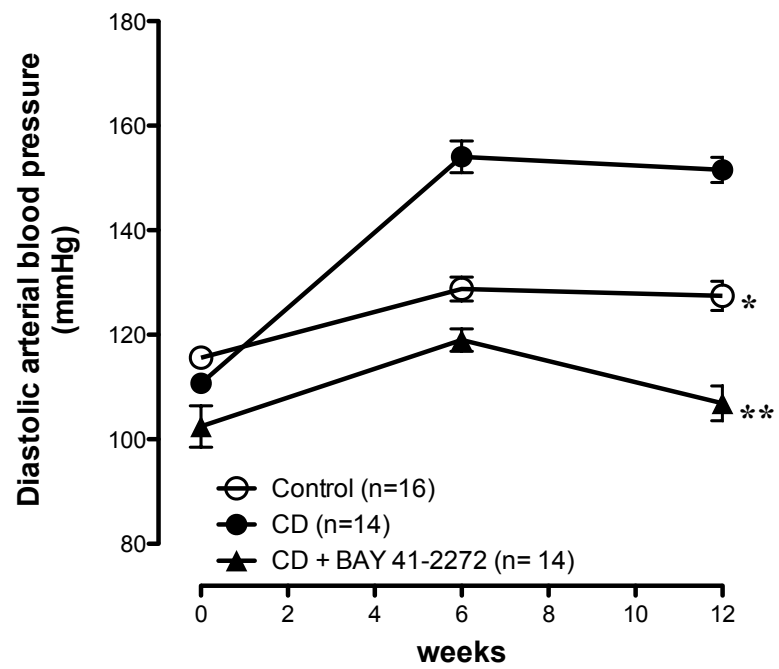


Fig 3

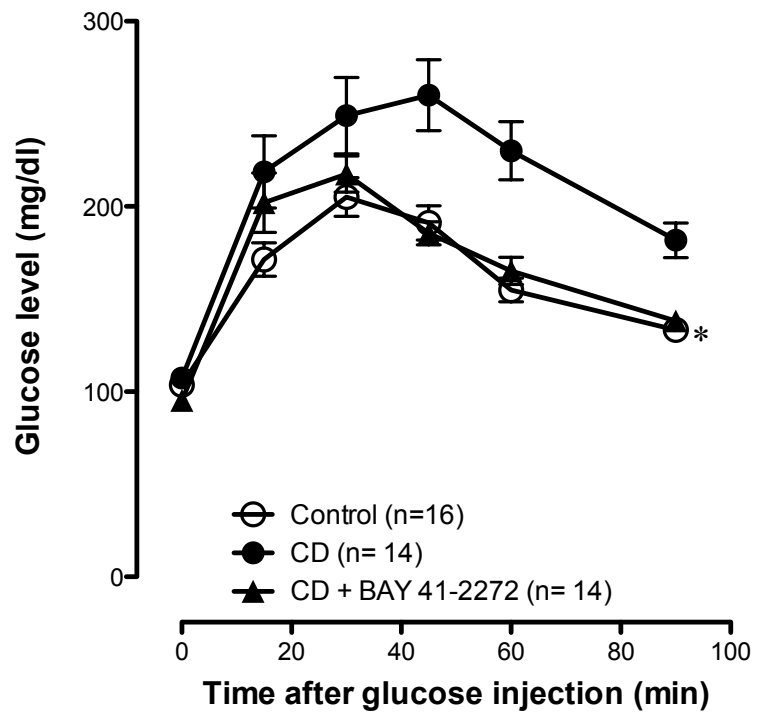


Fig 4A

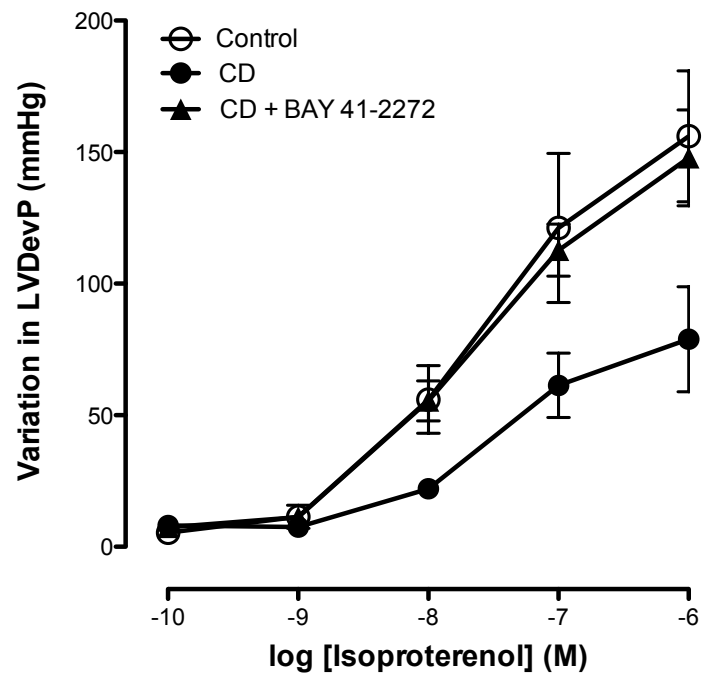


Fig 4B

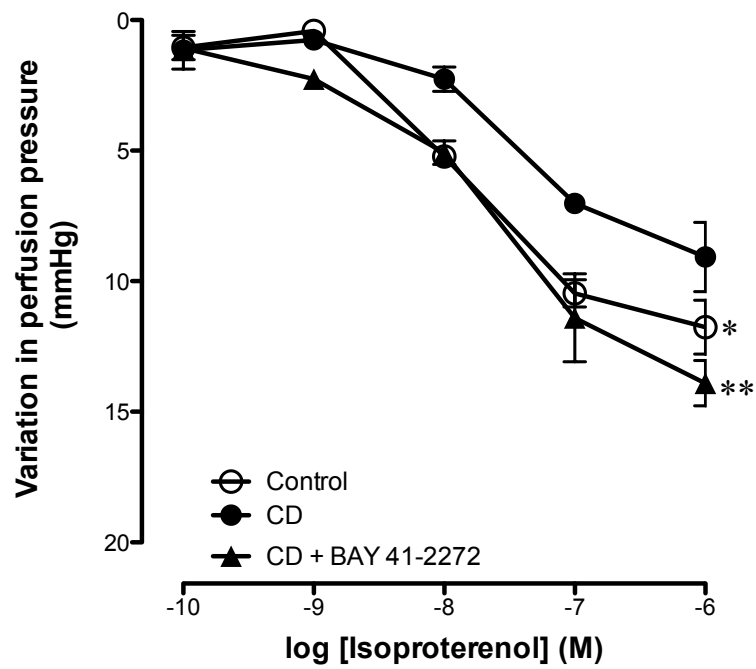


Fig 5A

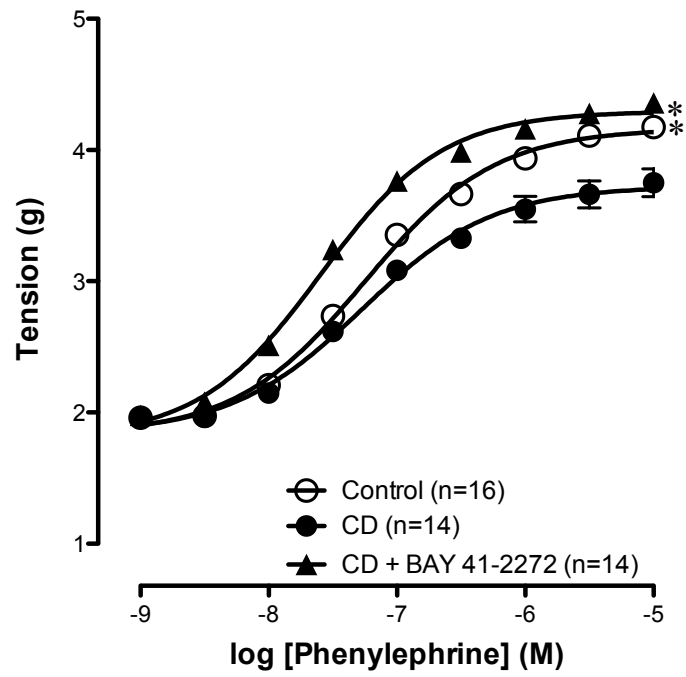


Fig 5B

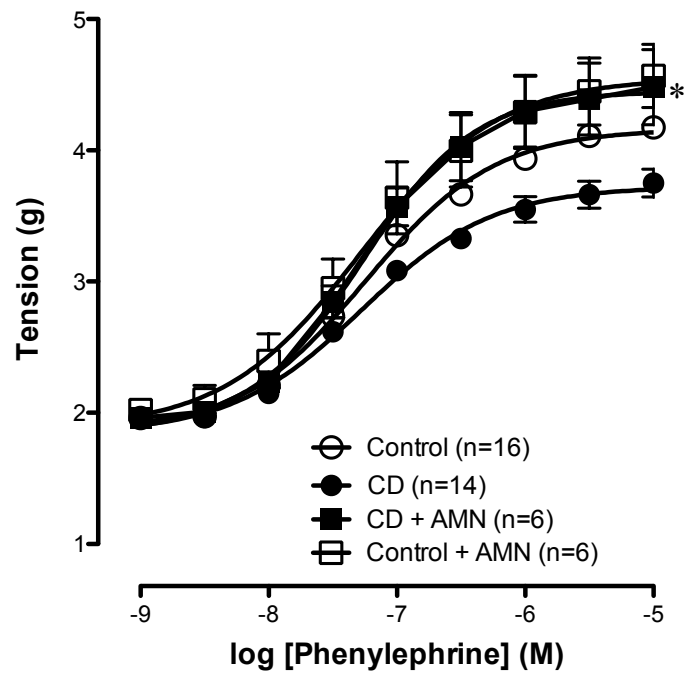


Fig 6A

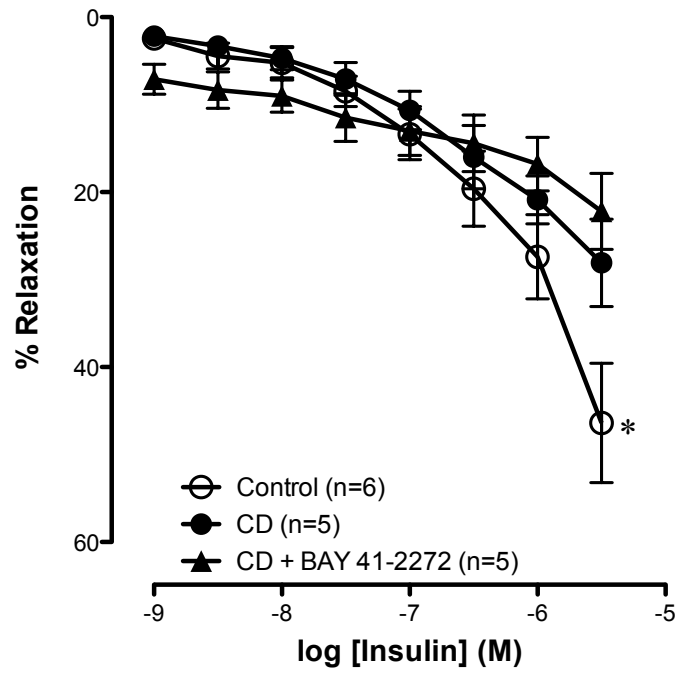


Fig 6B

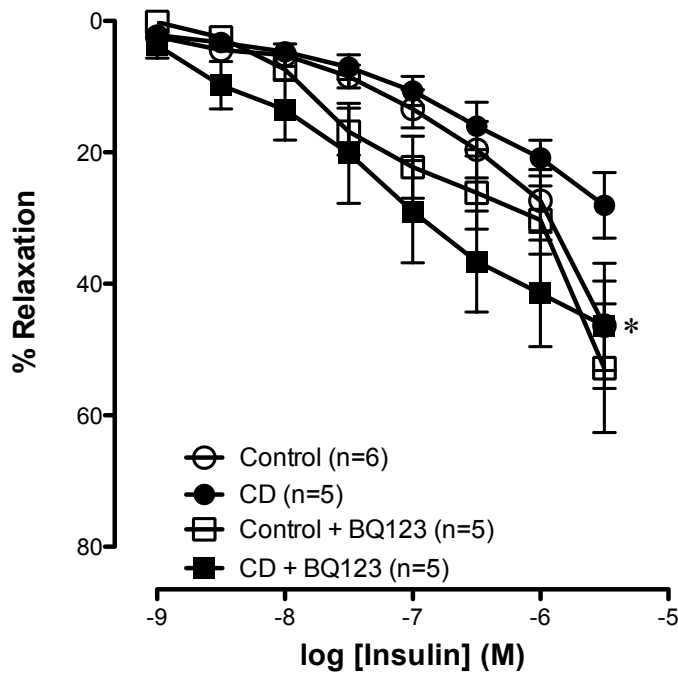


Fig 7A

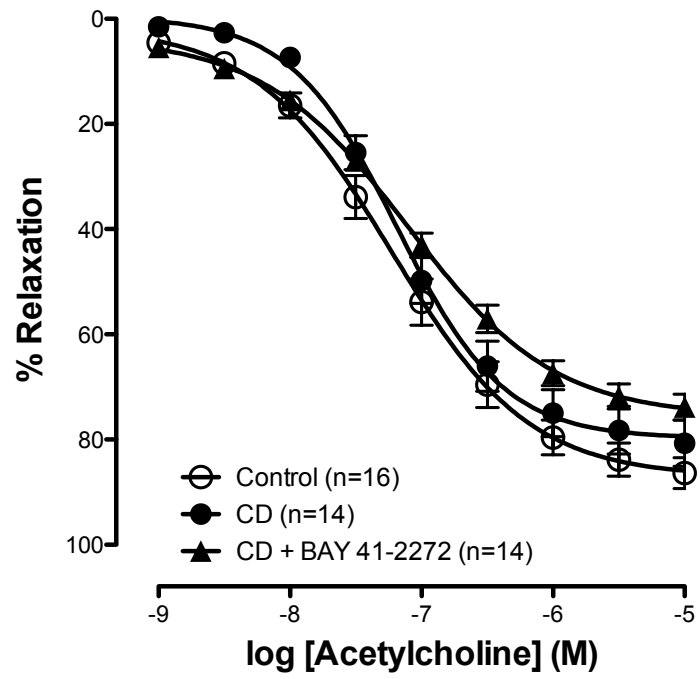
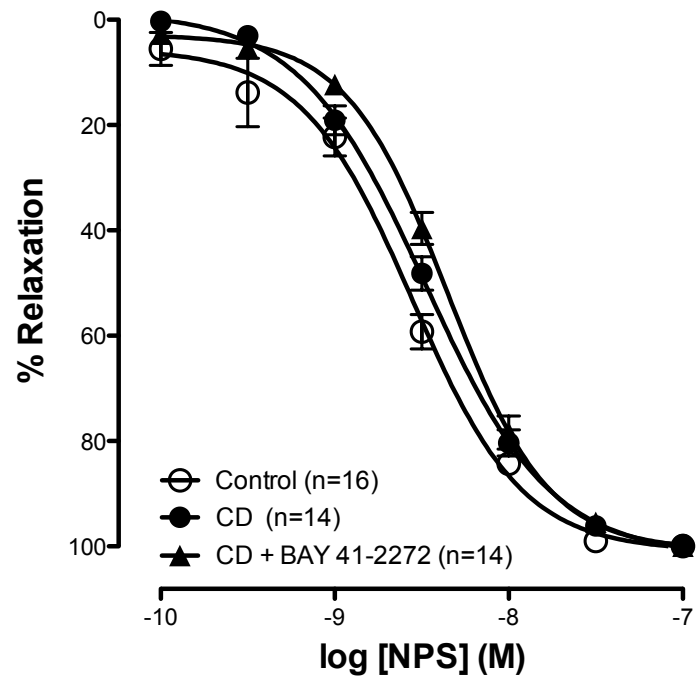
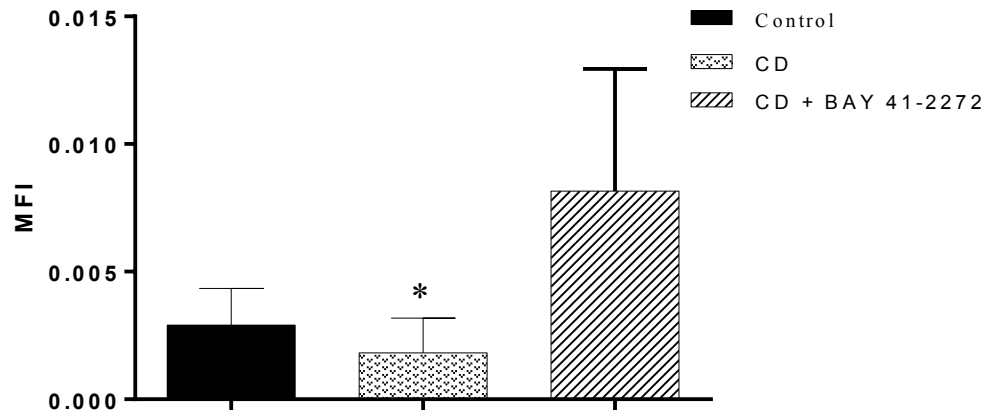


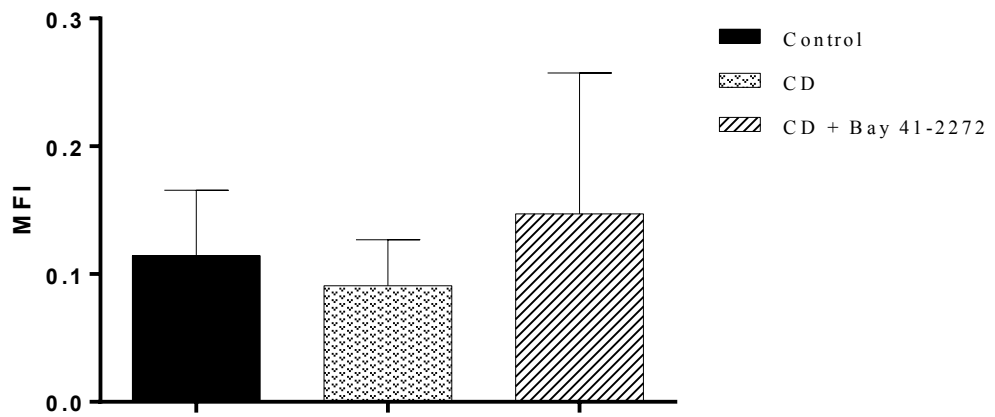
Fig 7B



**Fig 8A**



**Fig 8B**



### **Article 3: Cardiovascular and metabolic effects of chronic treatment with mirabegron in spontaneously hypertensive rats after cafeteria-diet feeding**

**Yosra Doghri <sup>1\*</sup>, Laurence Dubreil <sup>2</sup>, Romain Fleurisson <sup>2</sup>, Chantal Thorin <sup>1</sup>, M. Yassine Mallem <sup>1</sup>, Jean-Claude Desfontis <sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> UPSP NP3 (2017.B146), Nutrition, Pathophysiology and Pharmacology, Oniris, College of Veterinary Medicine, Food Sciences and Engineering, Atlanpôle – La Chantrerie, BP 40706, 44307 Nantes, France.

<sup>2</sup> INRA UMR U703, PAnTher, oniris, College of Veterinary Medicine, Food Sciences and Engineering, Atlanpôle- La Chantrerie, BP 40706, 44307 Nantes, France

**\* Correspondence:**

Corresponding Author:

[yosra.doghri@oniris-nantes.fr](mailto:yosra.doghri@oniris-nantes.fr)



## Abstract

### Introduction

Mirabegron is the first  $\beta_3$ -adrenoceptor agonist drug that is approved for the management of overactive bladder. It has also been recently introduced as a potential therapeutic mean for obesity. However, its effects on cardiovascular function of spontaneously hypertensive rats (SHR) with metabolic syndrome are not well known so far.

### Objective

The aim of this study is to investigate the effects of 12 weeks administration of mirabegron (5mg/kg) on metabolic and cardiovascular profiles of cafeteria diet (CD)-fed SHR.

### Method

Eight-week old male SHR were randomly divided into 3 groups: Control group, CD-fed group and CD-fed group receiving a daily oral dose of mirabegron (5mg/Kg) for 12 weeks. A follow-up of the body weight gain and the abdominal circumference was carried out weekly. Measurements of arterial blood pressure and glucose tolerance test were also performed. At the 12<sup>th</sup> week of the experimental protocol, cumulative-concentration curves were determined on isolated perfused heart [isoproterenol (0.1nM - 1 $\mu$ M)] and on thoracic aorta [phenylephrine (1nM – 10  $\mu$ M), acetylcholine (1nM – 10  $\mu$ M), insulin (1nM – 3 $\mu$ M) and sodium nitroprusside (SNP) (0.1nM – 0.1 $\mu$ M)]. cGMP assays and immunohistochemical analysis were performed on thoracic aorta samples.

### Results

We showed that 12 weeks of CD feeding induced the typical signs of the metabolic syndrome in CD-fed group including abdominal obesity, hypertriglyceridemia, arterial hypertension and glucose intolerance. These metabolic alterations were associated with a decrease in  $\beta$ -adrenoceptor-induced cardiac inotropy and coronary vasodilation, a reduced vasoconstrictive response to phenylephrine and a reduced insulin-induced relaxation of thoracic aorta. Chronic treatment with mirabegron improved arterial pressure and glucose tolerance and tended to reduce excessive weight gain. Moreover, mirabegron significantly restored cardiac contractility and tended to enhance insulin-mediated vasorelaxation. However, no difference in acetylcholine or SNP-induced vasorelaxation was detected between the different groups. Similarly, neither the cGMP nor the immunohistochemical analysis showed any difference between the 3 groups.

## Conclusion

The main results showed protective cardiovascular effects of mirabegron, making  $\beta_3$ -adrenoceptor activation a promising option to consider during metabolic syndrome.

**Key words: metabolic syndrome, Cafeteria diet, SHR,  $\beta_3$ - adrenoceptor, cardiovascular reactivity**

## Introduction

Nowadays, cardiovascular disease is the most common cause of morbidity and mortality worldwide (Said et al. 2016). The metabolic syndrome has been widely described as closely related to risks of developing cardiovascular diseases and type 2 diabetes (Grundy et al. 2004). It is defined as a cluster of metabolic abnormalities that include hypertension, central obesity, insulin resistance, glucose intolerance and dyslipidaemia (Rochlani et al. 2017). In addition to genetic and environmental factors, sedentary lifestyle and extra caloric intake play a crucial role in the onset of the metabolic syndrome and associated alterations (Samson and Garber 2014). To date, mechanisms of the underlying pathophysiology of metabolic syndrome are not well elucidated yet. However, several hypothesized mechanisms have been postulated and the most accepted are central obesity and insulin resistance (McCracken et al. 2018). The visceral fat component of abdominal obesity contributes not only to insulin resistance but further promotes dyslipidaemia through the release of nonesterified free fatty acids from adipose tissue (Sherling et al. 2017). Impaired nitric oxide (NO)-soluble guanylate cyclase (sGC) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) has been implicated in the pathogenesis of vascular dysfunction associated with metabolic syndrome (Goulopoulou et al. 2015). Efforts to directly target this signalling pathway have led to the development of  $\beta_3$ -adrenoceptor agonists.  $\beta_3$ -adrenoceptor has been recently identified in cardiac myocytes and endothelial cells from human and other animal species where its activation increases the production of NO and intracellular cGMP through activation of NOS pathway (Gauthier et al. 1998a; Balligand 2016). Moreover, Mallem et al. (2004) showed an up regulation of  $\beta_3$ -adrenoceptors in SHR. Recently, insulin sensitizing effects and improved glucose tolerance have also been reported in high-fat diet-induced obese mice treated with mirabegron (Hao et al. 2019a). This suggests beneficial metabolic effects of mirabegron during obesity. Furthermore, it has been shown that  $\beta_3$ -adrenoceptor activation increases lipolysis in white adipose tissue and increases thermogenesis in brown adipose tissue contributing to prevent the development and severity of obesity and type II diabetes (Dehvari et al. 2018). However, to date, no  $\beta_3$ -adrenoceptor agonist has passed beyond phase 2 clinical trials for the treatment of metabolic disorders.

Mirabegron is the first  $\beta_3$ -adrenoceptor agonist to have received approval for use in overactive bladder syndrome (Wu et al. 2014). From these findings, mirabegron is proposed as an attractive therapeutic approach for metabolic syndrome related diseases. However, to the best of our knowledge, cardiovascular effects of chronic treatment with mirabegron in animal models of metabolic syndrome have not been studied so far.

Thus, the aim of this study is to investigate the metabolic and cardiovascular effects of long-term treatment with mirabegron in CD-fed SHR.

## **Materials and methods**

### Animals

Whole experimental project was approved by local ethics committee for animal experimentation and was conducted in compliance with Institutional Guidelines for the ethical care of animals of Pays de la Loire, France (APAFIS N° 6445).

Eight-week old male spontaneously hypertensive rats (SHR) obtained from Janvier Labs (Le Genest St Isle, France), were used for this study. All rats were housed under a 12-hour light/dark cycle, at a controlled temperature (22°C) and humidity (50%). Rats were fed with a standard chow diet containing 4.5% total fat, 54.2% carbohydrates and 18.5% protein (KLIBA NAFAG®, Kaiseraugst, Germany) with free access to water for 12 weeks. All the animals were acclimatized for at least one week before any experiment.

### Feeding protocols

Rats were randomly divided into 3 groups: Control chow diet-fed rats, Cafeteria diet (CD)-fed rats and CD-fed rats treated daily with mirabegron (5mg/kg) *per os* for 12 weeks.

CD feeding included 6 different commercial varieties of chocolate, cookie candies and cereal bars consisting of 68.3% energy from carbohydrates, 5.83% from protein and 18.2% from total fat. The delivered foods were changed every day to promote hyperphagia and generate obesity.

During the experimental protocol, a follow-up of the body weight and of the abdominal circumference was carried out weekly.

### Systolic and diastolic blood pressures assessment

Systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressures were assessed in awake rats by tail plethysmography (CODA, Kent Scientific Co., Torrington, CT, USA). All animals passed through an adaptation period of one week before the protocol onset.

At least 10 consecutive pressure measurements were needed to obtain a representative value of SBP and DBP for each rat.

### Glucose tolerance test

At the end of the experimental protocol, a glucose tolerance test was performed in overnight-fasted rats (intraperitoneal administration).

A lidocaine application was performed before starting the test in order to anaesthetize the tail vein sampling site.

Blood samples were obtained at 0, 15, 30, 45, 60 and 90 min from tail vein after glucose injection (1g/Kg). Glucose levels were measured using a glucometer (Pura®). The area under the curve (AUC) was calculated using Prism software (GraphPad Prism 5.0).

### Biochemical analysis

A rat insulin ELISA kit (Thermo Fisher Scientific, France) was used to determine insulin levels. Plasma triglycerides and cholesterol levels were measured using an automatic biochemical analyser in the Veterinary University Hospital Center of Oniris, Nantes, France.

### Ex vivo cardiac function

At the 12<sup>th</sup> week, rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (54mg/kg i.p) and sacrificed by exsanguination of abdominal aorta.

Hearts were immediately isolated and immersed in a cold *Krebs-Henseleit* buffer previously filtered (0.2 µm filter funnel) and oxygenated with 95% O<sub>2</sub>- 5% CO<sub>2</sub> gas mixture. *Krebs-Henseleit* buffer composition in mM is: NaCl, 118.3; KCL, 4.7; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; NaHCO<sub>3</sub>, 20; EDTA, 0.016; Glucose, 11.1 and CaCl<sub>2</sub>, 2.5; pH 7.4. The aortic canula was connected to the Langendorff system in order to allow a retrograde perfusion at a constant flow rate of 12 ml/min according to the Langendorff method (Skrzypiec-Spring et al. 2007). Left ventricular contractility was assessed by analysing left ventricular developed pressure (LVDevP). For that purpose, a water-filled latex balloon was inserted into the left ventricle through the mitral valve and connected to a pressure transducer. LVDevP was calculated as the difference between left ventricular systolic pressure and left ventricular end-diastolic pressure. Coronary vasodilation was determined by perfusion pressure variation. Haemodynamic measurements performed during the study included the peak left ventricular developed pressure and coronary flow rate. Each parameter was recorded before and after the addition of increasing concentrations of isoproterenol (1nM - 1µM) and analysed by LabChart® Pro software (V7, ADInstruments, France).

### Vascular reactivity studies

Immediately after the sacrifice, thoracic aorta was removed and placed in ice-cold *Krebs-Henseleit* solution. The aorta was then dissected and cut into rings (2-3 mm long). Aortic rings were mounted in a 10 ml organ bath system containing a *Krebs-Henseleit* solution heated to

37°C and continuously oxygenated with a 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> gas mixture. Isometric tension was detected using a force displacement transducer (EMKA Technologies, Paris, France) and recorded by data acquisition software (iOX, Paris, France) as previously described (Sauvaget et al. 2010).

Briefly, the viability of the endothelium was firstly verified through the relaxation of the aortic rings by at least 60% after acetylcholine addition (1 μM).

Cumulative concentration-response curves (CCRCs) to phenylephrine (1nM-10μM), acetylcholine (1nM-10μM), insulin (1nM- 3μM) and sodium nitroprusside (a nitric oxide donor, 10 nM-0.3 μM) were then constructed in thoracic aortic rings isolated from the different groups. Values were expressed as the percentage relaxation of the phenylephrine-induced precontraction.

#### cGMP levels in thoracic aorta

Isolated thoracic aorta was frozen in liquid nitrogen to avoid cGMP degradation and was kept at -80°C. The samples were then treated with 6% cold trichloroacetic acid and centrifuged at 1500g for 10 min at 4°C.

The supernatant fractions were extracted three times with water saturated diethyl ether (5 volumes of diethyl ether to 1 volume of supernatant). Residual diethyl ether was evaporated by heating samples to 70°C for 5 min. The dried extract was dissolved in an assay buffer and the cGMP concentrations were measured calorimetrically using an immunoenzymatique assay kit (Cayman Chemical Company). Absorbance was read on a spectrophotometer at 405nm. The mean value was calculated from duplicate measurements of each sample and normalized to total cell protein levels previously measured using a protein assay reagent kit (micro BCA-Pierce) (Kanso et al. 2014).

#### Immunofluorescence for eNOS quantification

Thoracic aorta rings were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 4 hours at 4°C. After 3 washings in PBS, the aortic rings were incubated in PBS containing 20% sucrose for one night. Then, they were embedded in tissue Tek OCT medium (Sakura, USA) and frozen by immersion in liquid isopentane and conserved at -80°C. Frozen section (10 μm) were permeabilized with 0.5 % Triton 100X in PBS for 5min and treated with a PBS solution containing 0.5% Triton 100X and 2% bovine serum albumin (BSA) for 1 hour to block the nonspecific antigen binding.

Sections were then incubated in the blocking buffer with a mice monoclonal antibody against eNOS (1 :1000, Abcam, Cambridge, United Kingdom) for one night. After 5 washings of 3 min each in PBS, the sections were incubated with secondary antibody, AlexaFluor 647 donkey anti- mice IgG (1 :300, life Technologies, Saint Aubin, France) or AlexaFluor 555- conjugated donkey anti-rabbit (1 :300, life Technologies, Saint Aubin, France) for 1 hour at room temperature. Slides were mounted in Mowiol (Calbiocgem, San Diego, CA, USA). The immunolabeled sections were scanned using the helium neon laser (448 nm) to observe elastic lamina autofluorescence, and the helium neon laser 633 nm to observe AlexaFluor 647 (eNOS immunolabeling). Acquisitions were performed using a spectral confocal microscope (Zeiss LSM 780, Zeiss, France). Image analysis were performed to evaluate eNOS expression level in the thoracic aorta of all rats by using Fiji Software. Fluorescence Mean Intensity (FMI) values were acquired from 5 different fields of immunolabeled thoracic aorta sections in each condition. The same threshold was used to measure the sum intensity fluorescence of eNOS immunolabelling in each section. Finally, the MFI was reported to total area of analysed section.

### Drugs

Sodium pentobarbital solution was purchased from Ceva, Libourne, France. Phenylephrine hydrochloride, acetylcholine chloride, sodium nitroprusside, human insulin and isoproterenol were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France). Mirabegron (BETMIGA®) is a human medicine.

All drugs were prepared as stock solutions in distilled water except for insulin, which was dissolved in 0.01M hydrochloric acid.

### Statistical analysis

All the results were expressed as a means  $\pm$  SEM of n experiments where n represents the number of rats.

Data of body weight, abdominal circumference and arterial blood pressure were compared using a linear mixed effect (LME) model on R software.

Data of blood parameters (insulin, glucose, triglyceride and cholesterol), cGMP levels and the AUC were compared between groups using One-way ANOVA. When a significant effect was found, *post hoc* multiple comparisons were made using Tukey's *post-hoc* analysis.

For the immunofluorescence analysis, differences were determined using nonparametric Mann-Whitney test.

CCRCs to acetylcholine, phenylephrine, SNP and their parameters (maximum effect:  $E_{max}$ , negative logarithm of the concentration producing 50% of the maximum effect :  $pD_2$ ) were analysed using a non-linear mixed effect (NLME) model using R software (Thorin et al. 2010).

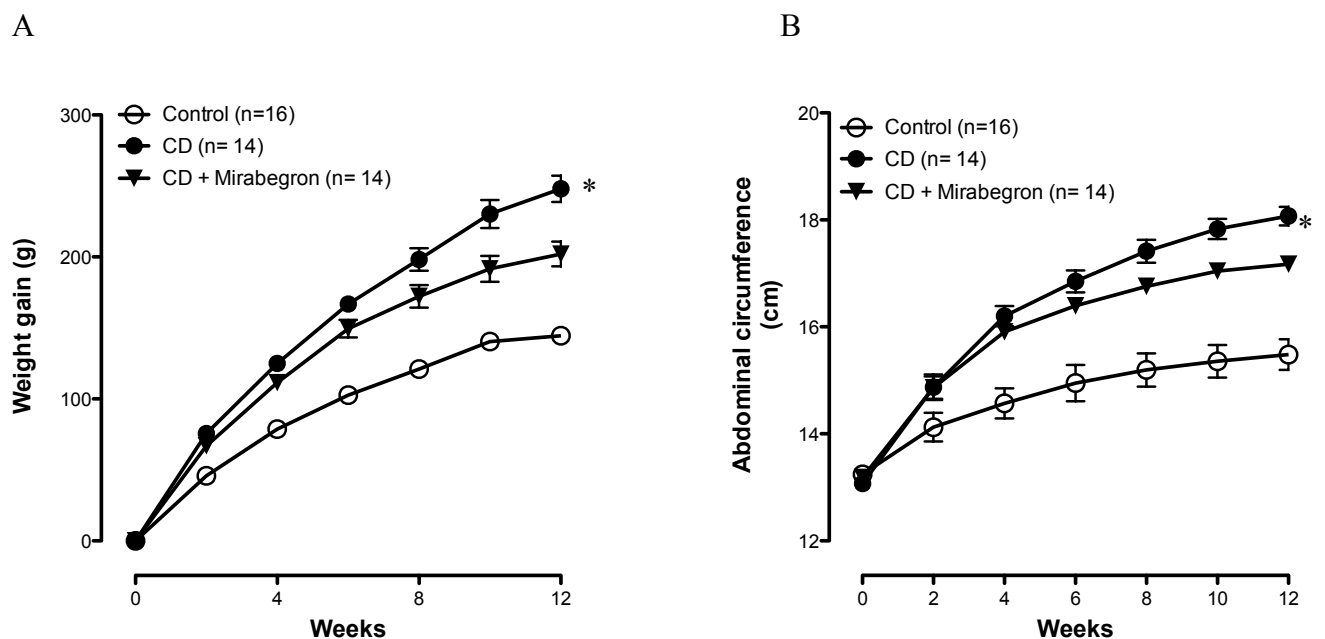
CCRCs to insulin and isoproterenol were analysed using a linear mixed effect (LME) model using R software.

All graphs were performed on Graph Pad Prism® software version 5.0.

## Results

### General parameters

As shown in Fig 1, the increases of the body weight gain ( $248.0 \pm 33.6$  g in CD-fed group,  $144.0 \pm 20.0$  g in control group) and the abdominal circumference ( $18.07 \pm 0.68$  cm in CD-fed group,  $15.48 \pm 0.30$  cm in control group) were significantly higher in the CD-fed group compared to the control group ( $p < 0.05$ ).



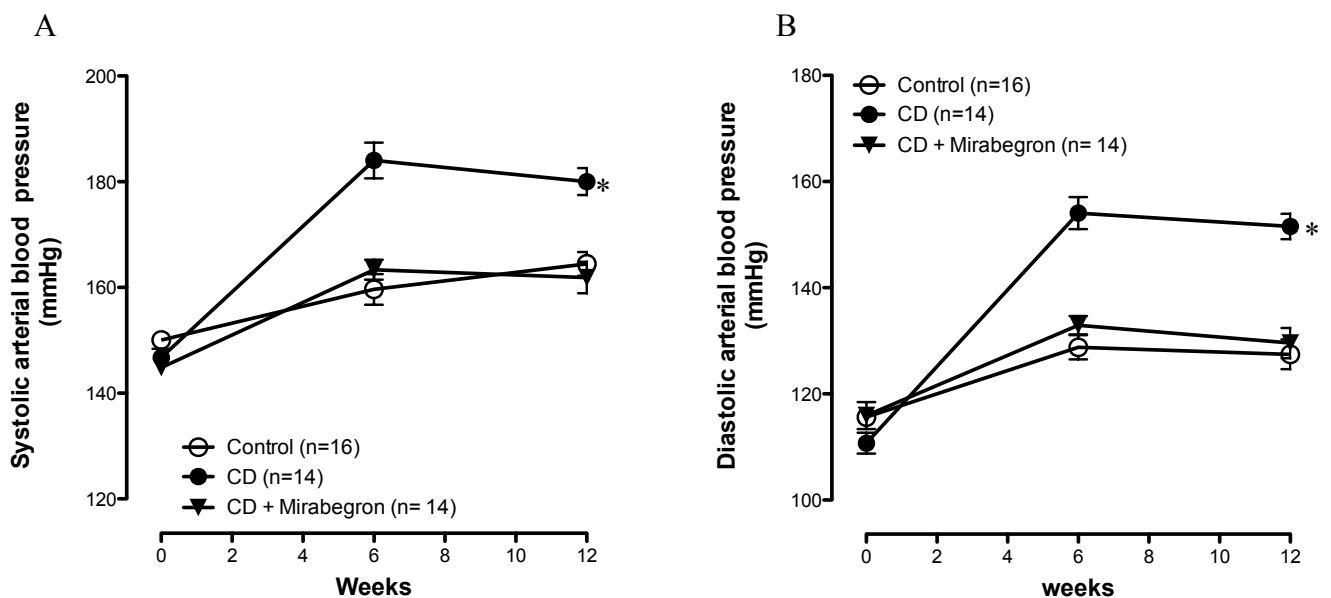
**Fig 1: General parameters assessment: Body weight gain (A) and abdominal circumference (B) during the 12 weeks of CD or standard diet.** Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  compared with the Control group by LME model.

There is no significant difference in the body weight gain between CD-fed group and CD-fed group treated with mirabegron ( $202.1 \pm 27.7$  g in CD-fed group treated with mirabegron vs



248.0 ± 33.6 g in CD-fed group) despite the tendency to decrease weight gain in the group treated with mirabegron (Fig 1).

CD feeding increased significantly SBP of CD-fed rats compared to their littermates assigned to the standard chow diet-fed group (180.0 ± 2.6 mmHg vs 164.4 ± 2.2 mmHg,  $p < 0.05$ ) (Fig 2A). Similar results were observed for DBP (Fig 2B). Mirabegron long-term treatment lowered significantly arterial blood pressure to the control values (161.9 ± 3.0 mmHg vs. 180.0 ± 2.6 mmHg,  $p < 0.05$  SBP in mirabegron-treated group and CD-fed group respectively) (Fig 2). However, there is no significant difference between control group and CD-fed group treated with mirabegron.



**Fig 2: Effects of CD feeding and mirabegron chronic treatment on (A) Systolic arterial blood pressure and (B) Diastolic arterial blood pressure.** CD feeding promoted the increase in both SBP and DBP compared to rats fed with standard chow diet. Chronic treatment with mirabegron decreased the arterial blood pressure to the control values. Data are presented as mean ± SEM. ‘\*’ indicates a significant difference ( $p < 0.05$  vs Control group and CD-fed group treated with mirabegron).

Feeding SHR with CD resulted in increased triglycerides concentration compared to standard chow diet ( $p < 0.001$ ). A strong correlation between body weight gain and blood levels of triglycerides is noted. However, total cholesterol level was lower in the CD-fed group when compared to the control one. Otherwise, there were no significant differences in blood glucose

and insulin levels between the 2 groups. Long-term treatment of CD-fed rats with mirabegron did not reduce hypertriglyceridemia but tended to reduce fasted insulin level compared to the CD-fed group.

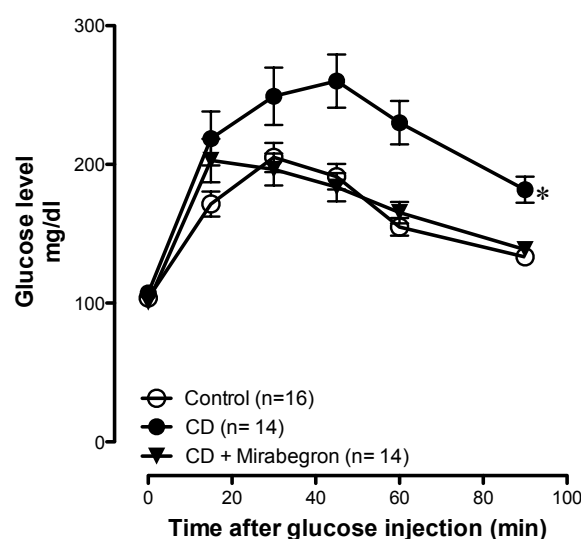
Table 1 : Blood analysis

Parameters	Control	CD	CD + mirabegron
Triglycerides (g/l)	0.79 ± 0.08	1.338 ± 0.16 ***	1.29 ± 0.11
Total cholesterol (g/l)	0.83 ± 0.09	0.62 ± 0.057 *	0.73 ± 0.02
Insulin (µUI/ml)	9.21 ± 1.32	11.83 ± 2.52	7.77 ± 2.06
Glucose (mg/dl)	103.60 ± 2.48	107.30 ± 4.52	100.80 ± 2.62

Fasting blood glucose, insulin, total cholesterol and triglycerides levels measured at the end of experimental protocol. Values are expressed as means ± SEM (\*p<0.05, \*\*\*p<0.001 vs Control group, one-way ANOVA, followed by Tukey multiple comparison test).

#### Intraperitoneal Glucose tolerance test

Glucose tolerance was tested by intraperitoneal injection of glucose (1g/Kg) to all groups. Fasted glycemia was not statistically different between the 3 groups. However, intraperitoneal injection of glucose increased the blood glucose level more significantly in the CD-fed group than in the control group (Fig 3). Chronic treatment with mirabegron improved glucose tolerance as shown in Fig 3. There was a significant reduction in glucose blood level at the time point of 30 min after glucose injection compared to CD-fed rats.



**Fig 3: Intraperitoneal glucose tolerance test performed at the end of experimental protocol in all groups.** AUC were calculated using Graph Pad Prism Version 5. \*p<0.05

### Ex vivo cardiac function

To investigate cardiac effects of chronic treatment with mirabegron, isolated perfused hearts from all groups were used according to Langendorff method. Table 2 shows basal left ventricular developed pressure (LVDevP) and coronary perfusion pressure. At baseline, these 2 parameters were statistically not different between the 3 groups.

Table 2: Basal function of isolated heart

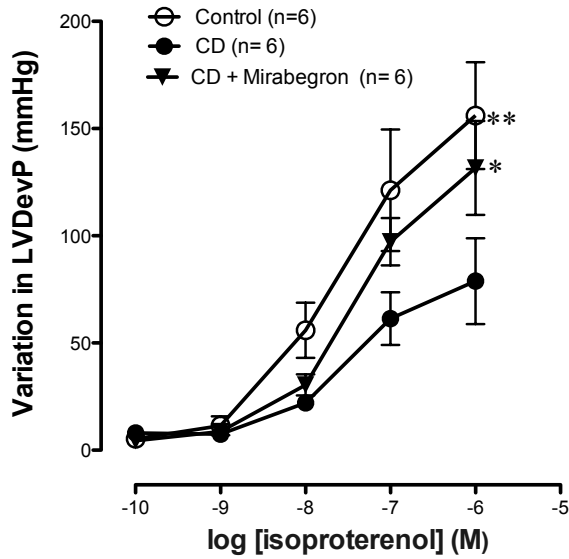
	Control	CD	CD + mirabegron
LVDevP (mmHg)	77.00 ± 8.22	60.55 ± 3.27	78.00 ± 5.87
Coronary perfusion pressure (mmHg)	25.88 ± 1.40	23.73 ± 3.29	25.50 ± 5.5

The hearts were perfused with oxygenated Krebs-Henseleit solution. LVDevP, Left ventricular developed pressure. Values are means ± SEM.

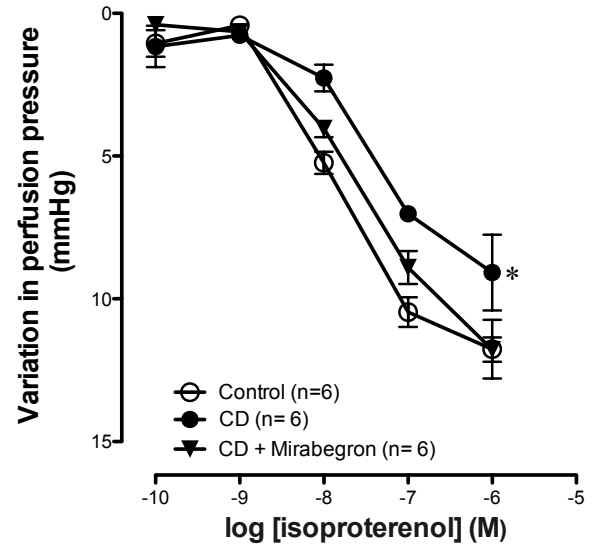
Isoproterenol was used to test whether metabolic syndrome could alter the myocardial response to inotropic interventions. Isoproterenol addition increased both LVDevP and coronary vasodilation in all groups (Fig 4). However, isoproterenol effects were significantly decreased in CD-fed group compared to control group ( $p < 0.001$ ).

Thus, in our rat model of metabolic syndrome, we showed a reduced inotropic response to  $\beta$ -adrenoceptors stimulation and a preserved basal cardiac function. This result suggests an impairment of the  $\beta$ -adrenoceptors-mediated positive inotropic response in this model. Long-term treatment with mirabegron significantly enhanced LV contractility compared to CD-fed rats ( $p < 0.01$ ) (Fig 4A) indicating an improvement in the  $\beta$ -adrenoceptors-induced positive inotropic response in mirabegron-treated rats. Similarly, chronic treatment with mirabegron slightly improved isoproterenol-induced coronary vasodilation compared to CD-fed rats ( $p < 0.05$ ) (Fig 4B). Taken together, these results show an improvement in cardiac  $\beta$ -adrenoceptor-mediated function following *in vivo* chronic mirabegron administration.

A



B



**Fig 4: Effect of mirabegron chronic treatment on: (A) Cardiac inotropy determined by LVDevP and (B) Coronary vasodilation determined *via* coronary perfusion pressure variation.** Chronic treatment with mirabegron significantly improved cardiac contractility and slightly enhanced coronary vasodilation in CD-fed rats. Values are expressed as means  $\pm$  SEM. Comparison was performed using LME model. (A)  $*p < 0.01$ ,  $**p < 0.001$  vs CD-fed group. (B)  $*p < 0.05$  vs control group and CD-fed group treated with mirabegron.

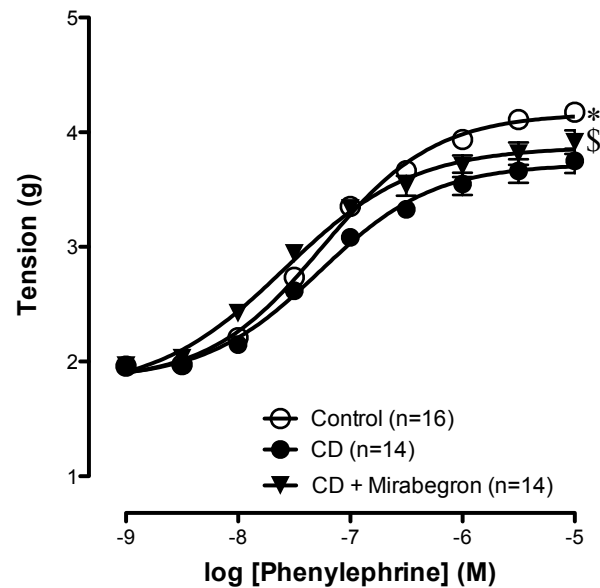
#### Vascular reactivity measurements

The effects of long-term treatment with mirabegron on vascular reactivity was evaluated *ex vivo* using aortic rings isolated from all groups, after 12 weeks of CD feeding. Phenylephrine induced a concentration-dependent contraction in aorta rings from all rats. The phenylephrine-induced maximal contractile response ( $E_{max}$ ) was significantly reduced in CD-fed group when compared to the control one ( $p < 0.001$ ) (Fig 5, Table 3). However, long-term treatment with mirabegron did not restore the maximal contractile force induced by phenylephrine in aortic rings isolated from CD-fed rats (Fig 5, Table 3), but it enhanced aortic rings sensitivity indicated by a higher  $pD_2$  in CD-fed group treated with mirabegron.

Table 3: pD<sub>2</sub> and E<sub>max</sub> of phenylephrine responses in aortic rings

	Control	CD	CD + Mirabegron
E <sub>max</sub> (g)	4.15 ± 0.07	3.77 ± 0.08*	3.88 ± 0.10
pD <sub>2</sub>	7.26 ± 0.04	7.29 ± 0.05	7.64 ± 0.05 \$

Values are means ± SEM. \**p*<0.001 vs. control group for E<sub>max</sub>, \$ *p*<0.001 vs. CD for pD<sub>2</sub> by NLME model.



**Fig 5: Cumulative-concentration response curve to phenylephrine in thoracic aortic rings.**

Data are expressed as means ± SEM. Comparison was performed using a NLME model.

\**p*<0.001 vs CD group for E<sub>max</sub>, \$ *p*<0.001 vs CD group for pD<sub>2</sub>.

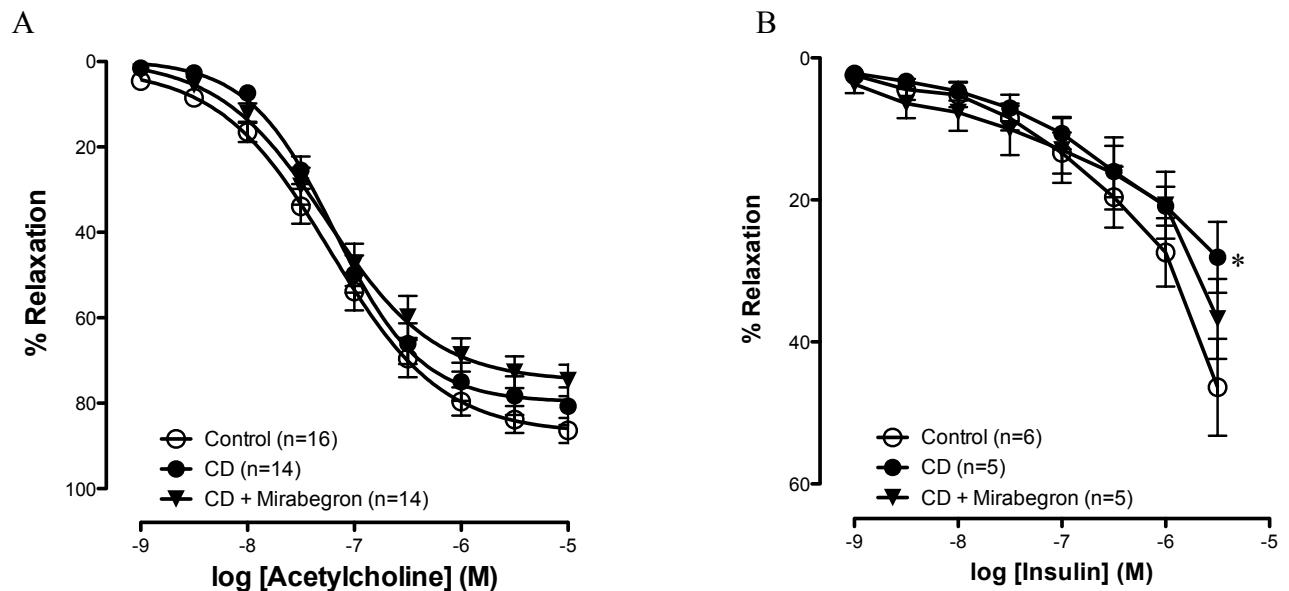
#### Acetylcholine, insulin and SNP-mediated vasorelaxations

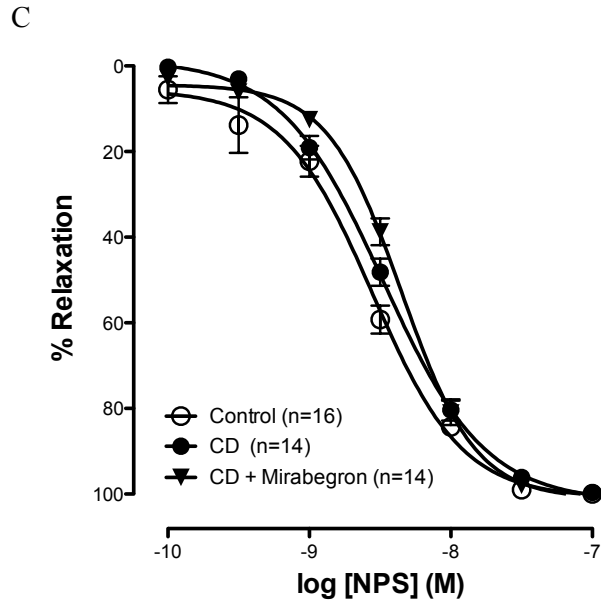
Aorta ring was precontracted with phenylephrine (1μm) and endothelium-dependent vasorelaxation was tested by addition of increasing concentrations of acetylcholine. The maximum relaxing effect of acetylcholine was not different between aortic rings from CD-fed rats and control rats. This result indicates that endothelial function is not altered in our model of metabolic syndrome. Similarly, no significant difference was observed between CD-fed untreated and treated rats (E<sub>max</sub>=79.80 ± 3.16 g vs 74.97 ± 4.35 g for CD-fed rats and CD-fed rats treated with mirabegron respectively) (Fig 6A).

In order to evaluate whether the endothelium-dependent vasorelaxation to insulin is altered by chronic CD feeding, CCRC to insulin were constructed on precontracted-aortic rings with

phenylephrine. The maximal relaxation to insulin was significantly higher in control group than in CD-fed group ( $p < 0.05$ ) (Fig 6B). Our previous studies showed that pretreatment of CD-fed group aortic ring with an endothelin-1(ET-1) receptor blocker, significantly increased the relaxant effect of insulin. These observations suggest that the altered relaxation to insulin during metabolic syndrome may involve the ET-1-mediated signalling pathway. However, insulin-mediated vasorelaxation was slightly improved (not significant) in CD-fed rats treated with mirabegron (Fig 6B).

In addition, we also evaluated the endothelium-independent vasorelaxation, using the NO donor, SNP. There was no significant difference in SNP-induced vasorelaxation between the 3 groups (Fig 6C).





**Fig 6: Endothelial response to Acetylcholine (A), Insulin (B) and SNP (C).** Data are presented as means  $\pm$  SEM. Comparison was performed using LME model. (A)  $*p < 0.05$  vs Control.

Determination of intracellular cGMP levels in thoracic aorta

As shown in Table 4, there was no significant difference in thoracic aorta cGMP content between CD-fed group and control group.

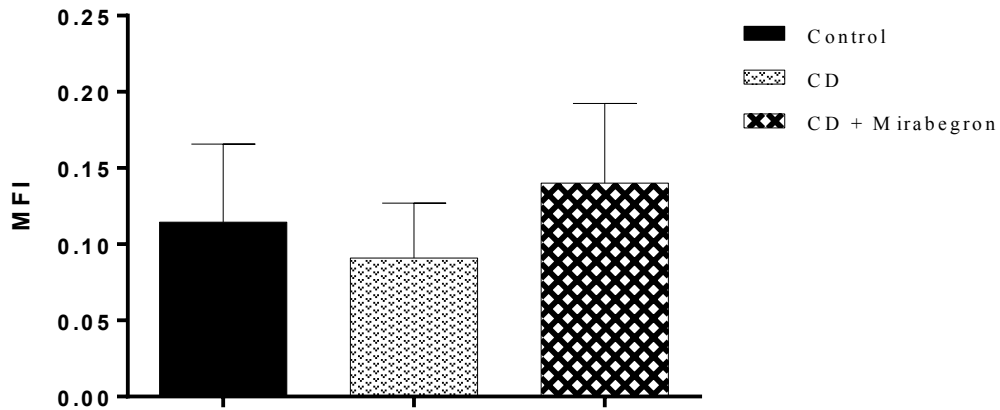
Table 4: Intracellular levels of cGMP measured in thoracic aorta

	Control	CD	CD + mirabegron
cGMP (pmol/mg protein)	1.20 $\pm$ 0.23	0.89 $\pm$ 0.12	0.56 $\pm$ 0.17

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM

Quantification of eNOS and iNOS expression in thoracic aorta

eNOS expression in thoracic aorta was investigated to assess whether it was modified under metabolic syndrome condition or after chronic treatment with mirabegron (Fig 7). No significant difference was observed in endothelial expression of eNOS between the 3 groups. These results are consistent with those of the *ex vivo* study.



**Fig 7: Evaluation of eNOS expression in thoracic aorta.** Control group (n = 4), CD-fed group (n = 3) and CD-fed group treated with Mirabegron (n=3). Values were represented as means  $\pm$  SEM of mean fluorescence intensity (U.I.).

## Discussion

Our study showed that chronic CD feeding induced abdominal obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia and arterial hypertension.

In the current study, we demonstrated that oral mirabegron treatment for 12 weeks (5mg/Kg) tended to reduce excessive weight gain and visceral obesity induced by chronic CD feeding in SHR. These results are consistent with previous studies showing that mirabegron treatment reduced body weight and fat mass in high fat diet-fed mice (Hao et al. 2019b). Another study conducted by Calmasini et al. (2017) showed that oral administration of mirabegron (10mg/kg/day) for 2 weeks decreased epididymal fat by 34% in obese C57BL/6 mice.  $\beta_3$ -adrenoceptors have been described to be widely expressed in brown and white adipose tissues in humans and rodents (Virtanen et al. 2009). Stimulation of brown adipose tissue by mirabegron has been shown to produce heat and to increase energy expenditure through the mitochondrial transmembrane protein, uncoupling protein-1 (UCP-1) which dissipates the energy generated during oxidative phosphorylation into heat (Kim et al. 2014). According to Hainer (2016), mirabegron treatment increases fatty acid oxidation and contributes to depletion of fats stores and preservation of lean body mass. Consequently, mirabegron-induced increasing brown adipose tissue function may offset the positive energy balance associated with overnutrition to prevent obesity onset.

collectively, the findings support the view that mirabegron could a potential therapeutic option for the management of obesity



In the current study, we showed that chronic treatment with mirabegron significantly improved glucose tolerance and slightly reduced hyperinsulinemia compared to CD-fed rats. It's still not well known how mirabegron acts to maintain glucose homeostasis during obesity and metabolic syndrome. We hypothesized that reduction of body weight and abdominal fat may contribute to improved glucose tolerance and enhanced insulin sensitivity. Furthermore, increasing evidence suggests that the beneficial effects of brown adipose tissue could involve an unrecognized endocrine role through the release of endocrine factors (Villarroya et al. 2013). Thus, the antidiabetic effect of mirabegron could be well due to the release of adipokines from brown adipose tissue. Further studies are needed to investigate these mechanisms.

Our results also showed that CD-fed rats exhibited impaired vasoconstrictor response to the  $\alpha_1$ -adrenoceptor agonist phenylephrine, developing a lower maximal force of contraction compared with standard chow diet-fed group. A similar response has been previously reported in thoracic aortic rings of obese Zucker rat, another animal model of metabolic syndrome (Oltman et al. 2006; Vendrame et al. 2014). One of the possible explanations for the vascular hyporesponsiveness to phenylephrine in the CD-fed group is  $\alpha_1$ -adrenoceptor desensitization due likely to chronically higher sympathetic activity in this group. Many studies of obesity-induced arterial hypertension have documented elevated sympathetic vasomotor tone in comparison to standard chow diet in rats (Schreihofer et al. 2005). Increased sympathetic activity has been shown to induce  $\alpha_1$ -adrenoceptor desensitization (Charkoudian et al. 2006). However, the mechanisms involved in this desensitization remain unknown. We found that chronic treatment with mirabegron increased the potency of the phenylephrine-induced vasoconstriction in treated rats compared to CD-fed rats without impacting the maximal force of contraction.  $\beta_3$ -adrenoceptor agonists have been seen to produce relaxation in rat thoracic aorta through an NOS pathway activation (Trochu et al. 1999). However, in addition to its major  $\beta_3$ -adrenoceptor agonism promoting vasorelaxation (Gauthier et al. 1998b), mirabegron exhibits selective  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor antagonism (Alexandre et al. 2016). Therefore, we hypothesized that chronic  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor blockade *in vivo* would have augmented  $\alpha_1$ -adrenoceptors and prevented their desensitization.

Mirabegron is known to produce peripheral vasodilation, our results showed that long-term administration of mirabegron induced a reduction in both SBP and DBP compared to CD-fed rats but showed no difference with control SHR. This could be explained by the fact that mirabegron-induced vasodilation resulted in the activation of the baroreflex in order to maintain vascular homeostasis. Moreover, it has been demonstrated that mirabegron might

increase blood pressure through atrial tissue contractility and Ca<sup>2+</sup> current (Chen et al. 2018). Furthermore Mo et al. (2017) showed that mirabegron increases human atrial force through  $\beta_1$ -adrenoceptors activation.

In the current study, there was no change in the acetylcholine-induced vasorelaxation in CD-fed group compared to the control group. This result contrasts with previous studies describing impaired endothelium-dependent relaxation in SHR (Nakagami et al. 2014; Teixeira-da-Silva et al. 2019). However it is consistent with a study conducted by Lyoussi et al. (2018) who showed unaltered endothelium-dependent and NO-dependent relaxation in a rat model of metabolic syndrome. It could not be ruled out that the production of NO in the SHR might be enhanced to compensate increased blood pressure (Török 2008). Ours results support this hypothesis since cGMP analysis performed on thoracic aortas were not statistically different between the 3 groups. Similarly, eNOS expression quantification in thoracic aorta remained unchanged between the 3 groups

Insulin-induced vasorelaxation in both human and animal has been attributed to its ability to stimulate NO generation from endothelial cells. Insulin stimulates the production of the vasodilator NO through phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signalling. Independently of insulin receptor substrate phosphorylation, insulin also stimulates the production of the vasoconstrictor endothelin-1 (ET-1) through Ras-ERK/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling (Olver et al. 2017). In our study, the vasorelaxant effect of insulin was significantly reduced in aorta from CD-fed rats compared to controls. This observation agrees with reports that attenuated insulin-stimulated vasodilation may be explained partially by an impaired PI3K- dependent NO production and an enhanced MAPK-dependent ET-1 secretion (Potenza et al. 2005; Lyoussi et al. 2018). Our previous study supports this result since aortic rings pretreatment with an ET-1 receptor antagonist significantly improved the insulin-induced vasorelaxation in CD-fed group. Long-term treatment with mirabegron tended to increase vasorelaxation to insulin likely through enhanced NOS signalling and normalized vascular ET-1 and NO balance.

Taken together, our findings suggest that the altered response to insulin may be an early indicator of vasomotor abnormalities that precedes endothelial dysfunction (determined by an altered response to acetylcholine) and that mirabegron treatment may be an effective mean to improve insulin resistance.

Concerning responses to  $\beta$ -adrenoceptor stimulation in isolated perfused hearts, the present study revealed that left ventricular contractility in response to stimulation with isoproterenol was significantly attenuated in the CD-fed group when compared to the control group. Reduced responsiveness to  $\beta$ -adrenoceptor stimulation has also been reported in other studies. However, the underlying mechanisms are not well understood yet. Several hypotheses seem plausible. The decrease in the positive inotropic effect of  $\beta$ -adrenoceptor stimulation could be related to  $\beta_1$ -adrenoceptor down-regulation, to an altered coupling between receptors or to decreased cAMP production and sarcoplasmic reticular calcium uptake (Jiang et al. 2015; Lima-Leopoldo et al. 2011; Nevelsteen et al. 2013). Further studies are warranted to better understand the mechanisms involved. Activation of the NO pathway has been described to be related to an enhanced cardiovascular  $\beta$ -adrenergic responsiveness (Leosco et al. 2003). This observation is in line with our results. We showed that long-term treatment with mirabegron significantly improved both cardiac contractility and coronary vasodilation compared to CD-fed rats. It would be likely that long-term eNOS activation by mirabegron may counteract the impairment of cardiovascular function observed after CD feeding.

In conclusion, the present study showed cardiometabolic protective effects of mirabegron long-term-treatment during metabolic syndrome. These findings suggest that mirabegron could serve as a therapeutic option for the management of metabolic syndrome.

## References

- Alexandre, E. C., L. R. Kiguti, F. B. Calmasini, F. H. Silva, K. P. da Silva, R. Ferreira, C. A. Ribeiro, F. Z. Mónica, A. S. Pupo, and E. Antunes. 2016. "Mirabegron Relaxes Urethral Smooth Muscle by a Dual Mechanism Involving  $\beta_3$ -Adrenoceptor Activation and  $\alpha_1$ -Adrenoceptor Blockade." *British Journal of Pharmacology* 173 (3): 415–28. <https://doi.org/10.1111/bph.13367>.
- Balligand, Jean-Luc. 2016. "Cardiac Salvage by Tweaking with Beta-3-Adrenergic Receptors." *Cardiovascular Research* 111 (2): 128–33. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw056>.
- Calmasini, Fabiano B., Mariana G. de Oliveira, Eduardo C. Alexandre, Fábio H. da Silva, Carmem P. V. da Silva, Tuany Z. Candido, Edson Antunes, and Fabíola Z. Mónica. 2017. "Long-Term Treatment with the Beta-3 Adrenoceptor Agonist, Mirabegron Ameliorates Detrusor Overactivity and Restores Cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP) Levels in Obese Mice." *Neurourology and Urodynamics* 36 (6): 1511–18. <https://doi.org/10.1002/nau.23171>.

Charkoudian, N., M. J. Joyner, L. A. Sokolnicki, C. P. Johnson, J. H. Eisenach, N. M. Dietz, T. B. Curry, and B. G. Wallin. 2006. "Vascular Adrenergic Responsiveness Is Inversely Related to Tonic Activity of Sympathetic Vasoconstrictor Nerves in Humans." *The Journal of Physiology* 572 (Pt 3): 821–27. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.104075>.

Chen, Hsiao-Ling, Tun-Chieh Chen, Hsiu-Mei Chang, Yung-Shun Juan, Wei-Hsuan Huang, Hung-Fang Pan, Yong-Chieh Chang, Chiou-Mei Wu, Ya-Ling Wang, and Hsiang Ying Lee. 2018. "Mirabegron Is Alternative to Antimuscarinic Agents for Overactive Bladder without Higher Risk in Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis." *World Journal of Urology* 36 (8): 1285–97. <https://doi.org/10.1007/s00345-018-2268-9>.

Dehvari, Nodi, Edilson Dantas da Silva Junior, Tore Bengtsson, and Dana Sabine Hutchinson. 2018. "Mirabegron: Potential off Target Effects and Uses beyond the Bladder." *British Journal of Pharmacology* 175 (21): 4072–82. <https://doi.org/10.1111/bph.14121>.

Gauthier, C., V. Leblais, L. Kobzik, J. N. Trochu, N. Khandoudi, A. Bril, J. L. Balligand, and H. Le Marec. 1998a. "The Negative Inotropic Effect of Beta3-Adrenoceptor Stimulation Is Mediated by Activation of a Nitric Oxide Synthase Pathway in Human Ventricle." *The Journal of Clinical Investigation* 102 (7): 1377–84. <https://doi.org/10.1172/JCI2191>.

Goulopoulou, Styliani, Johanna L. Hannan, Takayuki Matsumoto, Safia Ogbi, Adviye Ergul, and R. Clinton Webb. 2015. "Reduced Vascular Responses to Soluble Guanylyl Cyclase but Increased Sensitivity to Sildenafil in Female Rats with Type 2 Diabetes." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 309 (2): H297-304. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00079.2015>.

Grundy, Scott M., Barbara Hansen, Sidney C. Smith, James I. Cleeman, Richard A. Kahn, American Heart Association, National Heart, Lung, and Blood Institute, and American Diabetes Association. 2004. "Clinical Management of Metabolic Syndrome: Report of the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association Conference on Scientific Issues Related to Management." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (2): e19-24. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000112379.88385.67>.

Hainer, Vojtech. 2016. "Beta3-Adrenoreceptor Agonist Mirabegron - a Potential Antiobesity Drug?" *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 17 (16): 2125–27. <https://doi.org/10.1080/14656566.2016.1233177>.

Hao, Lei, Sheyenne Scott, Mehrnaz Abbasi, Yujiao Zu, Md Shahjalal Hossain Khan, Yang Yang, Dayong Wu, Ling Zhao, and Shu Wang. 2019a. “Beneficial Metabolic Effects of Mirabegron In Vitro and in High-Fat Diet-Induced Obese Mice.” *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 369 (3): 419–27. <https://doi.org/10.1124/jpet.118.255778>.

Jiang, Cheng, Aude Carillion, Na Na, Audrey De Jong, Sarah Feldman, Jean-Marc Lacorte, Dominique Bonnefont-Rousselot, Bruno Riou, and Julien Amour. 2015. “Modification of the  $\beta$ -Adrenoceptor Stimulation Pathway in Zucker Obese and Obese Diabetic Rat Myocardium.” *Critical Care Medicine* 43 (7): e241-249. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000999>.

Kanso, Hassan, Mohamed Yassine Mallem, Hanitra Rabesona, Chantal Thorin, Thomas Haertle, Jean-Marc Chobert, François Guerrero, and Jean-Claude Desfontis. 2014. “Vasorelaxant Effects of Camel and Bovine Casein Hydrolysates in Rat Thoracic Aorta and Mesenteric Artery.” *International Dairy Journal* 39 (1): 113–20. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.05.004>.

Kim, G. W., J. E. Lin, E. S. Blomain, and S. A. Waldman. 2014. “Antiobesity Pharmacotherapy: New Drugs and Emerging Targets.” *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 95 (1): 53–66. <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.204>.

Leosco, Dario, Guido Iaccarino, Ersilia Cipolletta, Domenico De Santis, Eliana Pisani, Valentina Trimarco, Nicola Ferrara, et al. 2003. “Exercise Restores Beta-Adrenergic Vasorelaxation in Aged Rat Carotid Arteries.” *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 285 (1): H369-374. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00019.2003>.

Lima-Leopoldo, Ana Paula, André S. Leopoldo, Mário M. Sugizaki, Alessandro Bruno, André F. Nascimento, Renata A. M. Luvizotto, Silvio A. de Oliveira Júnior, Edson Castardeli, Carlos R. Padovani, and Antonio C. Cicogna. 2011. “Myocardial Dysfunction and Abnormalities in Intracellular Calcium Handling in Obese Rats.” *Arquivos Brasileiros De Cardiologia* 97 (3): 232–40.

Lyoussi, Badiaa, Khadija Cherkaoui-Tangi, Nicole Morel, and Maurice Wibo. 2018. “Characterization of Vascular Dysregulation in Meriones Shawi after High-Calorie Diet Feeding.” *Clinical and Experimental Hypertension (New York, N.Y.: 1993)* 40 (4): 353–62. <https://doi.org/10.1080/10641963.2017.1377219>.

Mallem, Mohamed Yassine, Gilles Toumaniantz, Sabrina Serpillon, Freddy Gautier, Marc Gogny, Jean-Claude Desfontis, and Chantal Gauthier. 2004. “Impairment of the Low-Affinity

State Beta1-Adrenoceptor-Induced Relaxation in Spontaneously Hypertensive Rats.” *British Journal of Pharmacology* 143 (5): 599–605. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705990>.

McCracken, Emma, Monica Monaghan, and Shiva Sreenivasan. 2018. “Pathophysiology of the Metabolic Syndrome.” *Clinics in Dermatology* 36 (1): 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2017.09.004>.

Mo, Weilan, Martin C. Michel, Xiang Wen Lee, Alberto J. Kaumann, and Peter Molenaar. 2017. “The B3 -Adrenoceptor Agonist Mirabegron Increases Human Atrial Force through B1 -Adrenoceptors: An Indirect Mechanism?” *British Journal of Pharmacology* 174 (16): 2706–15. <https://doi.org/10.1111/bph.13897>.

Nakagami, Hironori, Zhengda Pang, Takashi Shimosato, Toshinori Moritani, Hitomi Kurinami, Hiroshi Koriyama, Akiko Tenma, Munehisa Shimamura, and Ryuichi Morishita. 2014. “The Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor Teneligliptin Improved Endothelial Dysfunction and Insulin Resistance in the SHR/NDmcr-Cp Rat Model of Metabolic Syndrome.” *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension* 37 (7): 629–35. <https://doi.org/10.1038/hr.2014.53>.

Nevelsteen, Ines, Virginie Bito, Gerry Van der Mieren, Annelies Vanderper, An Van den Bergh, Karin R. Sipido, Kanigula Mubagwa, and Paul Herijgers. 2013. “ACE-Inhibition, but Not Weight Reduction Restores Cardiomyocyte Response to  $\beta$ -Adrenergic Stimulation in the Metabolic Syndrome.” *BMC Cardiovascular Disorders* 13 (July): 51. <https://doi.org/10.1186/1471-2261-13-51>.

Oltman, Christine L., Laura L. Richou, Eric P. Davidson, Lawrence J. Coppey, Donald D. Lund, and Mark A. Yorek. 2006. “Progression of Coronary and Mesenteric Vascular Dysfunction in Zucker Obese and Zucker Diabetic Fatty Rats.” *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 291 (4): H1780-1787. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01297.2005>.

Olver, T. Dylan, Matthew W. McDonald, Diana Klakotskaia, Rachel A. Richardson, Jeffrey L. Jasperse, C. W. James Melling, Todd R. Schachtman, Hsiao T. Yang, Craig A. Emter, and M. Harold Laughlin. 2017. “A Chronic Physical Activity Treatment in Obese Rats Normalizes the Contributions of ET-1 and NO to Insulin-Mediated Posterior Cerebral Artery Vasodilation.” *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 122 (4): 1040–50. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00811.2016>.

Potenza, Maria A., Flora L. Marasciulo, Delia Mitolo Chieppa, Giovanni Siro Brigiani, Gloria Formoso, Michael J. Quon, and Monica Montagnani. 2005. "Insulin Resistance in Spontaneously Hypertensive Rats Is Associated with Endothelial Dysfunction Characterized by Imbalance between NO and ET-1 Production." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 289 (2): H813-822. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00092.2005>.

Rochlani, Yogita, Naga Venkata Pothineni, Swathi Kovelamudi, and Jawahar L. Mehta. 2017. "Metabolic Syndrome: Pathophysiology, Management, and Modulation by Natural Compounds." *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease* 11 (8): 215–25. <https://doi.org/10.1177/1753944717711379>.

Said, Sarmad, Debabrata Mukherjee, and Thomas F. Wayne. 2016. "Interrelationships with Metabolic Syndrome, Obesity and Cardiovascular Risk." *Current Vascular Pharmacology* 14 (5): 415–25.

Samson, Susan L., and Alan J. Garber. 2014. "Metabolic Syndrome." *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 43 (1): 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2013.09.009>.

Sauvaget, Frédérique, Mohamed Yassine Mallem, Véronique Bucas, Marc Gogny, Jean-Claude Desfontis, and Jacques Noireaud. 2010. "Positive Influence of AT(1) Receptor Antagonism upon the Impaired Celiprolol-Induced Vasodilatation in Aorta from Spontaneously Hypertensive Rats." *European Journal of Pharmacology* 644 (1–3): 169–75. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.07.003>.

Schreihof, Ann M., Clark D. Hair, and David W. Stepp. 2005. "Reduced Plasma Volume and Mesenteric Vascular Reactivity in Obese Zucker Rats." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 288 (1): R253-261. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00498.2004>.

Sherling, Dawn Harris, Parvathi Perumareddi, and Charles H. Hennekens. 2017. "Metabolic Syndrome: Clinical and Policy Implications of the New Silent Killer." *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 22 (4): 365–67. <https://doi.org/10.1177/1074248416686187>.

Skrzypiec-Spring, Monika, Bartosz Grotthus, Adam Szlag, and Richard Schulz. 2007. "Isolated Heart Perfusion According to Langendorff---Still Viable in the New Millennium." *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 55 (2): 113–26. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.05.006>.

Teixeira-da-Silva, José Jairo, Hiela Stefany Nunes-Moreira, Cristina Oliveira Silva, Saad Lahlou, Fabio Naro, Fabiano Elias Xavier, and Glória Pinto Duarte. 2019. “Chronic Administration of Sildenafil Improves Endothelial Function in Spontaneously Hypertensive Rats by Decreasing COX-2 Expression and Oxidative Stress.” *Life Sciences* 225 (May): 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.03.074>.

Thorin, Chantal, Mohamed Yassine Mallem, Jacques Noireaud, Marc Gogny, and Jean-Claude Desfontis. 2010. “Nonlinear Mixed Effects Models Applied to Cumulative Concentration-Response Curves.” *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 62 (3): 339–45. <https://doi.org/10.1211/jpp.62.03.0008>.

Török, J. 2008. “Participation of Nitric Oxide in Different Models of Experimental Hypertension.” *Physiological Research* 57 (6): 813–25.

Trochu, J. N., V. Leblais, Y. Rautureau, F. Bévèrelli, H. Le Marec, A. Berdeaux, and C. Gauthier. 1999. “Beta 3-Adrenoceptor Stimulation Induces Vasorelaxation Mediated Essentially by Endothelium-Derived Nitric Oxide in Rat Thoracic Aorta.” *British Journal of Pharmacology* 128 (1): 69–76. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702797>.

Vendrame, Stefano, Aleksandra S. Kristo, Dale A. Schuschke, and Dorothy Klimis-Zacas. 2014. “Wild Blueberry Consumption Affects Aortic Vascular Function in the Obese Zucker Rat.” *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquée, Nutrition Et Metabolisme* 39 (2): 255–61. <https://doi.org/10.1139/apnm-2013-0249>.

Villarroya, Joan, Rubén Cereijo, and Francesc Villarroya. 2013. “An Endocrine Role for Brown Adipose Tissue?” *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 305 (5): E567-572. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00250.2013>.

Virtanen, Kirsi A., Martin E. Lidell, Janne Orava, Mikael Heglind, Rickard Westergren, Tarja Niemi, Markku Taittonen, et al. 2009. “Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults.” *The New England Journal of Medicine* 360 (15): 1518–25. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808949>.

Wu, Tao, Xi Duan, Chen-Xi Cao, Chuan-Du Peng, Si-Yuan Bu, and Kun-Jie Wang. 2014. “The Role of Mirabegron in Overactive Bladder: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Urologia Internationalis* 93 (3): 326–37. <https://doi.org/10.1159/000361079>.



## **Résultats complémentaires : Etude des effets de la modulation de la voie du GMPc sur la composition du microbiote intestinal des SHR avec un syndrome métabolique induit**

### **Introduction**

Le microbiote intestinal est aujourd'hui considéré comme un organe à part entière, qui joue un rôle clé dans le métabolisme énergétique de l'hôte. Il apparaît de plus en plus comme un élément essentiel à notre organisme avec lequel il vit en symbiose (Delzenne and Cani 2008). La composition du microbiote intestinal n'est pas homogène le long du tractus digestif. En effet, elle est relativement discrète dans les deux premiers segments de l'intestin grêle où le transit est rapide. En revanche elle augmente fortement dans l'iléon pour atteindre des niveaux de populations cent fois supérieurs dans le côlon et le rectum (Leclerc et al. 2007). Quatre phylum bactériens majeurs (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* et *Proteobacteria*) sont présents dans le microbiote intestinal et représentent près de 95% de l'ensemble des bactéries (Landman and Quévrain 2016). Le microbiote intestinal est impliqué dans la maturation du système immunitaire et dans de nombreuses voies métaboliques fondamentales comme la fermentation des sucres et des protéines ainsi que le métabolisme des acides biliaires et des xénobiotiques. Il permet en outre, de contrôler le stockage adipocytaire des acides gras grâce à la protéine lipase (Gérard and Bernalier-Donadille 2007). Des approches de culture et plus récemment, la découverte du séquençage à haut débit ont permis de décrire plus précisément la structure, la diversité et la richesse du microbiote intestinal ainsi que son altération en pathologie (Landman and Quévrain 2016).

Des modifications dans l'écosystème bactérien du microbiote intestinal ont été montrées comme fortement corrélées au développement des altérations métaboliques liées à l'obésité et au diabète de type 2 (Bibiloni et al. 2009). En effet, Turnbaugh et al. (2006) a montré que l'alimentation de souris conventionnelles mises à un régime de type occidental riches en lipides et en glucides induisait une augmentation du rapport caecal Firmicutes/Bacteroidetes qui devenait similaire à celui déterminé chez des souris obèses. D'autres données expérimentales ont montré que l'alimentation hyperlipidique entraînait une augmentation des taux plasmatiques de LPS qui contribuent à leur tour au développement de la résistance à l'insuline (Festi et al. 2014). Ainsi, ces observations ont conduit à l'émergence de nombreuses études visant à rétablir l'équilibre du microbiote intestinal dans le but de prévenir l'installation des altérations métaboliques comme l'obésité et les complications qui lui sont associées.

Cependant, à notre connaissance, les interactions entre la modulation de la voie du GMPc et la composition du microbiote intestinal n'ont jamais été étudiées jusqu'à présent.

L'objectif de cette étude est de décrire les effets de la modulation chronique *in vivo* de la voie du GMPc sur la composition du microbiote intestinal des SHR avec un syndrome métabolique induit.

## **Matériels et méthodes**

### 1. Animaux

40 rats mâles de souche SHR âgés de 8 semaines, sont fournis par l'élevage Janvier Labs, Le Genest Sainte Isle. Tous les rats sont hébergés à raison de 1 rat par cage à l'animalerie Rongeurs groupe II, Oniris, avec un accès à l'eau et à la nourriture standard à volonté.

Après une semaine d'acclimatation, les rats ont été séparés aléatoirement en 4 groupes : un groupe témoin, un groupe soumis au régime hypercalorique de type *cafeteria diet* (CD) pendant 12 semaines. Les 2 derniers groupes ont été soumis au même régime et traités simultanément au BAY 41-2272 (5mg/kg/j) et au mirabegron (5mg/kg /j) respectivement par gavage gastrique pendant 12 semaines.

### 2) Etude de la composition du microbiote intestinal

#### 2.1 Prélèvement de fèces

A la fin du protocole expérimental, un prélèvement des échantillons fécaux a été réalisé quotidiennement à la même heure en plaçant les rats dans une cage préalablement nettoyée et désinfectée. Chaque rat a sa propre cage durant toute la durée de l'expérience. Les échantillons prélevés pour chaque rat (entre 4 et 11 crottes) sont divisés en deux tubes distincts à chaque prélèvement. L'un est destiné aux analyses HPLC et l'autre aux analyses de séquençage 16S. Les tubes sont conservés à -80°C.

#### 2.2 Analyse de la composition du microbiote fécal par séquençage 16S

##### ➤ Extraction d'ADN et PCR quantitative

L'ADN génomique présent dans les fèces a été extrait selon le protocole publié par Godon et al. (1997) avec des modifications apportées par nos collaborateurs de l'équipe MIHA.

L'intégrité et la concentration de l'ADN extrait ont été vérifiées par spectrophotométrie à l'aide du NanoDrop® et par électrophorèse sur gel d'agarose. La région V3-V4 a été amplifiée au cours de 30 cycles d'amplification à 65°C à partir de l'ADN extrait avec l'amorce directe F343

(CTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG) et l'amorce anti-sens R784 (GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT).

La taille théorique des amplicons est d'environ 510 pb. Les amplicons sont ensuite purifiés afin d'éliminer les amorces et d'autres amplifications non spécifiques.

➤ Séquençage de l'ADNr 16S

Les amplicons sont placés dans une plaque de 96 puits puis envoyés à la plateforme de séquençage « Génome et Transcriptome » (Get) de GenoToul (Toulouse, France). Le séquençage de l'ADNr 16S est réalisé en utilisant les amorces suivantes : AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCTACACGAC (amorce direct) CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT-index-GTGACTGGAGTTCAGACGTGT (amorce anti-sens) pendant 12 cycles à l'aide de la technologie IlluminaMiseq®.

➤ Analyses bio-informatiques

Les séquences obtenues sont ensuite assignées à des OTUs (Operational Taxonomic Units) avec une identité de 97% à l'aide de l'outil Galaxy (Escudié et al. 2018). Chaque OTU obtenu est assigné à un phylum, une famille, un genre donné à l'aide de la base de données silva et du classificateur RDP (Wang et al. 2007).

### 3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques des données de séquençage 16S, ont été réalisées avec le logiciel R (R Core Team, 2019, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Le test statistique Mann Whitney est utilisé pour étudier la composition du microbiote fécal avec correction de la valeur de  $p$  suivant la méthode Benjamini et Hochberg (1995) pour les tests de comparaisons multiples. Les paramètres étudiés sont les différences d'abondance aux niveaux des phyla, familles et genres bactériens.

Une valeur de  $p < 0,05$  est considérée comme statistiquement significative.

## Résultats

1. Etude des effets à long terme du régime *Cafeteria diet* sur la composition du microbiote intestinal.

La figure 1 représente la composition bactérienne à l'échelle phylum dans le groupe témoins et le groupe soumis au régime CD. Nous remarquons que les phyla des *Firmicutes* et des *Bacteroidetes* sont les plus abondants dans les échantillons provenant des 2 groupes. Les phyla *Actinobacteria* et *Proteobacteria* sont d'abondance plus faible. Cependant, aucune différence significative dans le ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* n'a été observée entre les 2 groupes.

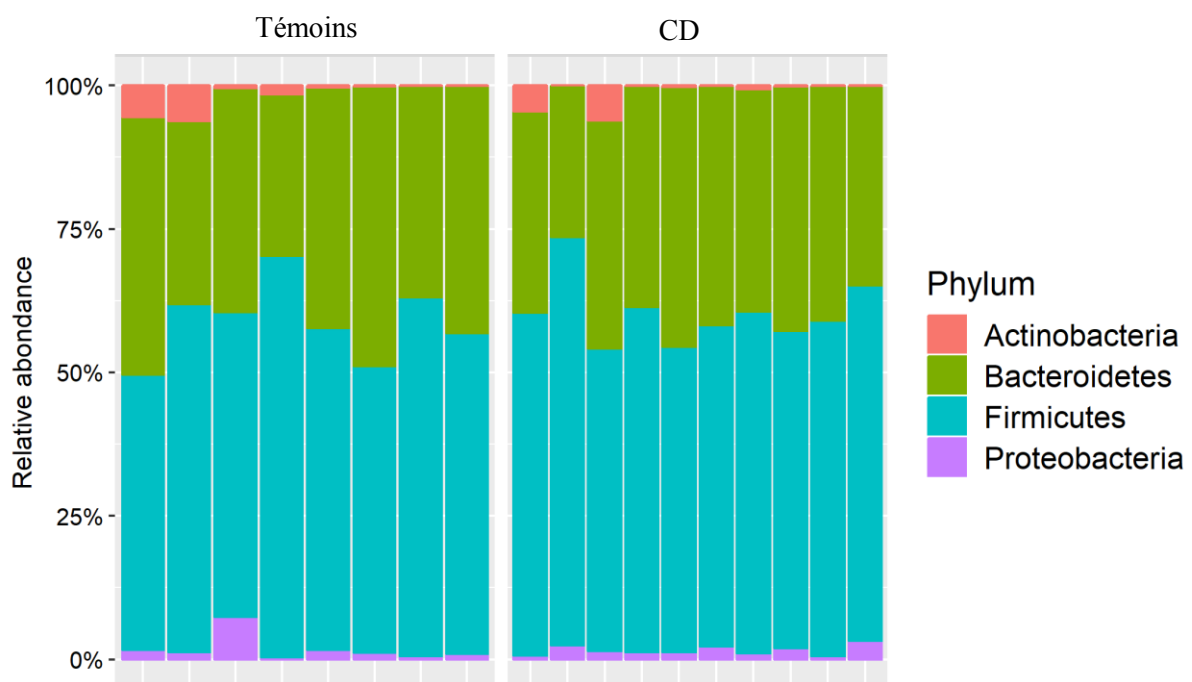


Figure 1 : Composition bactérienne à l'échelle phylum

En revanche, l'analyse de la composition du microbiote intestinal par la méthode de séquençage 16S a permis de mettre en évidence des modifications significatives entre les 2 groupes à l'échelle genre. Les résultats montrent que les genre *Prevotellaceae UCG-001* et *Roseburia* et *Sellimonas* sont significativement plus abondants dans le groupe des rats soumis au régime CD que dans le groupe témoin (\* $p < 0,05$  et \*\* $p < 0,01$ ) (Figure2).

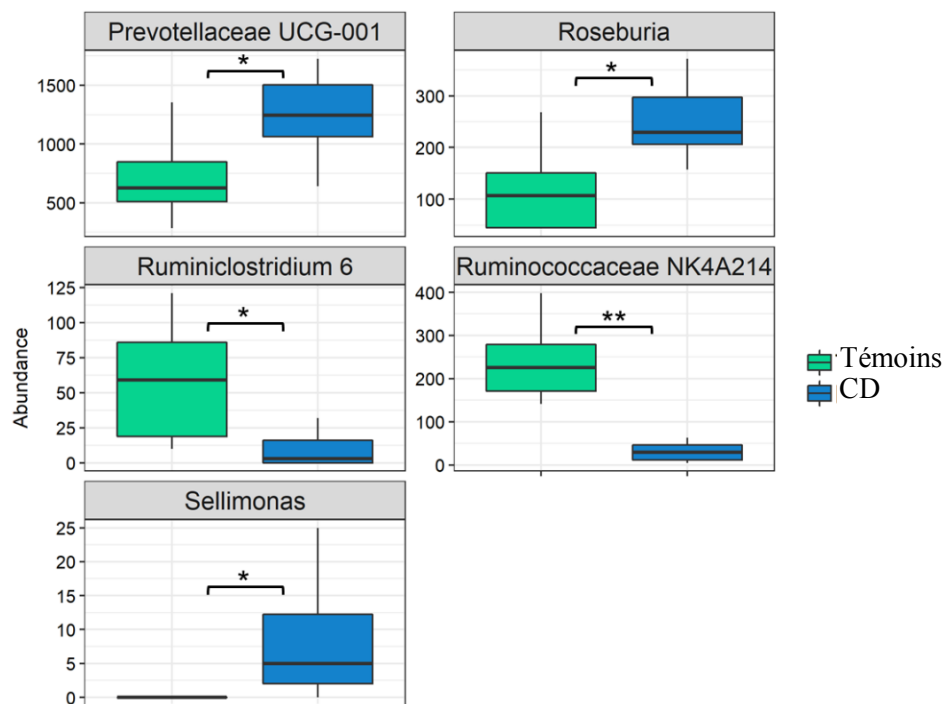


Figure 2 : Genres différenciellement abondants entre les groupes Témoin et CD

## 2. Etude des effets de la modulation de la voie du GMPc sur la composition du microbiote intestinal de SHR avec syndrome métabolique induit

### 2.1 Effets du traitement à long terme au BAY 41-2272

L'analyse du microbiote intestinal des rats traités au BAY 41-2272 n'a pas montré de différence significative à l'échelle phylum avec le groupe soumis au régime CD et non traité. En revanche, les résultats obtenus ont montré que l'administration orale à long terme du BAY 41-2272 a significativement diminué l'abondance des genres *Prevotellaceae UCG-001* et *Roseburia* pratiquement au même ordre de grandeur que chez les rats témoins (\*\* $p < 0,01$ ) (Figure 3).

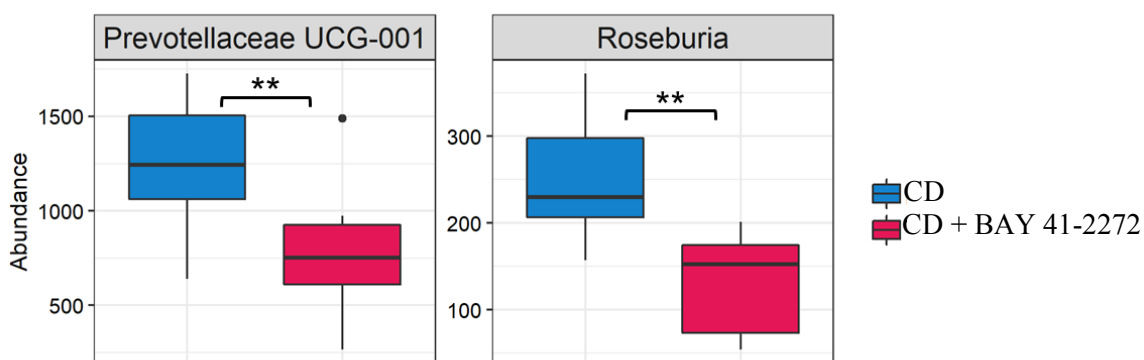


Figure 3 : Genres différenciellement abondants entre les groupes CD traités au BAY 41-2272 et CD non traités

## 2.2 Effets du traitement à long terme au mirabegron

Contrairement aux effets obtenus avec le traitement à long terme au BAY 41-2272, l'administration orale de mirabegron pendant 12 semaines n'a pas modifié l'abondance des genres *Prevotellaceae UCG-001* et *Roseburia*. En revanche, les résultats montrent une augmentation dans l'abondance du genre *Eubacterium coprostanoligenes* dans le groupe traité au mirabegron en comparaison avec le groupe CD non traité (\*\* $p < 0,01$ ) (Figure 4).

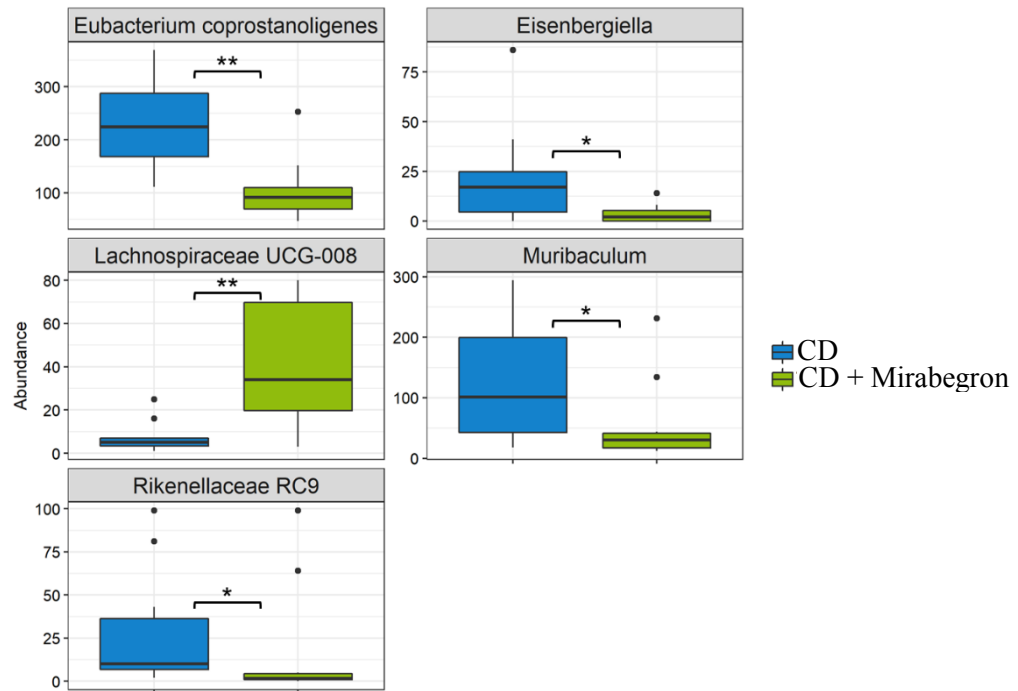


Figure 4 : Genres différenciellement abondants entre les groupes CD traités au mirabegron et CD non traités

## Discussion

Le microbiote intestinal a fait son apparition au cours de la dernière décennie en tant que nouveau contributeur majeur au développement du syndrome métabolique. A ce sujet, de nombreuses études ont montré que le syndrome métabolique était associé à une diminution de la richesse et de la diversité bactérienne de la flore intestinale. Les résultats de notre étude n'ont pas révélé de différence à l'échelle phylum entre le groupe soumis au régime CD et le groupe témoin. Ces observations sont en accord avec l'étude de Duncan et al. (2008) qui ne montre pas de différence dans le *ratio Firmicutes/Bacteroidetes* entre des sujets obèses et non obèses. En revanche nos résultats sont en contradiction avec ceux de Del Bas et al. (2018) qui montrent que l'exposition des rats au régime CD pendant 12 semaines entraînait une diminution

significative de la diversité bactérienne de l'intestin ainsi qu'une diminution de l'abondance des *Firmicutes* et une augmentation de l'abondance des *Actinobacteria* et des *Proteobacteria*. Cependant, il est important de noter que contrairement à notre étude, l'étude de Del Bas et al. (2018) a été réalisée sur des rats normotendus. Actuellement, il est largement documenté que l'hypertension artérielle est fortement associée à une dysbiose intestinale (Riedl et al. 2017). Il est donc, probable que la dysbiose intestinale préexistante chez le SHR ait masqué les effets du régime CD à l'échelle phylum. Dans notre étude, les résultats obtenus montrent une augmentation significative des genres *Roseburia* et *Prevotellaceae UCG-001* et dans le groupe CD en comparaison avec le groupe témoin. Ces résultats ne s'accordent pas avec les données de la littérature qui rapportent l'existence d'une corrélation négative entre l'obésité induite par un régime enrichi en graisses chez le rat Sprague-Dawley et l'abondance des *Prevotellaceae spp* (Mozes et al. 2008). De même, plusieurs études ont décrit une diminution du genre *Roseburia* au cours de l'obésité (Lin et al. 2019). Les *Roseburia spp* font partie des bactéries commensales qui produisent des acides gras à courtes chaînes dont le butyrate ce qui leur confère des propriétés anti-inflammatoires et modulatrices de l'immunité (Tamanai-Shacoori et al. 2017). Il a déjà été montré que la dysbiose intestinale chez les SHR était associée à une forte diminution dans les populations bactériennes productrices d'acétate et de butyrate (Yang et al. 2015). Il n'est pas à exclure qu'un mécanisme de compensation ait pu se développer pour compenser le déficit en acides gras à courte chaîne. Une analyse hebdomadaire du microbiote intestinal aurait été plus judicieuse pour mieux comprendre l'évolution de ces espèces au cours du temps.

Notre étude est la première à investiguer les effets de la modulation de la voie du GMPc sur la composition du microbiote intestinal chez le SHR. Le traitement à long terme au BAY 41-2272 a significativement restauré l'abondance des genres *Roseburia* et *Prevotellaceae UCG-001* au même niveau que chez le SHR témoin alors que le traitement à long terme au mirabegron a diminué significativement le genre *Eubacterium coprostanoligenes* (Freier et al. 1994) connu pour réduire le cholestérol en coprostanol. Les mécanismes impliqués dans la modulation de la composition du microbiote intestinal par les activateurs de la voie du GMPc ne sont pas encore bien connus. Des études ultérieures seront donc nécessaires pour mieux comprendre l'interaction entre le microbiote intestinal et les médicaments visant à augmenter la production intracellulaire du GMPc.

## **Discussion générale**



Mon travail de thèse s'est articulé autour de 3 objectifs :

- D'abord, l'évaluation de la modification de la fonction circulatoire globale chez des SHR soumis à un régime hypercalorique de type « *Cafeteria diet* » pendant 12 semaines, par des approches fonctionnelle, moléculaire et immunohistochimique
- Puis, nous avons étudié les effets métaboliques et cardiovasculaires de l'activation chronique de la voie du GMPc chez des SHR soumis au même régime à l'aide de médicaments appartenant à différentes classes thérapeutiques.
- Enfin, nous avons évalué la composition du microbiote intestinal des SHR avant et après régime /et traitements pharmacologiques par la méthode de séquençage 16S

Avant de discuter les résultats obtenus, nous allons d'abord discuter le choix du protocole expérimental qui a été mis en place pour induire le syndrome métabolique, nous discuterons également le choix des doses utilisées au cours de cette étude.

Nous incluons dans cette discussion, quelques éléments concernant les approches expérimentales *ex vivo* choisies et nous finirons par une partie sur les principales limites de ce travail.

## I. Validation du modèle animal du syndrome métabolique

### 1. Choix de la souche

Le SHR est une souche largement reconnue pour développer une hypertension artérielle équivalente à l'hypertension artérielle essentielle chez l'homme (Bonnardeaux 1996). Ce modèle animal a d'ailleurs été utilisé dans de nombreuses études afin de mieux caractériser certains aspects de l'hypertension artérielle essentielle chez l'homme (Pinto et al. 1998). La souche SHR a été développée en 1963 à partir de l'accouplement de rats Wistar présentant une pression sanguine élevée. Cette souche développe une hypertension spontanée vers l'âge de 5 à 6 semaines (PAS supérieure à 150 mmHg) qui évolue graduellement avec l'âge pouvant atteindre les 180 à 200 mmHg à l'âge adulte (Horan and Lovenberg 1986). L'origine de cette hypertension est génétique avec au moins 3 gènes majeurs impliqués.

Le SHR est aussi connu pour être un modèle animal pertinent pour l'étude de la résistance à l'insuline (Potenza et al. 2005). En effet, il a été démontré que les SHR présentent des taux d'insulinémie à jeûn significativement plus élevés que les rats Wistar Kyoto (souche témoin du SHR) (Umeda et al. 2003). De plus, une réduction significative de l'activité de transport du glucose stimulée par l'insuline a été observée dans les muscles squelettiques des SHR en comparaison avec les rats Wistar Kyoto (Hulman et al. 1993). Par ailleurs, il a aussi été

démontré que le SHR présente des anomalies cardiaques associées à une augmentation de l'activité sympathique et une hypertrophie ventriculaire (Doggrell and Brown 1998).

Ainsi, le rat spontanément hypertendu présente deux composantes majeures du syndrome métabolique faisant de lui un modèle judicieux pour étudier le syndrome métabolique et les altérations cardiovasculaires qui lui sont associées.

## 2. Choix du régime alimentaire

Plusieurs modèles expérimentaux ont été développés pour induire le syndrome métabolique (Sampey et al. 2011). Cependant, plusieurs chercheurs préconisent les modèles induits par le régime alimentaire. Ces derniers affirment que le syndrome métabolique induit par des régimes alimentaires enrichis reflète plus précisément l'état de l'obésité chez l'homme contrairement aux modifications induites chimiquement ou génétiquement (Sampey et al. 2011). A ce sujet, plusieurs régimes alimentaires ont été proposés. Dans cette étude, nous avons choisi le régime « *cafeteria diet* » car il représente un exemple typique de régime pouvant induire un syndrome métabolique expérimental. Dans ce modèle, les animaux ont un libre accès à la nourriture standard et l'eau tout en recevant des aliments humains très appétissants et denses en énergie *ad libitum* ce qui favorise l'hyperphagie volontaire (Johann et al. 2018). Ce régime entraîne de ce fait, une prise de poids, une augmentation de la masse grasse, une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline ressemblant au régime occidental chez l'homme (Lehnen et al. 2013).

Dans notre étude, nous avons montré que l'exposition des SHR au régime *cafeteria diet* pendant 12 semaines a augmenté le gain de poids et la circonférence abdominale, a induit une intolérance au glucose, une hypertriglycémie et a aggravé l'hypertension artérielle en comparaison avec des SHR témoins. Des résultats similaires ont aussi été décrits dans d'autres modèles animaux de syndrome métabolique (Gomez-Smith et al. 2016 ; La Russa et al. 2019).

Nous avons de ce fait réuni au moins 3 caractéristiques nous permettant de valider notre modèle animal du syndrome métabolique.

## II. Choix des traitements pharmacologiques et des doses utilisés

Le GMPc intracellulaire se trouve dans de nombreux tissus aussi bien chez l'homme que chez les rongeurs. Sa concentration augmente suite à l'activation des GC particulaire et soluble ainsi que suite à l'inhibition des enzymes responsables de sa dégradation. Le GMPc est un second messager dont l'activation conduit à diverses actions biologiques. Il a été démontré qu'un dysfonctionnement de cette voie aux niveaux cardiaque et vasculaire se manifeste par des

complications cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle (Schlossmann and Schinner 2012). Cependant, selon plusieurs études, une altération dans la voie de signalisation du GMPc peut également être impliquée dans le développement de l'obésité (Buglioni and Burnett 2016). Plusieurs molécules augmentant la génération du GMPc ont été intensivement étudiées. Toutefois, leurs effets sur la réactivité cardiovasculaire au cours du syndrome métabolique ne sont pas bien élucidés jusqu'à présent.

Dans cette étude, nous avons choisi d'évaluer les effets de l'administration chronique de 3 molécules interférant avec la synthèse ou la dégradation du GMPc :

- D'abord, nous avons évalué les effets du traitement à long terme au citrate de sildénafil, qui représente le chef de file des inhibiteurs sélectifs des phosphodiésterases de type 5 (IPDE 5), responsables de la dégradation du GMPc. C'est le premier IPDE 5 apparu sur le marché des médicaments pour le traitement de la dysfonction érectile chez l'homme (Scaglione et al. 2017). Il a été approuvé également pour le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire (Hrometz and Shields 2006). Il est actuellement l'objet de nombreuses études pour son potentiel rôle thérapeutique dans l'obésité.
- Ensuite, nous avons évalué les effets de la stimulation à long terme de la GCs avec le BAY 41-2272. Les stimulateurs de la GC sensibilisent la GCs à de faibles taux de NO biodisponibles en maintenant l'enzyme sous sa forme active. Ils peuvent ainsi augmenter l'activité de la GCs en l'absence de libération de NO. L'intérêt majeur de ces molécules réside dans leur indépendance vis-à-vis du NO. C'est donc un atout crucial par rapport aux molécules (*i.e.* IPDE 5) dont l'action est dépendante d'une production endogène de NO.
- Enfin, nous avons aussi étudié la voie du GMPc par l'administration du mirabegron, un agoniste des récepteurs  $\beta_3$ -AR. La stimulation de ces récepteurs augmente la production du GMPc via l'activation de la NOS endothéliale. Le récepteur  $\beta_3$ -AR est actuellement une cible attrayante en raison de sa forte expression dans le tissu adipeux des rongeurs où son activation entraînerait une diminution de l'adiposité dans des modèles animaux d'obésité et de diabète de type 2 (Dehvari et al. 2018). Le mirabegron est un agonistes  $\beta_3$ -AR qui a été récemment approuvé pour le traitement de l'hyperactivité vésicale. Cependant ses effets sur l'obésité et les complications associées sont encore peu connus.

Dans cette étude, nous avons opté pour la dose de 5mg/kg pour chacune des molécules utilisées. Cette dose a été choisie en se basant sur les données de la littérature. Les doses des stimulateurs de la GCs, utilisées chez le rat et qui se sont avérées suffisantes pour induire une activation de

la voie de signalisation NO-GCs-GMPc varient de 1mg/kg à 30 mg/kg (Bae et al. 2016; Constantinescu et al. 2017 ; Prawez et al. 2016 ; Hao et al. 2019). Cependant, pour bien définir la dose appropriée chez le rat, il serait plus judicieux de réaliser une étude pilote chez le rat qui prend en considération la pharmacocinétique des différents molécules.

### III. Effet de l'activation à long terme de la voie du GMPc sur les paramètres métaboliques

Les résultats obtenus dans les 3 études présentées dans la partie précédente ont montré une diminution du gain de poids et de l'obésité viscérale dans les groupes de rats soumis au régime CD et traités au citrate de sildénafil, au BAY 41-2272 et au mirabegron respectivement en comparaison avec les rats non traités. Des résultats similaires ont été rapportés dans de nombreuses études. En effet, il a été démontré que les PDE5 sont exprimées dans de nombreux tissus y compris les adipocytes où leur inhibition pourrait être une option thérapeutique dans le traitement de l'obésité et du syndrome métabolique (Armani et al. 2011). Dans ce même contexte, l'étude menée par Ayala et al. (2007) a montré que le traitement chronique au sildénafil a rétabli la balance énergétique et a amélioré les effets *in vivo* de l'insuline dans un modèle animal de résistance à l'insuline. De plus, Hoffmann et ses collaborateurs (2015) ont montré que la stimulation de la GCs permet de prévenir la prise de poids induite par un régime enrichi et aide à réduire le poids au cours de l'obésité probablement en favorisant la différenciation des adipocytes bruns. En outre, l'expression des récepteurs  $\beta_3$ -AR a été décrite dans les tissus adipeux brun et blanc aussi bien chez l'homme que chez les rongeurs (Cypess et al. 2015). Leur activation favorise la lipolyse contribuant ainsi à la perte de poids. Le point commun dans les voies de signalisation de ces 3 molécules est l'augmentation des taux intracellulaires en GMPc. Il semblerait alors que le GMPc contrôle la balance énergétique en favorisant l'activation du tissu adipeux brun et la différenciation du tissu adipeux blanc en tissu adipeux brun (Hoffmann et al. 2016). Ce dernier a été décrit comme le principal tissu dont l'activation permet de dissiper l'énergie sous forme de chaleur et d'augmenter la dépense énergétique grâce à la protéine transmembranaire mitochondriale UCP-1. L'UCP-1 dissipe l'énergie générée au cours de la phosphorylation oxydative dans les mitochondrie en chaleur (Kim et al. 2014). Par conséquent, l'augmentation de la fonction du tissu adipeux brun à travers les activateurs de la voie du GMPc permettrait de compenser le bilan énergétique positif associé à la suralimentation afin de diminuer la prise de poids.

#### IV. Choix et validation des approches expérimentales *ex vivo*

##### 1. Technique de Langendorff pour l'étude *ex vivo* de la fonction cardiaque

Afin d'étudier la fonction cardiovasculaire, une perfusion du cœur isolé *ex vivo* a été mise en place selon la méthode de Langendorff. Nous avons testé une molécule dont les effets sur la fonction cardiaque sont connus. Nous avons choisi de ce fait, l'isoprénaline, un agoniste  $\beta$ -adrénergique non sélectif et dont les effets sur le cœur sont inotrope, lusitrope, chronotrope et dromotrope positifs. Dans notre étude, l'administration de l'isoprénaline à des concentrations croissantes a révélé les mêmes effets obtenus dans la littérature (Zheng et al. 2004) qui incluent une augmentation de la pression développée et une baisse de la pression de perfusion.

Le cœur isolé perfusé constitue une préparation dans laquelle le changement de pression de perfusion reflète directement les changements de la résistance vasculaire. On peut donc clairement établir un lien entre une baisse de pression et un effet vasodilatateur direct de la substance utilisée.

De plus, la perfusion du cœur isolé selon la méthode de Langendorff, permet l'étude de la fonction cardiaque sans tenir compte de la régulation neurohormonale médiée par les systèmes parasympathique et orthosympathique même si des terminaisons nerveuses au niveau du tissu nodal persistent encore, ce qui peut être à la fois un avantage et un inconvénient étant donné qu'il est souhaitable de considérer l'ensemble du système pour bien comprendre la physiopathologie d'une dysfonction cardiaque. Une autre limite liée à l'utilisation de cette technique a été observée. La stimulation  $\beta$ -adrénergique entraîne une élévation de la fréquence cardiaque et une augmentation de la force de contraction du cœur ce qui induit parfois un déplacement du ballonnet initialement introduit dans le ventricule gauche et permettant le recueil des données, les parois cardiaques n'adhèrent plus contre celui-ci. De ce fait, un signal non exploitable est obtenu.

##### 2. Technique des organes isolés pour l'étude *ex vivo* de la réactivité vasculaire

La technique des organes isolés a été décrite comme un outil parfaitement adapté à l'évaluation de la réactivité des vaisseaux isolés. Cette technique permet de mesurer la réactivité vasculaire sur des anneaux de 3 à 4 mm de long, de manière isolée sans interférence du système nerveux autonome et des facteurs humoraux (hormones, protéines...), dont l'impact *in vivo* peut s'avérer incontrôlable et très différent d'un individu à l'autre. Cependant, il est aussi important de noter que notre étude n'a exploré que la réactivité de l'aorte thoracique uniquement, qui est un vaisseau de conductance. Les résultats obtenus devraient de ce fait être interprétés avec

prudence car ils ne pourraient pas être transposés à l'ensemble de l'arbre artériel et notamment aux vaisseaux de résistance (*i.e.* artères mésentériques...) dont la réactivité peut être complètement différente.

## V. Effets de l'activation à long terme de la voie du GMPc sur la fonction circulatoire

### 1. Effets sur la pression artérielle systémique

La voie de signalisation NO-GCs-GMPc s'est révélée jouer un rôle important dans la physiologie cardiovasculaire, en particulier dans la vasodilatation (Lian et al. 2017). Nos résultats ont montré une diminution significative des pressions artérielles systoliques et diastoliques dans les groupes traités au sildénafil citrate, BAY 41-2272 et mirabegron respectivement en comparaison avec le groupe soumis au régime CD. Cet effet anti-hypertenseur est probablement lié à l'effet vasodilatateur induit par l'augmentation de la production du GMPc intracellulaire. Cependant, nous avons remarqué que la diminution de l'hypertension artérielle est plus importante dans le groupe traité au BAY 41-2272 que dans les groupes traités au sildénafil citrate et mirabegron. Ceci peut s'expliquer par le fait que la vasodilatation induite par ces médicaments a entraîné une activation du baroréflexe afin de maintenir l'homéostasie vasculaire (Berlan et al. 1995). Ceci peut s'expliquer également par une activation potentielle du système orthosympathique qui pourrait limiter l'effet hypotenseur (Cavalcanti et al. 2016). En revanche, il est probable que l'effet hypotenseur induit par le BAY 41-2272 ait pu dépasser les capacités de régulation du baroréflexe.

### 2. Etude de la réactivité cardiaque

Dans les résultats présentés précédemment, l'étude *ex vivo* de la fonction cardiaque globale a révélé une diminution de la contractilité cardiaque et de la vasodilatation coronaire après stimulation  $\beta$ -adrénergique chez les rats soumis au régime CD en comparaison avec les rats témoins. La signalisation issue de la stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques a été peu étudiée et les quelques résultats publiés sont contradictoires. L'altération de la contractilité cardiaque dans le groupe de rats atteints de syndrome métabolique pourrait être due à une désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques suite à l'hyperactivité du système nerveux sympathique observée au cours de l'obésité et de l'hypertension artérielle. Cette désensibilisation pourrait être à l'origine soit d'une diminution de l'expression des récepteurs  $\beta_1/\beta_2$ -adrénergiques (Jiang et al. 2015), soit d'une altération dans l'efficacité de couplage de ces récepteurs avec la protéine Gs (Nevelsteen et al. 2013). Selon Lima-Leopoldo et al. (2011), la diminution de l'effet inotrope positif n'est pas due à une altération dans les récepteurs  $\beta$ -

adrénergiques mais plutôt à une diminution de la concentration intracellulaire en calcium à la suite d'une diminution de l'activation des canaux calciques cardiaques.

Dans notre étude, l'activation chronique de la voie du GMPc a restauré la contractilité cardiaque et la vasodilatation coronaire consécutive à la stimulation  $\beta$ -adrénergique. Nous avons émis l'hypothèse que la modulation à long terme de la voie du GMPc *in vivo* aurait prévenu la désensibilisation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et aurait augmenté de ce fait leur sensibilité à toute nouvelle stimulation  $\beta$ -adrénergique.

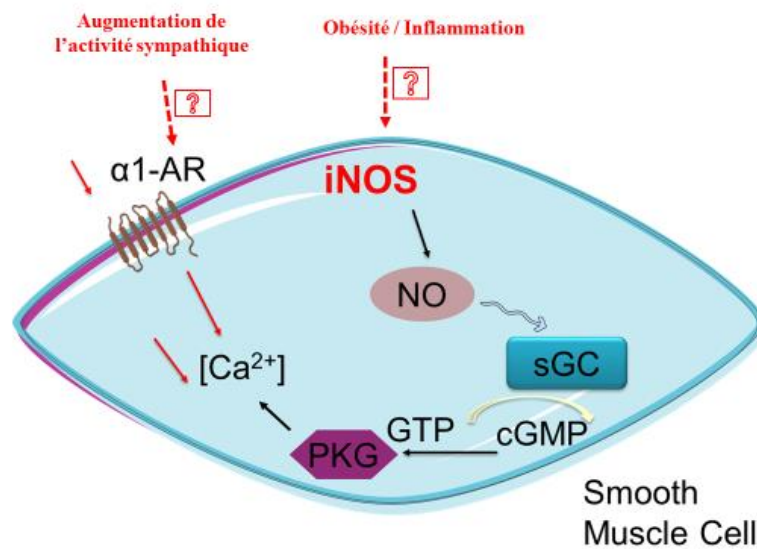
### 3. Etude sur la réactivité vasculaire

#### 3.1 Vasoconstriction $\alpha_1$ -adrénergique

Concernant l'étude de la réactivité vasculaire, nos résultats ont montré une diminution de la réponse  $\alpha_1$ -adrénergique aortique dans le groupe soumis au régime CD en comparaison avec le groupe témoin. La diminution de la contractilité aortique en réponse à la phényléphrine a été aussi rapportée dans d'autres modèles animaux de syndrome métabolique (Vendrame et al. 2014). L'altération de la vasoconstriction  $\alpha_1$ -adrénergique peut s'expliquer par une activation augmentée ou par une sur expression de la iNOS par les cytokines pro-inflammatoires dont la production augmente au cours de l'obésité (Silva et al. 2016) (**Figure 27**).

L'incubation des anneaux aortiques du groupe CD avec l'aminoguanidine, un inhibiteur de la NOS inducible, a normalisé dans nos conditions expérimentales la force maximale de contraction après stimulation à la phényléphrine. Ces observations suggèrent une implication de la voie de la iNOS dans la diminution de la réponse  $\alpha_1$ -adrénergique. Toutefois, nos résultats immunohistochimiques n'ont pas mis en évidence une augmentation de l'expression de la iNOS dans l'aorte thoracique isolée du groupe CD en comparaison au groupe témoin. Ce résultat n'exclut pas une potentielle implication de la voie de la iNOS dans cette altération étant donnée, que dans nos conditions expérimentales nous n'avons pas comparé l'activité de la iNOS entre les différents groupes. Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que l'hypertension artérielle peut être à l'origine d'une modification de la réactivité des cellules musculaires lisses entraînant soit une diminution du nombre des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques soit une diminution du couplage récepteur-protéine Gq contribuant ainsi à l'atténuation de la vasoconstriction  $\alpha_1$ -adrénergique (Battault et al. 2018). Le traitement à long-terme au BAY 41-2272 a significativement restauré la force maximale de contraction après stimulation  $\alpha_1$ -adrénergique. Ce résultat suggère une augmentation de la densité et /ou de la sensibilité des récepteurs  $\alpha_1$ -

adrénergiques qui a été probablement développée pour compenser l'effet de la stimulation prolongée de la GCs et par conséquent du GMPc.



**Figure 27:** Mécanismes hypothétiques impliqués dans l'altération de la contraction vasculaire à la phényléphrine

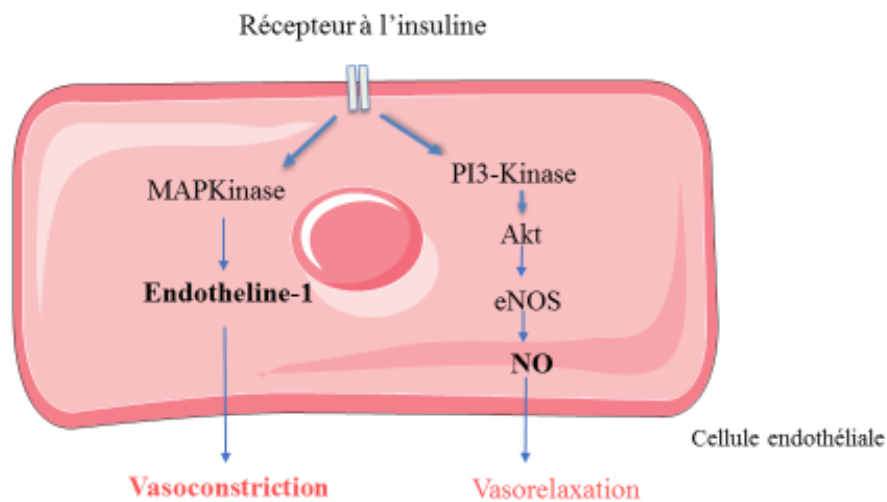
### 3.2 Vasorelaxation induite par l'insuline

Dans notre étude, nous avons montré une diminution significative de la vasorelaxation induite par l'insuline dans le groupe soumis au régime CD par rapport au groupe témoin. Cette observation suggère que l'altération de la réponse à l'insuline pourrait représenter un indicateur précoce de dysfonction endothéliale (déterminée par l'altération de la réponse à l'acétylcholine).

A l'état physiologique, les récepteurs à l'insuline de la cellule endothéliale activent 2 voies distinctes impliquées dans la régulation du tonus vasculaire : la voie des PI3 kinases qui active la eNOS et la synthèse du NO, et la voie des MAPKinases qui induit la synthèse de l'endothéline (Yang et al. 2007) (**Figure 28**). Il a été démontré que l'insulinorésistance était associée à une suractivation de la voie des MAPKinases au détriment de la voie des PI3 kinases ce qui entraîne une sécrétion accrue d'endothéline-1 masquant ainsi les effets vasorelaxants de l'insuline (Potenza et al. 2005). Nos résultats sont en accord avec ces observations étant donné que l'incubation des anneaux aortiques isolés du groupe CD avec le BQ-123, un antagoniste sélectif des récepteurs à l'endothéline-1, a significativement augmenté la vasorelaxation induite par l'insuline. Ce résultat suggère de ce fait, une implication de la voie de signalisation de l'endothéline-1 dans l'altération de la réponse à l'insuline.



Le traitement à long-terme au mirabegron a montré une tendance à améliorer la vasorelaxation induite par l'insuline et à diminuer l'hyperinsulinémie en comparaison au groupe CD. Cependant les mécanismes impliqués ne sont pas bien connus jusqu'à présent. Toutefois, il est possible que cette amélioration soit la conséquence de la diminution du gain de poids observée dans ce groupe et de l'amélioration de l'insulinorésistance.



**Figure 28:** Voies de signalisation vasculaire de l'insuline

#### VI. Etude de l'activation à long-terme de la voie du GMPc sur la composition du microbiote intestinal

Comme cité précédemment, notre étude n'a pas révélé de différences à l'échelle phylum entre le groupe CD et le groupe témoin. En revanche, nous avons montré une augmentation significative dans les genres *Roseburia* et *Prevotellaceae UCG-001* et une diminution de l'espèce *Lactobacillus spp* dans le groupe CD en comparaison au groupe témoin. Ces résultats sont partiellement en accord avec ceux de Lecomte et al. (2015) qui a montré une réduction de l'abondance des *Lactobacillus spp* dans un modèle de syndrome métabolique chez le rat. La diminution de l'abondance des *Lactobacillus spp* a été décrite comme négativement corrélée au poids corporel. De plus, selon Lecomte et al. (2015), les *Lactobacillus spp* jouent un rôle important dans la préservation de l'intégrité de la barrière intestinale. Ainsi une faible abondance des *Lactobacillus spp* pourrait être en lien avec le passage des endotoxines telles que les LPS dans la circulation sanguine, participant ainsi au développement de la résistance à l'insuline. Ensemble, ces résultats suggèrent une implication des *Lactobacillus spp* dans le développement du syndrome métabolique.

Notre étude est la première à évaluer les effets de la modulation de la voie du GMPc sur la composition du microbiote intestinal dans un modèle de syndrome métabolique chez le SHR. Il a été démontré que les nucléotides cyclique (*i.e GMPc*) jouent un rôle dans le contrôle de la motricité intestinale et dans l'absorption intestinale des nutriments (Arshad and Visweswariah 2013). Cependant, dans notre étude, les traitements à long-terme avec les activateurs de la voie du GMPc n'ont pas amélioré la composition du microbiote intestinal. Toutefois, il est important de signaler que les agonistes de la guanylate cyclase C (GC-C) augmentent les taux du GMPc dans l'épithélium intestinal (Sharman et al. 2017). Etant donné que cette enzyme soit principalement exprimée dans les cellules épithéliales intestinales et joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de la fonction du tube digestif (Uranga et al. 2018), il serait de ce fait, plus pertinent d'étudier l'interaction entre la modulation de la voie du GMPc et le microbiote intestinal par des activateurs de la GC-C.

## VII. Limites

- Dans cette étude, nous n'avons évalué que la réactivité  $\beta$ -adrénergique cardiaque médiée par le système orthosympathique. L'absence de l'évaluation du système parasympathique représente une limite de ce travail.
- Etant donné que la pression artérielle systémique est régulée par les artères de conductance (aorte thoracique) et par les artères de résistance (artères mésentériques), il aurait été pertinent d'étudier la réactivité vasculaire sur ces deux types de vaisseaux.

## Conclusion et perspectives

Les résultats obtenus dans ce travail ont permis de valider notre modèle animal de syndrome métabolique. Dans ce modèle, nous avons observé une diminution de la contractilité  $\beta$ -adrénergique cardiaque et  $\alpha_1$ -adrénergique vasculaire. Ces altérations étaient associées à une diminution de la vasorelaxation induite par l'insuline. De plus, nos travaux ont également mis en évidence des modifications dans la composition du microbiote intestinal à l'échelle « famille », « genre » et « espèce ».

L'activation à long-terme de la voie du GMPc a permis de diminuer le gain de poids excessif et d'améliorer la tolérance au glucose dans ce modèle, probablement en favorisant l'équilibre de la balance énergétique. Dans ce travail, nous avons montré que la modulation à long-terme de la voie du GMPc a rétabli la contractilité cardiaque et vasculaire ainsi que la vasodilatation coronaire. Cet effet cardiovasculaire protecteur observé par des approches *ex vivo* semble être lié à une prévention contre la désensibilisation des récepteurs  $\beta$ - et  $\alpha_1$ -adrénergiques qui pourrait se développer au cours du syndrome métabolique.

La prise en charge médicale du syndrome métabolique a pour objectif majeur de limiter le risque cardiovasculaire *via* la réduction de la dyslipidémie, la prévention du développement de l'hypertension artérielle et la gestion de l'obésité et de l'insulinorésistance. Sur la base des critères définissant ce syndrome et les recommandations de prise en charge des patients atteints de syndrome métabolique, plusieurs classes de médicaments sont utilisées pour réduire le poids (inhibiteurs de lipase, régulateurs de l'appétit), corriger le profil lipidique (statines) et contrôler l'hyperglycémie (antidiabétiques) et l'hypertension artérielle (antihypertenseurs). Les résultats obtenus dans le cadre de nos travaux permettent de formuler l'hypothèse selon laquelle les modulateurs de la voie du GMPc pourraient représenter une nouvelle option thérapeutique en raison notamment de leurs effets polyvalents, ciblant simultanément un certain nombre de facteurs du syndrome métabolique. Par ailleurs, il est important de souligner que la polythérapie, bien que nécessaire, est une stratégie très complexe à mettre en œuvre en raison des interactions médicamenteuses souvent sources de nombreux effets secondaires et des difficultés d'observance sur le long terme. Par conséquent, considérant le lien existant entre le microbiote intestinal et le développement et la pathogénie du syndrome métabolique, l'utilisation de mélanges bactériens comme « *pharmabiotiques* » pourrait s'avérer une nouvelle arme pour le traitement et la prévention du syndrome métabolique. Des investigations

ultérieures plus approfondies seront sans doute nécessaires pour évaluer cette nouvelle approche thérapeutique.

## Références bibliographiques

- Abou-Donia, Mohamed B., Eman M. El-Masry, Ali A. Abdel-Rahman, Roger E. McLendon, and Susan S. Schiffman. 2008. "Splenda Alters Gut Microflora and Increases Intestinal P-Glycoprotein and Cytochrome P-450 in Male Rats." *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 71 (21): 1415–29. <https://doi.org/10.1080/15287390802328630>.
- Alberti, K. G., and P. Z. Zimmet. 1998. "Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Provisional Report of a WHO Consultation." *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association* 15 (7): 539–53. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9136\(199807\)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S).
- Alberti, K. George M. M., Paul Zimmet, Jonathan Shaw, and IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. 2005. "The Metabolic Syndrome--a New Worldwide Definition." *Lancet (London, England)* 366 (9491): 1059–62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67402-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67402-8).
- Alvarez, Y., A. M. Briones, R. Hernanz, J. V. Pérez-Girón, M. J. Alonso, and M. Salaices. 2008. "Role of NADPH Oxidase and INOS in Vasoconstrictor Responses of Vessels from Hypertensive and Normotensive Rats." *British Journal of Pharmacology* 153 (5): 926–35. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707575>.
- Anderson, Paul D., Nehal N. Mehta, Megan L. Wolfe, Christine C. Hinkle, Leticia Pruscino, Lynne L. Comiskey, Jennifer Tabita-Martinez, et al. 2007. "Innate Immunity Modulates Adipokines in Humans." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92 (6): 2272–79. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-2545>.
- Anderson, Todd J. 2003. "Nitric Oxide, Atherosclerosis and the Clinical Relevance of Endothelial Dysfunction." *Heart Failure Reviews* 8 (1): 71–86.
- Armani, Andrea, Vincenzo Marzolla, Giuseppe M. C. Rosano, Andrea Fabbri, and Massimiliano Caprio. 2011. "Phosphodiesterase Type 5 (PDE5) in the Adipocyte: A Novel Player in Fat Metabolism?" *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 22 (10): 404–11. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.05.004>.
- Armoni, Michal, Chava Harel, Fabiana Bar-Yoseph, Simcha Milo, and Eddy Karnieli. 2005. "Free Fatty Acids Repress the GLUT4 Gene Expression in Cardiac Muscle via Novel Response Elements." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (41): 34786–95.

- <https://doi.org/10.1074/jbc.M502740200>.
- Arshad, Najla, and Sandhya S. Visweswariah. 2013. "Cyclic Nucleotide Signaling in Intestinal Epithelia: Getting to the Gut of the Matter." *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine* 5 (4): 409–24. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1223>.
- Atamer, A., A. Bilici, N. Yenice, S. Selek, N. Ilhan, and Y. Atamer. 2008. "The Importance of Paraoxonase 1 Activity, Nitric Oxide and Lipid Peroxidation in Hepatosteatois." *The Journal of International Medical Research* 36 (4): 771–76. <https://doi.org/10.1177/147323000803600419>.
- Avogaro, Angelo, and Saula Vigili de Kreutzenberg. 2005. "Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Obesity." *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 360 (1–2): 9–26. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.04.020>.
- Ayala, Julio E., Deanna P. Bracy, Brianna M. Julien, Jeffrey N. Rottman, Patrick T. Fueger, and David H. Wasserman. 2007. "Chronic Treatment with Sildenafil Improves Energy Balance and Insulin Action in High Fat-Fed Conscious Mice." *Diabetes* 56 (4): 1025–33. <https://doi.org/10.2337/db06-0883>.
- Bäckhed, Fredrik, Hao Ding, Ting Wang, Lora V. Hooper, Gou Young Koh, Andras Nagy, Clay F. Semenkovich, and Jeffrey I. Gordon. 2004. "The Gut Microbiota as an Environmental Factor That Regulates Fat Storage." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (44): 15718–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>.
- Bae, Hyun Kyung, Hyeryon Lee, Kwan Chang Kim, and Young Mi Hong. 2016. "The Effect of Sildenafil on Right Ventricular Remodeling in a Rat Model of Monocrotaline-Induced Right Ventricular Failure." *Korean Journal of Pediatrics* 59 (6): 262–70. <https://doi.org/10.3345/kjp.2016.59.6.262>.
- Bahia, Luciana, Luiz G. K. de Aguiar, Nivaldo Ribeiro Villela, Daniel Bottino, and Eliete Bouskela. 2006. "[The endothelium in the metabolic syndrome]." *Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia* 50 (2): 291–303. <https://doi.org/10.1590/s0004-27302006000200015>.
- Balkau, B., M. Vernay, L. Mhamdi, M. Novak, D. Arondel, S. Vol, J. Tichet, E. Eschwège, and D.E.S.I.R. Study Group. 2003. "The Incidence and Persistence of the NCEP (National Cholesterol Education Program) Metabolic Syndrome. The French D.E.S.I.R. Study." *Diabetes & Metabolism* 29 (5): 526–32.
- Batault, Sylvain, Cindy Meziat, Allesandro Nascimento, Laura Braud, Sandrine Gayraud, Christian Legros, Frederic De Nardi, et al. 2018a. "Vascular Endothelial Function

- Masks Increased Sympathetic Vasopressor Activity in Rats with Metabolic Syndrome.” *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 314 (3): H497–507. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00217.2017>.
- Belin de Chantemèle, Eric J., James D. Mintz, William E. Rainey, and David W. Stepp. 2011. “Impact of Leptin-Mediated Sympatho-Activation on Cardiovascular Function in Obese Mice.” *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 58 (2): 271–79. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.168427>.
- Belin de Chantemèle, Eric J., Kenjiro Muta, James Mintz, Michel L. Tremblay, Mario B. Marrero, David J. Fulton, and David W. Stepp. 2009. “Protein Tyrosine Phosphatase 1B, a Major Regulator of Leptin-Mediated Control of Cardiovascular Function.” *Circulation* 120 (9): 753–63. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.853077>.
- Bell-Reuss, E., D. L. Trevino, and C. W. Gottschalk. 1976. “Effect of Renal Sympathetic Nerve Stimulation on Proximal Water and Sodium Reabsorption.” *The Journal of Clinical Investigation* 57 (4): 1104–7. <https://doi.org/10.1172/JCI108355>.
- Benjamini, Y., and Y. Hochberg. 1995. “Controlling the false discovery rate: A Practical and powerful approach to multiple testing.” *J.Roy.Statist.Soc.* 57: 289–300.
- Benjelloun, H., S. Aboudrar, I. Jroundi, H. Benjelloun-Bennani, L. Coghlan, and M. Benomar. 2009. “[Sympathetic response in primary hypertension].” *Annales De Cardiologie Et D’angeiologie* 58 (3): 139–43. <https://doi.org/10.1016/j.ancard.2008.05.023>.
- Berlan, M., J. Galitzky, and J. L. Montastruc. 1995. “Beta 3-Adrenoceptors in the Cardiovascular System.” *Fundamental & Clinical Pharmacology* 9 (3): 234–39. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.1995.tb00290.x>.
- Bers, DM. 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. Jan 10 ;415(6868) :198-205
- Bian, Xiaoming, Liang Chi, Bei Gao, Pengcheng Tu, Hongyu Ru, and Kun Lu. 2017. “Gut Microbiome Response to Sucralose and Its Potential Role in Inducing Liver Inflammation in Mice.” *Frontiers in Physiology* 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00487>.
- Bibiloni, Rodrigo, Mathieu Membrez, and Chieh Jason Chou. 2009. “Microbiote intestinale, obésité et diabète.” *Annales Nestlé (Ed. française)* 67 (1): 39–48. <https://doi.org/10.1159/000222314>.
- Bik, Elisabeth M., Paul B. Eckburg, Steven R. Gill, Karen E. Nelson, Elizabeth A. Purdom, Fritz Francois, Guillermo Perez-Perez, Martin J. Blaser, and David A. Relman. 2006. “Molecular Analysis of the Bacterial Microbiota in the Human Stomach.” *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences* 103 (3): 732–37.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0506655103>.
- Bittencourt, J. C., F. Presse, C. Arias, C. Peto, J. Vaughan, J. L. Nahon, W. Vale, and P. E. Sawchenko. 1992. “The Melanin-Concentrating Hormone System of the Rat Brain: An Immuno- and Hybridization Histochemical Characterization.” *The Journal of Comparative Neurology* 319 (2): 218–45. <https://doi.org/10.1002/cne.903190204>.
- Boden, Guenther. 2008. “Obesity and Free Fatty Acids.” *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 37 (3): 635–46, viii–ix.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecl.2008.06.007>.
- Boden, Guenther, Peter Cheung, T. Peter Stein, Karen Kresge, and Maria Mozzoli. 2002. “FFA Cause Hepatic Insulin Resistance by Inhibiting Insulin Suppression of Glycogenolysis.” *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 283 (1): E12–19.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00429.2001>.
- Bonnardeaux, A. 1996. “Génétique de l’hypertension artérielle essentielle.” *médecine/sciences* 12 (5): 575. <https://doi.org/10.4267/10608/786>.
- Braam, Branko, and Marianne C. Verhaar. 2007. “Understanding ENOS for Pharmacological Modulation of Endothelial Function: A Translational View.” *Current Pharmaceutical Design* 13 (17): 1727–40. <https://doi.org/10.2174/138161207780831275>.
- Brahmadevara, Nataraj, Angus M. Shaw, and Allan MacDonald. 2003. “Evidence against Beta 3-Adrenoceptors or Low Affinity State of Beta 1-Adrenoceptors Mediating Relaxation in Rat Isolated Aorta.” *British Journal of Pharmacology* 138 (1): 99–106.  
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705017>.
- Bray, G. A. 1991. “Obesity, a Disorder of Nutrient Partitioning: The MONA LISA Hypothesis.” *The Journal of Nutrition* 121 (8): 1146–62. <https://doi.org/10.1093/jn/121.8.1146>.
- Brodde, O. E. 1991. “Pathophysiology of the Beta-Adrenoceptor System in Chronic Heart Failure: Consequences for Treatment with Agonists, Partial Agonists or Antagonists?” *European Heart Journal* 12 Suppl F (December): 54–62.  
[https://doi.org/10.1093/eurheartj/12.suppl\\_f.54](https://doi.org/10.1093/eurheartj/12.suppl_f.54).
- Brown, A. M., W. R. Saum, and F. H. Tuley. 1976. “A Comparison of Aortic Baroreceptor Discharge in Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats.” *Circulation Research* 39 (4): 488–96. <https://doi.org/10.1161/01.res.39.4.488>.
- Buglioni, Alessia, and John C. Burnett. 2016. “New Pharmacological Strategies to Increase CGMP.” *Annual Review of Medicine* 67: 229–43. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-052914-091923>.



- Cahill, Paul A., and Eileen M. Redmond. 2016. "Vascular Endothelium - Gatekeeper of Vessel Health." *Atherosclerosis* 248 (May): 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007>.
- Calaghan, Sarah, Lukasz Kozera, and Ed White. 2008. "Compartmentalisation of CAMP-Dependent Signalling by Caveolae in the Adult Cardiac Myocyte." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 45 (1): 88–92. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.04.004>.
- Canale, Maria Paola, Simone Manca di Villahermosa, Giuliana Martino, Valentina Rovella, Annalisa Noce, Antonino De Lorenzo, and Nicola Di Daniele. 2013. "Obesity-Related Metabolic Syndrome: Mechanisms of Sympathetic Overactivity." *International Journal of Endocrinology* 2013: 865965. <https://doi.org/10.1155/2013/865965>.
- Carette, Claire, Ludivine Muzard, Alina Radu, Charles Barsamian, and Marion Bretault. 2012a. "Traitement pharmacologique de l'obésité," 4.
- Carobbio, Stefania, Vanessa Pellegrinelli, and Antonio Vidal-Puig. 2017. "Adipose Tissue Function and Expandability as Determinants of Lipotoxicity and the Metabolic Syndrome." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 960: 161–96. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_7).
- Cassaglia, Priscila A., Sam M. Hermes, Sue A. Aicher, and Virginia L. Brooks. 2011. "Insulin Acts in the Arcuate Nucleus to Increase Lumbar Sympathetic Nerve Activity and Baroreflex Function in Rats." *The Journal of Physiology* 589 (Pt 7): 1643–62. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.205575>.
- Cavalcanti, Clênia de Oliveira, Rafael R. Alves, Alessandro L. de Oliveira, Josiane de Campos Cruz, Maria do Socorro de França-Silva, Valdir de Andrade Braga, and Camille de Moura Balarini. 2016. "Inhibition of PDE5 Restores Depressed Baroreflex Sensitivity in Renovascular Hypertensive Rats." *Frontiers in Physiology* 7: 15. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00015>.
- Cavalli, M., R. Carcano, and C. Beretta. 2002. "Different Contractile Effects of Alpha1- and Alpha2-Adrenergic Agonists on Horse Isolated Common Digital Artery Smooth Muscle Ring Preparations in Vitro." *Pharmacological Research* 46 (4): 311–16.
- Chan, Dick C., P. Hugh R. Barrett, and Gerald F. Watts. 2004. "Lipoprotein Kinetics in the Metabolic Syndrome: Pathophysiological and Therapeutic Lessons from Stable Isotope Studies." *The Clinical Biochemist. Reviews* 25 (1): 31–48.
- Chédotal, A., and E. Hamel. 1993. "L'innervation cholinergique de la paroi vasculaire." *M/S. Médecine sciences [revue papier, ISSN : 0767-0974], 1993, Vol. 9, N° 10; p.1035-42*.

<https://doi.org/10.4267/10608/2806>.

- Chruscinski, A., M. E. Brede, L. Meinel, M. J. Lohse, B. K. Kobilka, and L. Hein. 2001. "Differential Distribution of Beta-Adrenergic Receptor Subtypes in Blood Vessels of Knockout Mice Lacking Beta(1)- or Beta(2)-Adrenergic Receptors." *Molecular Pharmacology* 60 (5): 955–62. <https://doi.org/10.1124/mol.60.5.955>.
- Cobos-Segarra, Leonardo, Patricio Lopez-Jaramillo, Carlos Ponte-Negretti Ci, Raul Villar, and Ernesto Penaherrera. 2018. "Pharmacological Treatment of Hypertension: Effects in Endothelial Function." *Current Hypertension Reviews* 14 (2): 123–27. <https://doi.org/10.2174/1573402114666180508104828>.
- Constantinescu, Ioana M., Pompei Bolfa, Dan Constantinescu, Aurel I. Mironiuc, and Claudia D. Gherman. 2017. "Treatment with Sildenafil and Donepezil Improves Angiogenesis in Experimentally Induced Critical Limb Ischemia." *BioMed Research International* 2017: 9532381. <https://doi.org/10.1155/2017/9532381>.
- Correia, Marcelo L. G., and Kamal Rahmouni. 2006. "Role of Leptin in the Cardiovascular and Endocrine Complications of Metabolic Syndrome." *Diabetes, Obesity & Metabolism* 8 (6): 603–10. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2005.00562.x>.
- Corvol, P. 1993. "L'endothélium, plaque tournante de la vasomotricité et de la trophicité de la paroi artérielle." *médecine/sciences* 9 (10): 1031. <https://doi.org/10.4267/10608/2805>.
- Coudeyras, Sophie, and Christiane Forestier. 2010. "Microbiote et Probiotiques: Impact En Santé Humaine." *Canadian Journal of Microbiology* 56 (8): 611–50. <https://doi.org/10.1139/W10-052>.
- Cypess, Aaron M., Lauren S. Weiner, Carla Roberts-Toler, Elisa Franquet Elía, Skyler H. Kessler, Peter A. Kahn, Jeffrey English, et al. 2015. "Activation of Human Brown Adipose Tissue by a B3-Adrenergic Receptor Agonist." *Cell Metabolism* 21 (1): 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.009>.
- Dehvari, Nodi, Edilson Dantas da Silva Junior, Tore Bengtsson, and Dana Sabine Hutchinson. 2018. "Mirabegron: Potential off Target Effects and Uses beyond the Bladder." *British Journal of Pharmacology* 175 (21): 4072–82. <https://doi.org/10.1111/bph.14121>.
- Del Bas, J. M., M. Guirro, N. Boqué, A. Cereto, R. Ras, A. Crescenti, A. Caimari, N. Canela, and L. Arola. 2018. "Alterations in Gut Microbiota Associated with a Cafeteria Diet and the Physiological Consequences in the Host." *International Journal of Obesity (2005)* 42 (4): 746–54. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.284>.
- Delzenne, Nathalie M., and Patrice D. Cani. 2008. "[Gut microflora is a key player in host energy homeostasis]." *Medicine Sciences: M/S* 24 (5): 505–10.

- <https://doi.org/10.1051/medsci/2008245505>.
- Dessauer, Carmen W. 2009. "Adenylyl Cyclase–A-Kinase Anchoring Protein Complexes: The Next Dimension in CAMP Signaling." *Molecular Pharmacology* 76 (5): 935–41. <https://doi.org/10.1124/mol.109.059345>.
- Dessy, C., S. Moniotte, P. Ghisdal, X. Havaux, P. Noirhomme, and J. L. Balligand. 2004. "Endothelial Beta3-Adrenoceptors Mediate Vasorelaxation of Human Coronary Microarteries through Nitric Oxide and Endothelium-Dependent Hyperpolarization." *Circulation* 110 (8): 948–54. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000139331.85766.AF>.
- Devic, E., Y. Xiang, D. Gould, and B. Kobilka. 2001. "Beta-Adrenergic Receptor Subtype-Specific Signaling in Cardiac Myocytes from Beta(1) and Beta(2) Adrenoceptor Knockout Mice." *Molecular Pharmacology* 60 (3): 577–83.
- Doggrell, S. A., and L. Brown. 1998. "Rat Models of Hypertension, Cardiac Hypertrophy and Failure." *Cardiovascular Research* 39 (1): 89–105. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(98\)00076-5](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(98)00076-5).
- Domenico, Regoli. 2004. "Pharmacology of Nitric Oxide: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies." *Current Pharmaceutical Design* 10 (14): 1667–76. <https://doi.org/10.2174/1381612043384709>.
- Doré, J., and G. Corthier. 2010. "Le microbiote intestinal humain." *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, Le microbiote intestinal : équilibre, dysbiose et reconstruction, 34 (4, Supplement 1): 7–16. [https://doi.org/10.1016/S0399-8320\(10\)70002-6](https://doi.org/10.1016/S0399-8320(10)70002-6).
- Duclos, M. 2007. "Prévention et traitement du syndrome métabolique : rôle de l'activité physique." </data/revues/07651597/00220003/07000640/>, August. <https://www.em-consulte.com/en/article/65222>.
- Duncan, S. H., G. E. Loble, G. Holtrop, J. Ince, A. M. Johnstone, P. Louis, and H. J. Flint. 2008. "Human Colonic Microbiota Associated with Diet, Obesity and Weight Loss." *International Journal of Obesity (2005)* 32 (11): 1720–24. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.155>.
- Duriez, P. 2004. "Mécanismes de formation de la plaque d'athérome." *La Revue de Médecine Interne* 25 (June): S3–6. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2004.04.010>.
- Eikelis, Nina, and Murray Esler. 2005. "The Neurobiology of Human Obesity." *Experimental Physiology* 90 (5): 673–82. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2005.031385>.
- Engin, Atila. 2017. "Endothelial Dysfunction in Obesity." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 960: 345–79. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_15).
- Enzi, G., L. Busetto, E. M. Inelmen, A. Coin, and G. Sergi. 2003. "Historical Perspective:

- Visceral Obesity and Related Comorbidity in Joannes Baptista Morgagni's 'De Sedibus et Causis Morborum per Anatomen Indagata.'" *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 27 (4): 534–35. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802268>.
- Erwin G. Zoetendal, Willem M. de Vos, Antoon D. L. Akkermans, Wilma M. Akkermans-van Vliet, J. Arjan G. M. de Visser. 2001. "The Host Genotype Affects the Bacterial Community in the Human Gastrointestinal Tract." *Microbial Ecology in Health and Disease* 13 (3): 129–34. <https://doi.org/10.1080/089106001750462669>.
- Escudié, Frédéric, Lucas Auer, Maria Bernard, Mahendra Mariadassou, Laurent Cauquil, Katia Vidal, Sarah Maman, Guillermina Hernandez-Raquet, Sylvie Combes, and Géraldine Pascal. 2018. "FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution." Edited by Bonnie Berger. *Bioinformatics* 34 (8): 1287–94. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>.
- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. 2001. "Executive Summary of The 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)." *JAMA* 285 (19): 2486–97. <https://doi.org/10.1001/jama.285.19.2486>.
- Feng, Ming-Guo, Minolfa C. Prieto, and L. Gabriel Navar. 2012. "Nebivolol-Induced Vasodilation of Renal Afferent Arterioles Involves B3-Adrenergic Receptor and Nitric Oxide Synthase Activation." *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 303 (5): F775-782. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00233.2012>.
- Fernández de Sevilla, David, Angel Núñez, Michel Borde, Roberto Malinow, and Washington Buño. 2008. "Cholinergic-Mediated IP3-Receptor Activation Induces Long-Lasting Synaptic Enhancement in CA1 Pyramidal Neurons." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (6): 1469–78. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2723-07.2008>.
- Fleming, Ingrid, and Rudi Busse. 2003. "Molecular Mechanisms Involved in the Regulation of the Endothelial Nitric Oxide Synthase." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 284 (1): R1-12. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00323.2002>.
- Florian, John P., and James A. Pawelczyk. 2009. "Non-Esterified Fatty Acids Increase Arterial Pressure via Central Sympathetic Activation in Humans." *Clinical Science (London, England: 1979)* 118 (1): 61–69. <https://doi.org/10.1042/CS20090063>.
- Francis, Sharron H., Jennifer L. Busch, Jackie D. Corbin, and David Sibley. 2010. "CGMP-

- Dependent Protein Kinases and CGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and CGMP Action.” *Pharmacological Reviews* 62 (3): 525–63. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002907>.
- Freedman, N. J., and R. J. Lefkowitz. 1996. “Desensitization of G Protein-Coupled Receptors.” *Recent Progress in Hormone Research* 51: 319–51; discussion 352-353.
- Freier, T. A., D. C. Beitz, L. Li, and P. A. Hartman. 1994. “Characterization of Eubacterium Coprostanoligenes Sp. Nov., a Cholesterol-Reducing Anaerobe.” *International Journal of Systematic Bacteriology* 44 (1): 137–42. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-1-137>.
- Furchgott, R. F., and J. V. Zawadzki. 1980. “The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine.” *Nature* 288 (5789): 373–76. <https://doi.org/10.1038/288373a0>.
- Furukawa, Shigetada, Takuya Fujita, Michio Shimabukuro, Masanori Iwaki, Yukio Yamada, Yoshimitsu Nakajima, Osamu Nakayama, Makoto Makishima, Morihiro Matsuda, and Ichiro Shimomura. 2004. “Increased Oxidative Stress in Obesity and Its Impact on Metabolic Syndrome.” *The Journal of Clinical Investigation* 114 (12): 1752–61. <https://doi.org/10.1172/JCI21625>.
- Gaboriau-Routhiau, Valérie, and Nadine Cerf-Bensussan. 2016. “[Gut microbiota and development of the immune system].” *Medecine Sciences: M/S* 32 (11): 961–67. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163211011>.
- Gadegbeku, Crystal A., Arachelvi Dhandayuthapani, Zara E. Sadler, and Brent M. Egan. 2002. “Raising Lipids Acutely Reduces Baroreflex Sensitivity.” *American Journal of Hypertension* 15 (6): 479–85. [https://doi.org/10.1016/s0895-7061\(02\)02275-6](https://doi.org/10.1016/s0895-7061(02)02275-6).
- Galinier, M., A. Pathak, J. Roncalli, and P. Massabuau. 2005. “[Obesity and cardiac failure].” *Archives Des Maladies Du Coeur Et Des Vaisseaux* 98 (1): 39–45.
- Galletti, Ferruccio, Antonio Barbato, Marco Versiero, Roberto Iacone, Ornella Russo, Gianvincenzo Barba, Alfonso Siani, et al. 2007. “Circulating Leptin Levels Predict the Development of Metabolic Syndrome in Middle-Aged Men: An 8-Year Follow-up Study.” *Journal of Hypertension* 25 (8): 1671–77. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e3281afa09e>.
- Gauthier, C., V. Leblais, L. Kobzik, J. N. Trochu, N. Khandoudi, A. Bril, J. L. Balligand, and H. Le Marec. 1998. “The Negative Inotropic Effect of Beta3-Adrenoceptor Stimulation Is Mediated by Activation of a Nitric Oxide Synthase Pathway in Human Ventricle.” *The Journal of Clinical Investigation* 102 (7): 1377–84. <https://doi.org/10.1172/JCI2191>.

- Gauthier, C., G. Tavernier, F. Charpentier, D. Langin, and H. Le Marec. 1996. "Functional Beta3-Adrenoceptor in the Human Heart." *The Journal of Clinical Investigation* 98 (2): 556–62. <https://doi.org/10.1172/JCI118823>.
- Genser, Laurent, Christine Poitou, Édith Brot-Laroche, Monique Rousset, Jean-Christophe Vaillant, Karine Clément, Sophie Thenet, and Armelle Leturque. 2016. "L'altération de la perméabilité intestinale : chaînon manquant entre dysbiose et inflammation au cours de l'obésité ?" *médecine/sciences* 32 (5): 461–69. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163205012>.
- Gérard, P. 2011. "Le microbiote intestinal: composition et fonctions." *Phytothérapie* 9 (2): 72–75. <https://doi.org/10.1007/s10298-011-0615-8>.
- Gérard, Philippe, and Annick Bernalier-Donadille. 2007. "Les fonctions majeures du microbiote intestinal." *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 42 (April): 28–36. [https://doi.org/10.1016/S0007-9960\(07\)91318-8](https://doi.org/10.1016/S0007-9960(07)91318-8).
- Geronooz, Isabelle, and Jean-Marie Krzesinski. 2000. "Obésité et hypertension artérielle: de la physiopathologie au traitement." *Revue Médicale de Liège* 55 (10). <https://orbi.uliege.be/handle/2268/10638>.
- Gierach, Marcin, Joanna Gierach, and Roman Junik. 2016. "Evaluation of Lipid Profiles in Patients with Metabolic Syndrome According to Cardiovascular Risk Calculated on the Basis of the SCORE Chart." *Endokrynologia Polska* 67 (3): 265–70. <https://doi.org/10.5603/EP.a2016.0020>.
- Godon, J J, E Zumstein, P Dabert, F Habouzit, and R Moletta. 1997. "Molecular Microbial Diversity of an Anaerobic Digester as Determined by Small-Subunit rDNA Sequence Analysis." *Applied and Environmental Microbiology* 63 (7): 2802–13.
- Gómez-Guzmán, Manuel, Marta Toral, Miguel Romero, Rosario Jiménez, Pilar Galindo, Manuel Sánchez, María José Zarzuelo, Mónica Olivares, Julio Gálvez, and Juan Duarte. 2015a. "Antihypertensive Effects of Probiotics Lactobacillus Strains in Spontaneously Hypertensive Rats." *Molecular Nutrition & Food Research* 59 (11): 2326–36. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500290>.
- Gomez-Smith, Mariana, Sudhir Karthikeyan, Matthew S. Jeffers, Rafal Janik, Lysie A. Thomason, Bojana Stefanovic, and Dale Corbett. 2016. "A Physiological Characterization of the Cafeteria Diet Model of Metabolic Syndrome in the Rat." *Physiology & Behavior* 167: 382–91. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.09.029>.
- Grassi, Guido, Raffaella Dell'Oro, Annalisa Facchini, Fosca Quarti Trevano, Giovanni Battista Bolla, and Giuseppe Mancina. 2004. "Effect of Central and Peripheral Body Fat

- Distribution on Sympathetic and Baroreflex Function in Obese Normotensives.” *Journal of Hypertension* 22 (12): 2363–69. <https://doi.org/10.1097/00004872-200412000-00019>.
- Grassi, Guido, Allyn Mark, and Murray Esler. 2015. “The Sympathetic Nervous System Alterations in Human Hypertension.” *Circulation Research* 116 (6): 976–90. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303604>.
- Griendling, Kathy K., and Garret A. FitzGerald. 2003. “Oxidative Stress and Cardiovascular Injury: Part II: Animal and Human Studies.” *Circulation* 108 (17): 2034–40. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000093661.90582.c4>.
- Grossman, W., L. P. McLaurin, and M. A. Stefadouros. 1974. “Left Ventricular Stiffness Associated with Chronic Pressure and Volume Overloads in Man.” *Circulation Research* 35 (5): 793–800. <https://doi.org/10.1161/01.res.35.5.793>.
- Guimarães, S., and D. Moura. 2001. “Vascular Adrenoceptors: An Update.” *Pharmacological Reviews* 53 (2): 319–56.
- Gutierrez, Dario A., Michael J. Puglisi, and Alyssa H. Hasty. 2009. “Impact of Increased Adipose Tissue Mass on Inflammation, Insulin Resistance, and Dyslipidemia.” *Current Diabetes Reports* 9 (1): 26–32.
- Halimi, S., N. Studer, and P. Faure. 2010. “Le Fructose : Effet Des Régimes Riches En Fructose Sur l’incidence de l’obésité, Du Syndrome Métabolique, Du Diabète de Type 2 et Le Risque Cardiovasculaire et Rénal.” *Médecine Des Maladies Métaboliques* 4 (5): 521–29. [https://doi.org/10.1016/S1957-2557\(10\)70117-6](https://doi.org/10.1016/S1957-2557(10)70117-6).
- Hao, Lei, Sheyenne Scott, Mehrnaz Abbasi, Yujiao Zu, Md Shahjalal Hossain Khan, Yang Yang, Dayong Wu, Ling Zhao, and Shu Wang. 2019. “Beneficial Metabolic Effects of Mirabegron In Vitro and in High-Fat Diet-Induced Obese Mice.” *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 369 (3): 419–27. <https://doi.org/10.1124/jpet.118.255778>.
- Harmsen, Hermie J. M., and Marcus C. de Goffau. 2016. “The Human Gut Microbiota.” *Advances in Experimental Medicine and Biology* 902: 95–108. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-31248-4\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-31248-4_7).
- Haynes, W. G. 2000. “Interaction between Leptin and Sympathetic Nervous System in Hypertension.” *Current Hypertension Reports* 2 (3): 311–18.
- Hillier, T. A., A. Fagot-Campagna, E. Eschwège, S. Vol, M. Cailleau, B. Balkau, and D.E.S.I.R. Study group. 2006. “Weight Change and Changes in the Metabolic Syndrome as the French Population Moves towards Overweight: The D.E.S.I.R. Cohort.” *International*

- Journal of Epidemiology* 35 (1): 190–96. <https://doi.org/10.1093/ije/dyi281>.
- Ho, David, Lin Yan, Kousaku Iwatsubo, Dorothy E. Vatner, and Stephen F. Vatner. 2010. “Modulation of Beta-Adrenergic Receptor Signaling in Heart Failure and Longevity: Targeting Adenylyl Cyclase Type 5.” *Heart Failure Reviews* 15 (5): 495–512. <https://doi.org/10.1007/s10741-010-9183-5>.
- Hoffmann, Linda S., Jennifer Etzrodt, Lena Willkomm, Abhishek Sanyal, Ludger Scheja, Alexander W. C. Fischer, Johannes-Peter Stasch, et al. 2015. “Stimulation of Soluble Guanylyl Cyclase Protects against Obesity by Recruiting Brown Adipose Tissue.” *Nature Communications* 6 (May): 7235. <https://doi.org/10.1038/ncomms8235>.
- Hoffmann, Linda S., Christopher J. Larson, and Alexander Pfeifer. 2016. “cGMP and Brown Adipose Tissue.” *Handbook of Experimental Pharmacology* 233: 283–99. [https://doi.org/10.1007/164\\_2015\\_3](https://doi.org/10.1007/164_2015_3).
- Holscher, Hannah D. 2017. “Dietary Fiber and Prebiotics and the Gastrointestinal Microbiota.” *Gut Microbes* 8 (2): 172–84. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1290756>.
- Horan, M. J., and W. Lovenberg. 1986. “Genetic Rat Models for Hypertension: Guidelines for Breeding, Care and Use.” *Journal of Hypertension. Supplement: Official Journal of the International Society of Hypertension* 4 (3): S7-9.
- Hrometz, Sandra L., and Kelly M. Shields. 2006. “Sildenafil Citrate for the Treatment of Pulmonary Hypertension.” *Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998)* 42 (12): 771–84. <https://doi.org/10.1358/dot.2006.42.12.1032057>.
- Huang, Paul L. 2009. “A Comprehensive Definition for Metabolic Syndrome.” *Disease Models & Mechanisms* 2 (5–6): 231–37. <https://doi.org/10.1242/dmm.001180>.
- Hulman, S., B. Falkner, and N. Freyvogel. 1993. “Insulin Resistance in the Conscious Spontaneously Hypertensive Rat: Euglycemic Hyperinsulinemic Clamp Study.” *Metabolism: Clinical and Experimental* 42 (1): 14–18. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(93\)90165-k](https://doi.org/10.1016/0026-0495(93)90165-k).
- Hutley, Louise, and Johannes B. Prins. 2005. “Fat as an Endocrine Organ: Relationship to the Metabolic Syndrome.” *The American Journal of the Medical Sciences* 330 (6): 280–89. <https://doi.org/10.1097/00000441-200512000-00005>.
- Incalza, Maria Angela, Rossella D’Oria, Annalisa Natalicchio, Sebastio Perrini, Luigi Laviola, and Francesco Giordano. 2018. “Oxidative Stress and Reactive Oxygen Species in Endothelial Dysfunction Associated with Cardiovascular and Metabolic Diseases.” *Vascular Pharmacology* 100: 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.05.005>.
- Jaber, Mohamed, and Bruno Giros. 2012. “Les Kinases Couplées Aux Protéines G :



- Désensibilisation Des Récepteurs -Adrenergiques et Régulation de l'activité Cardiaque." *Médecine/Sciences* 14 (August): 210. <https://doi.org/10.4267/10608/1012>.
- Jacobsen, Jens Christian Brings, Morten Sonne Hornbech, and Niels-Henrik Holstein-Rathlou. 2011. "Significance of Microvascular Remodelling for the Vascular Flow Reserve in Hypertension." *Interface Focus* 1 (1): 117–31. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2010.0003>.
- Jandhyala, Sai Manasa, Rupjyoti Talukdar, Chivkula Subramanyam, Harish Vuyyuru, Mitnala Sasikala, and D. Nageshwar Reddy. 2015. "Role of the Normal Gut Microbiota." *World Journal of Gastroenterology* 21 (29): 8787–8803. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>.
- Jiang, Cheng, Aude Carillion, Na Na, Audrey De Jong, Sarah Feldman, Jean-Marc Lacorte, Dominique Bonnefont-Rousselot, Bruno Riou, and Julien Amour. 2015a. "Modification of the  $\beta$ -Adrenoceptor Stimulation Pathway in Zucker Obese and Obese Diabetic Rat Myocardium." *Critical Care Medicine* 43 (7): e241-249. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000999>.
- Johnson, Amy R., Matthew D. Wilkerson, Brante P. Sampey, Melissa A. Troester, D. Neil Hayes, and Liza Makowski. 2016. "Cafeteria Diet-Induced Obesity Causes Oxidative Damage in White Adipose." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 473 (2): 545–50. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.113>.
- Kadowaki, Takashi, Toshimasa Yamauchi, Naoto Kubota, Kazuo Hara, Kohjiro Ueki, and Kazuyuki Tobe. 2006. "Adiponectin and Adiponectin Receptors in Insulin Resistance, Diabetes, and the Metabolic Syndrome." *The Journal of Clinical Investigation* 116 (7): 1784–92. <https://doi.org/10.1172/JCI29126>.
- Kaoutari, Abdessamad El, Fabrice Armougom, Didier Raoult, and Bernard Henrissat. 2014. "Le microbiote intestinal et la digestion des polysaccharides." *médecine/sciences* 30 (3): 259–65. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143003013>.
- Kaur, Jaspinder. 2014. "A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome." *Cardiology Research and Practice* 2014: 943162. <https://doi.org/10.1155/2014/943162>.
- Keef, K. D., J. R. Hume, and J. Zhong. 2001. "Regulation of Cardiac and Smooth Muscle Ca(2+) Channels (Ca(V)1.2a,b) by Protein Kinases." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 281 (6): C1743-1756. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.281.6.C1743>.
- Ketonen, Juha, Taru Pilvi, and Eero Mervaala. 2010a. "Caloric Restriction Reverses High-Fat Diet-Induced Endothelial Dysfunction and Vascular Superoxide Production in C57Bl/6 Mice." *Heart and Vessels* 25 (3): 254–62. <https://doi.org/10.1007/s00380-009-1182-x>.

- 2010b. “Caloric Restriction Reverses High-Fat Diet-Induced Endothelial Dysfunction and Vascular Superoxide Production in C57Bl/6 Mice.” *Heart and Vessels* 25 (3): 254–62. <https://doi.org/10.1007/s00380-009-1182-x>.
- Kim, G. W., J. E. Lin, E. S. Blomain, and S. A. Waldman. 2014. “Antiobesity Pharmacotherapy: New Drugs and Emerging Targets.” *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 95 (1): 53–66. <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.204>.
- Kim, J. K., O. Gavrilova, Y. Chen, M. L. Reitman, and G. I. Shulman. 2000. “Mechanism of Insulin Resistance in A-ZIP/F-1 Fatless Mice.” *The Journal of Biological Chemistry* 275 (12): 8456–60. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8456>.
- Kim, Jeong-a, Monica Montagnani, Kwang Kon Koh, and Michael J. Quon. 2006. “Reciprocal Relationships between Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction: Molecular and Pathophysiological Mechanisms.” *Circulation* 113 (15): 1888–1904. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.563213>.
- Komalavilas, P., and T. M. Lincoln. 1994. “Phosphorylation of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor by Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase.” *The Journal of Biological Chemistry* 269 (12): 8701–7.
- Konukoglu, Dildar, and Hafize Uzun. 2017. “Endothelial Dysfunction and Hypertension.” *Advances in Experimental Medicine and Biology* 956: 511–40. [https://doi.org/10.1007/5584\\_2016\\_90](https://doi.org/10.1007/5584_2016_90).
- Kubíková, Tereza, Petra Kochová, Jan Brázdil, Jaroslav Špatenka, Jan Burkert, Milena Králíčková, and Zbyněk Tonar. 2017. “The Composition and Biomechanical Properties of Human Cryopreserved Aortas, Pulmonary Trunks, and Aortic and Pulmonary Cusps.” *Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger: Official Organ of the Anatomische Gesellschaft* 212 (July): 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2017.03.004>.
- Kuboki, K., Z. Y. Jiang, N. Takahara, S. W. Ha, M. Igarashi, T. Yamauchi, E. P. Feener, T. P. Herbert, C. J. Rhodes, and G. L. King. 2000. “Regulation of Endothelial Constitutive Nitric Oxide Synthase Gene Expression in Endothelial Cells and in Vivo : A Specific Vascular Action of Insulin.” *Circulation* 101 (6): 676–81. <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.6.676>.
- La Russa, Daniele, Francesca Giordano, Alessandro Marrone, Maddalena Parafati, Elzbieta Janda, and Daniela Pellegrino. 2019. “Oxidative Imbalance and Kidney Damage in Cafeteria Diet-Induced Rat Model of Metabolic Syndrome: Effect of Bergamot Polyphenolic Fraction.” *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 8 (3).

- <https://doi.org/10.3390/antiox8030066>.
- Lafontan, M. 2014. “Dysfonctions du système nerveux sympathique et de la signalisation catécholaminergique chez l’obèse.” *Obésité* 9 (1): 14–30. <https://doi.org/10.1007/s11690-013-0409-2>.
- Lafontan, Max. 2003. “Obésité humaine et système nerveux sympathique.” *Oléagineux, Corps gras, Lipides* 10 (2): 124–30. <https://doi.org/10.1051/ocl.2003.0124>.
- Landman, C., and E. Quévrain. 2016. “Le microbiote intestinal : description, rôle et implication physiopathologique.” *La Revue de Médecine Interne* 37 (6): 418–23. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2015.12.012>.
- Landsberg, L. 2001. “Insulin-Mediated Sympathetic Stimulation: Role in the Pathogenesis of Obesity-Related Hypertension (or, How Insulin Affects Blood Pressure, and Why).” *Journal of Hypertension* 19 (3 Pt 2): 523–28. <https://doi.org/10.1097/00004872-200103001-00001>.
- Landsberg, Lewis. 2006. “Feast or Famine: The Sympathetic Nervous System Response to Nutrient Intake.” *Cellular and Molecular Neurobiology* 26 (4–6): 497–508. <https://doi.org/10.1007/s10571-006-9010-7>.
- Leclerc, Marion, Catherine Juste, Hervé Blottière, and Joël Doré. 2007a. “Microbiote intestinal : un univers méconnu.” *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 42 (April): 22–27. [https://doi.org/10.1016/S0007-9960\(07\)91317-6](https://doi.org/10.1016/S0007-9960(07)91317-6).
- Lecomte, Virginie, Nadeem O. Kaakoush, Christopher A. Maloney, Mukesh Raipuria, Karina D. Huinao, Hazel M. Mitchell, and Margaret J. Morris. 2015. “Changes in Gut Microbiota in Rats Fed a High Fat Diet Correlate with Obesity-Associated Metabolic Parameters.” *PloS One* 10 (5): e0126931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126931>.
- Lehnen, Alexandre M., Bruno Rodrigues, Maria Cláudia Irigoyen, Kátia De Angelis, and Beatriz D’Agord Schaan. 2013. “Cardiovascular Changes in Animal Models of Metabolic Syndrome.” *Journal of Diabetes Research* 2013: 761314. <https://doi.org/10.1155/2013/761314>.
- Leosco, Dario, Valentina Parisi, Grazia D. Femminella, Roberto Formisano, Laura Petraglia, Elena Allocca, and Domenico Bonaduce. 2013. “Effects of Exercise Training on Cardiovascular Adrenergic System.” *Frontiers in Physiology* 4 (November): 348. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00348>.
- Li, Jinghua, Zhenwei Zhong, Jiru Yuan, Xiaohang Chen, Ziyang Huang, and Zeyu Wu. 2019. “Resveratrol Improves Endothelial Dysfunction and Attenuates Atherogenesis in

- Apolipoprotein E-Deficient Mice.” *The Journal of Nutritional Biochemistry* 67 (May): 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.01.022>.
- Li, Ting-Bo, Jie-Jie Zhang, Bin Liu, Xiu-Ju Luo, Qi-Lin Ma, and Jun Peng. 2017. “Dysfunction of Endothelial Progenitor Cells in Hyperlipidemic Rats Involves the Increase of NADPH Oxidase Derived Reactive Oxygen Species Production.” *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 95 (5): 474–80. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0142>.
- Lian, Tian-Yu, Xin Jiang, and Zhi-Cheng Jing. 2017. “Riociguat: A Soluble Guanylate Cyclase Stimulator for the Treatment of Pulmonary Hypertension.” *Drug Design, Development and Therapy* 11: 1195–1207. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S117277>.
- Liang, Chang-Seng, Weike Mao, and Jiahao Liu. 2008. “Pro-Apoptotic Effects of Anti-Beta1-Adrenergic Receptor Antibodies in Cultured Rat Cardiomyocytes: Actions on Endoplasmic Reticulum and the Prosurvival PI3K-Akt Pathway.” *Autoimmunity* 41 (6): 434–41. <https://doi.org/10.1080/08916930802031710>.
- Lima-Leopoldo, Ana Paula, André S. Leopoldo, Mário M. Sugizaki, Alessandro Bruno, André F. Nascimento, Renata A. M. Luvizotto, Silvio A. de Oliveira Júnior, Edson Castardeli, Carlos R. Padovani, and Antonio C. Cicogna. 2011. “Myocardial Dysfunction and Abnormalities in Intracellular Calcium Handling in Obese Rats.” *Arquivos Brasileiros De Cardiologia* 97 (3): 232–40. <https://doi.org/10.1590/s0066-782x2011005000061>.
- Lin, Hong, Yanpeng An, Huiru Tang, and Yulan Wang. 2019. “Alterations of Bile Acids and Gut Microbiota in Obesity Induced by High Fat Diet in Rat Model.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67 (13): 3624–32. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00249>.
- Maison, P., C. D. Byrne, C. N. Hales, N. E. Day, and N. J. Wareham. 2001. “Do Different Dimensions of the Metabolic Syndrome Change Together over Time? Evidence Supporting Obesity as the Central Feature.” *Diabetes Care* 24 (10): 1758–63. <https://doi.org/10.2337/diacare.24.10.1758>.
- McCracken, Emma, Monica Monaghan, and Shiva Sreenivasan. 2018. “Pathophysiology of the Metabolic Syndrome.” *Clinics in Dermatology* 36 (1): 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2017.09.004>.
- McMurray, John J. V., Stamatis Adamopoulos, Steffen D. Anker, Angelo Auricchio, Michael Böhm, Kenneth Dickstein, Volkmar Falk, et al. 2012. “[ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012].” *Türk Kardiyoloji Dernegi Arsivi: Turk Kardiyoloji Derneginin Yayin Organidir* 40 Suppl 3 (October): 77–137.

- Meyers, Melissa R., and Noyan Gokce. 2007. "Endothelial Dysfunction in Obesity: Etiological Role in Atherosclerosis." *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity* 14 (5): 365–69. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e3282be90a8>.
- Miâdi-Messaoud, H., A. Chouchane, E. Abderrazek, H. Debbabi, M. Zaouali-Ajina, Z. Tabka, and A. Ben-Jebria. 2010. "Obesity-Induced Impairment of Endothelium-Dependent Vasodilation in Tunisian Women." *International Journal of Obesity (2005)* 34 (2): 273–79. <https://doi.org/10.1038/ijo.2009.231>.
- Miloradović, Zoran, Durdica Jovović, Nevena Mihailović-Stanojević, Jelica Grujić Milanović, and Sladan Milanović. 2008. "Effects of Long-Term Losartan and L-Arginine Treatment on Haemodynamics, Glomerular Filtration, and SOD Activity in Spontaneously Hypertensive Rats." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 86 (4): 210–14. <https://doi.org/10.1139/Y08-022>.
- Mittendorf, Joachim, Stefan Weigand, Cristina Alonso-Alija, Erwin Bischoff, Achim Feurer, Michael Gerisch, Armin Kern, et al. 2009. "Discovery of Riociguat (BAY 63-2521): A Potent, Oral Stimulator of Soluble Guanylate Cyclase for the Treatment of Pulmonary Hypertension." *ChemMedChem* 4 (5): 853–65. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200900014>.
- Moens, An L., Jordan S. Leyton-Mange, Xiaolin Niu, Ronghua Yang, Oscar Cingolani, Elisabeth K. Arkenbout, Hunter C. Champion, et al. 2009. "Adverse Ventricular Remodeling and Exacerbated NOS Uncoupling from Pressure-Overload in Mice Lacking the Beta3-Adrenoreceptor." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 47 (5): 576–85. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.06.005>.
- Mollace, Vincenzo, Carolina Muscoli, Emanuela Masini, Salvatore Cuzzocrea, and Daniela Salvemini. 2005. "Modulation of Prostaglandin Biosynthesis by Nitric Oxide and Nitric Oxide Donors." *Pharmacological Reviews* 57 (2): 217–52. <https://doi.org/10.1124/pr.57.2.1>.
- Monda, Vincenzo, Ines Villano, Antonietta Messina, Anna Valenzano, Teresa Esposito, Fiorenzo Moscatelli, Andrea Viggiano, et al. 2017. "Exercise Modifies the Gut Microbiota with Positive Health Effects." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017: 3831972. <https://doi.org/10.1155/2017/3831972>.
- Montagnani, M., H. Chen, V. A. Barr, and M. J. Quon. 2001. "Insulin-Stimulated Activation of eNOS Is Independent of Ca<sup>2+</sup> but Requires Phosphorylation by Akt at Ser(1179)." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (32): 30392–98. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103702200>.

- Morgado, Manuel, Elisa Cairrão, António José Santos-Silva, and Ignacio Verde. 2012. “Cyclic Nucleotide-Dependent Relaxation Pathways in Vascular Smooth Muscle.” *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 69 (2): 247–66. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0815-2>.
- Moro, Cédric. 2013. “Contrôle du métabolisme énergétique par les peptides natriurétiques.” *médecine/sciences* 29 (3): 252–54. <https://doi.org/10.1051/medsci/2013293008>.
- Mozes, Stefan, Dobroslava Bujnáková, Zuzana Sefčíková, and Vladimír Kmet. 2008. “Developmental Changes of Gut Microflora and Enzyme Activity in Rat Pups Exposed to Fat-Rich Diet.” *Obesity (Silver Spring, Md.)* 16 (12): 2610–15. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.435>.
- Muccioli, Giulio G., Damien Naslain, Fredrik Bäckhed, Christopher S. Reigstad, Didier M. Lambert, Nathalie M. Delzenne, and Patrice D. Cani. 2010. “The Endocannabinoid System Links Gut Microbiota to Adipogenesis.” *Molecular Systems Biology* 6 (July): 392. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.46>.
- Muntzel, M. S., D. A. Morgan, A. L. Mark, and A. K. Johnson. 1994. “Intracerebroventricular Insulin Produces Nonuniform Regional Increases in Sympathetic Nerve Activity.” *The American Journal of Physiology* 267 (5 Pt 2): R1350-1355. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1994.267.5.R1350>.
- Nakamura, Kensei, Yasuhiko Koga, Hiroyasu Sakai, Kazuaki Homma, and Mitsuo Ikebe. 2007. “CGMP-Dependent Relaxation of Smooth Muscle Is Coupled with the Change in the Phosphorylation of Myosin Phosphatase.” *Circulation Research* 101 (7): 712–22. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.153981>.
- Nevelsteen, Ines, Virginie Bito, Gerry Van der Mieren, Annelies Vanderper, An Van den Bergh, Karin R Sipido, Kanigula Mubagwa, and Paul Herijgers. 2013. “ACE-Inhibition, but Not Weight Reduction Restores Cardiomyocyte Response to  $\beta$ -Adrenergic Stimulation in the Metabolic Syndrome.” *BMC Cardiovascular Disorders* 13 (July): 51. <https://doi.org/10.1186/1471-2261-13-51>.
- Niclauss, Nadja, Martina B. Michel-Reher, Astrid E. Alewijnse, and Martin C. Michel. 2006. “Comparison of Three Radioligands for the Labelling of Human Beta-Adrenoceptor Subtypes.” *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 374 (2): 99–105. <https://doi.org/10.1007/s00210-006-0104-z>.
- Nilsson, S. 2001. “[Research contributions of Eskil Kylin].” *Svensk Medicinhistorisk Tidskrift* 5 (1): 15–28.
- Niu, Xiaolin, Vabren L. Watts, Oscar H. Cingolani, Vidhya Sivakumaran, Jordan S. Leyton-

- Mange, Carla L. Ellis, Karen L. Miller, et al. 2012. “Cardioprotective Effect of Beta-3 Adrenergic Receptor Agonism: Role of Neuronal Nitric Oxide Synthase.” *Journal of the American College of Cardiology* 59 (22): 1979–87. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.12.046>.
- Nyborg, N. C., and E. O. Mikkelsen. 1985. “Characterization of Beta-Adrenoceptor Subtype in Isolated Ring Preparations of Intramural Rat Coronary Small Arteries.” *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 7 (6): 1113–17. <https://doi.org/10.1097/00005344-198511000-00016>.
- Ouchi, Noriyuki, Mitsuru Ohishi, Shinji Kihara, Tohru Funahashi, Tadashi Nakamura, Hiroyuki Nagaretani, Masahiro Kumada, et al. 2003. “Association of Hypoadiponectinemia with Impaired Vasoreactivity.” *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 42 (3): 231–34. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000083488.67550.B8>.
- Pagan, Luana Urbano, Mariana Janini Gomes, and Marina Politi Okoshi. 2018. “Endothelial Function and Physical Exercise.” *Arquivos Brasileiros De Cardiologia* 111 (4): 540–41. <https://doi.org/10.5935/abc.20180211>.
- Palaniappan, Latha, Mercedes R. Carnethon, Yun Wang, Anthony J. G. Hanley, Stephen P. Fortmann, Stephen M. Haffner, Lynne Wagenknecht, and Insulin Resistance Atherosclerosis Study. 2004. “Predictors of the Incident Metabolic Syndrome in Adults: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study.” *Diabetes Care* 27 (3): 788–93. <https://doi.org/10.2337/diacare.27.3.788>.
- Patel, Priyesh A., Douglas G. Tilley, and Howard A. Rockman. 2008. “Beta-Arrestin-Mediated Signaling in the Heart.” *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society* 72 (11): 1725–29. <https://doi.org/10.1253/circj.cj-08-0734>.
- Pavoine, Catherine, Niloufar Behforouz, Chantal Gauthier, Sabine Le Gouvello, Françoise Roudot-Thoraval, Catherine Rucker Martin, Andre Pawlak, et al. 2003. “Beta2-Adrenergic Signaling in Human Heart: Shift from the Cyclic AMP to the Arachidonic Acid Pathway.” *Molecular Pharmacology* 64 (5): 1117–25. <https://doi.org/10.1124/mol.64.5.1117>.
- Pavoine, Catherine, and Nicole Defer. 2005. “The Cardiac Beta2-Adrenergic Signalling a New Role for the CPLA2.” *Cellular Signalling* 17 (2): 141–52. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.09.001>.
- Pellegrin, M., L. Mazzolai, A. Berthelot, and P. Laurant. 2009. “Dysfonction Endothéliale et Risque Cardiovasculaire. L’exercice Protège La Fonction Endothéliale et Prévient La Maladie Cardiovasculaire.” *Science & Sports* 24 (2): 63–73.

- <https://doi.org/10.1016/j.scispo.2008.10.003>.
- Pierce, Gary L., Lisa A. Lesniewski, Brooke R. Lawson, Stacy D. Beske, and Douglas R. Seals. 2009. "Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation Contributes to Vascular Endothelial Dysfunction via Oxidative Stress in Overweight/Obese Middle-Aged and Older Humans." *Circulation* 119 (9): 1284–92. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.804294>.
- Pinto, Y. M., M. Paul, and D. Ganten. 1998. "Lessons from Rat Models of Hypertension: From Goldblatt to Genetic Engineering." *Cardiovascular Research* 39 (1): 77–88. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(98\)00077-7](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(98)00077-7).
- Potenza, Maria A., Flora L. Marasciulo, Delia Mitolo Chieppa, Giovanni Siro Brigiani, Gloria Formoso, Michael J. Quon, and Monica Montagnani. 2005a. "Insulin Resistance in Spontaneously Hypertensive Rats Is Associated with Endothelial Dysfunction Characterized by Imbalance between NO and ET-1 Production." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 289 (2): H813-822. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00092.2005>.
- Prawez, Shahid, Azad Ahmad Ahanger, Thakur Uttam Singh, Santosh Kumar Mishra, Souvendra Nath Sarkar, and Dinesh Kumar. 2016. "BAY 41-2272 Treatment Improves Acetylcholine-Induced Aortic Relaxation in L-NAME Hypertensive Rats." *The International Journal of Angiology: Official Publication of the International College of Angiology, Inc* 25 (4): 235–40. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1579625>.
- Prieto, Dolores, Cristina Contreras, and Ana Sánchez. 2014. "Endothelial Dysfunction, Obesity and Insulin Resistance." *Current Vascular Pharmacology* 12 (3): 412–26.
- Priviero, Fernanda B. M., Saiprasad M. Zemse, Cleber E. Teixeira, and R. Clinton Webb. 2009. "Oxidative Stress Impairs Vasorelaxation Induced by the Soluble Guanylyl Cyclase Activator BAY 41-2272 in Spontaneously Hypertensive Rats." *American Journal of Hypertension* 22 (5): 493–99. <https://doi.org/10.1038/ajh.2009.18>.
- Qi, Kemin, Marni Hall, and Richard J. Deckelbaum. 2002. "Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Accretion in Brain." *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 5 (2): 133–38.
- Rahmouni, Kamal, Donald A. Morgan, Gina M. Morgan, Xuebo Liu, Curt D. Sigmund, Allyn L. Mark, and William G. Haynes. 2004. "Hypothalamic PI3K and MAPK Differentially Mediate Regional Sympathetic Activation to Insulin." *The Journal of Clinical Investigation* 114 (5): 652–58. <https://doi.org/10.1172/JCI21737>.
- Rask-Madsen, Christian, and George L. King. 2005. "Proatherosclerotic Mechanisms Involving



- Protein Kinase C in Diabetes and Insulin Resistance.” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25 (3): 487–96. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000155325.41507.e0>.
- Reaven, G. M., and H. Chang. 1991. “Relationship between Blood Pressure, Plasma Insulin and Triglyceride Concentration, and Insulin Action in Spontaneous Hypertensive and Wistar-Kyoto Rats.” *American Journal of Hypertension* 4 (1 Pt 1): 34–38. <https://doi.org/10.1093/ajh/4.1.34>.
- Reaven, G. M., and Y. D. Chen. 1988. “Role of Insulin in Regulation of Lipoprotein Metabolism in Diabetes.” *Diabetes/Metabolism Reviews* 4 (7): 639–52.
- Reijnders, Dorien, Gijs H. Goossens, Gerben D. A. Hermes, Evelien P. J. G. Neis, Christina M. van der Beek, Jasper Most, Jens J. Holst, et al. 2016. “Effects of Gut Microbiota Manipulation by Antibiotics on Host Metabolism in Obese Humans: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial.” *Cell Metabolism* 24 (1): 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.06.016>.
- Riedl, Ruth A., Samantha N. Atkinson, Colin M. L. Burnett, Justin L. Grobe, and John R. Kirby. 2017. “The Gut Microbiome, Energy Homeostasis, and Implications for Hypertension.” *Current Hypertension Reports* 19 (4): 27. <https://doi.org/10.1007/s11906-017-0721-6>.
- Rozec, Bertrand, and Chantal Gauthier. 2006. “Beta3-Adrenoceptors in the Cardiovascular System: Putative Roles in Human Pathologies.” *Pharmacology & Therapeutics* 111 (3): 652–73. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.12.002>.
- Rozec, Bertrand, Sabrina Serpillon, Gilles Toumaniantz, Camille Sèze, Yohann Rautureau, Olivier Baron, Jacques Noireaud, and Chantal Gauthier. 2005. “Characterization of Beta3-Adrenoceptors in Human Internal Mammary Artery and Putative Involvement in Coronary Artery Bypass Management.” *Journal of the American College of Cardiology* 46 (2): 351–59. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.03.061>.
- Saha, Soumya, Yuan Li, and Madhu B. Anand-Srivastava. 2008. “Reduced Levels of Cyclic AMP Contribute to the Enhanced Oxidative Stress in Vascular Smooth Muscle Cells from Spontaneously Hypertensive Rats.” *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 86 (4): 190–98. <https://doi.org/10.1139/Y08-012>.
- Saklayen, Mohammad G. 2018. “The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome.” *Current Hypertension Reports* 20 (2): 12. <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0812-z>.
- Sampey, Brante P., Amanda M. Vanhooose, Helena M. Winfield, Alex J. Freerman, Michael J. Muehlbauer, Patrick T. Fueger, Christopher B. Newgard, and Liza Makowski. 2011. “Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome with Liver and

- Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet.” *Obesity (Silver Spring, Md.)* 19 (6): 1109–17. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.18>.
- Sattar, Naveed, Allan Gaw, Olga Scherbakova, Ian Ford, Denis St J. O’Reilly, Steven M. Haffner, Chris Isles, et al. 2003. “Metabolic Syndrome with and without C-Reactive Protein as a Predictor of Coronary Heart Disease and Diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study.” *Circulation* 108 (4): 414–19. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000080897.52664.94>.
- Sauzeau, V., H. Le Jeune, C. Cario-Toumaniantz, A. Smolenski, S. M. Lohmann, J. Bertoglio, P. Chardin, P. Pacaud, and G. Loirand. 2000. “Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase Signaling Pathway Inhibits RhoA-Induced Ca<sup>2+</sup> Sensitization of Contraction in Vascular Smooth Muscle.” *The Journal of Biological Chemistry* 275 (28): 21722–29. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000753200>.
- Scaglione, Francesco, Shaantanu Donde, Tarek A. Hassan, and Emmanuele A. Jannini. 2017. “Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors for the Treatment of Erectile Dysfunction: Pharmacology and Clinical Impact of the Sildenafil Citrate Orodispersible Tablet Formulation.” *Clinical Therapeutics* 39 (2): 370–77. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2017.01.001>.
- Schlossmann, Jens, and Elisabeth Schinner. 2012. “cGMP Becomes a Drug Target.” *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology* 385 (3): 243–52. <https://doi.org/10.1007/s00210-012-0730-6>.
- Scuteri, Angelo, Stephane Laurent, Francesco Cucca, John Cockcroft, Pedro Guimaraes Cunha, Leocadio Rodriguez Mañas, Francesco U Mattace Raso, et al. 2015. “Metabolic Syndrome across Europe: Different Clusters of Risk Factors.” *European Journal of Preventive Cardiology* 22 (4): 486–91. <https://doi.org/10.1177/2047487314525529>.
- Senoner, Thomas, and Wolfgang Dichtl. 2019. “Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target?” *Nutrients* 11 (9). <https://doi.org/10.3390/nu11092090>.
- Sharman, Sarah K., Bianca N. Islam, Yali Hou, Margaux Usry, Allison Bridges, Nagendra Singh, Subbaramiah Sridhar, Satish Rao, and Darren D. Browning. 2017. “Sildenafil Normalizes Bowel Transit in Preclinical Models of Constipation.” *PloS One* 12 (4): e0176673. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176673>.
- Sherling, Dawn Harris, Parvathi Perumareddi, and Charles H. Hennekens. 2017. “Metabolic Syndrome: Clinical and Policy Implications of the New Silent Killer.” *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 22 (4): 365–67. <https://doi.org/10.1177/1074248416686187>.

- Shi, Xiaoji, Shanshan Wang, Huiling Luan, Dina Tuerhong, Yining Lin, Jingyu Liang, Yi Xiong, Liangyou Rui, and Feihua Wu. 2019. “Clinopodium Chinense Attenuates Palmitic Acid-Induced Vascular Endothelial Inflammation and Insulin Resistance through TLR4-Mediated NF- $\kappa$  B and MAPK Pathways.” *The American Journal of Chinese Medicine* 47 (1): 97–117. <https://doi.org/10.1142/S0192415X19500058>.
- Shi, Yun, Zhongying Wu, Ningren Cui, Weiwei Shi, Yang Yang, Xiaoli Zhang, Ashebo Rojas, Binh T. Ha, and Chun Jiang. 2007. “PKA Phosphorylation of SUR2B Subunit Underscores Vascular KATP Channel Activation by Beta-Adrenergic Receptors.” *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 293 (3): R1205-1214. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00337.2007>.
- Silva, Josiane F., Izabella C. Correa, Thiago F. Diniz, Paulo M. Lima, Roger L. Santos, Steyner F. Cortes, Cândido C. Coimbra, and Virginia S. Lemos. 2016. “Obesity, Inflammation, and Exercise Training: Relative Contribution of INOS and ENOS in the Modulation of Vascular Function in the Mouse Aorta.” *Frontiers in Physiology* 7: 386. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00386>.
- Skeberdis, V. Arvydas, Vida Gendviliene, Danguole Zablockaite, Rimantas Treinys, Regina Macianskiene, Andrius Bogdelis, Jonas Jurevicius, and Rodolphe Fischmeister. 2008. “Beta3-Adrenergic Receptor Activation Increases Human Atrial Tissue Contractility and Stimulates the L-Type Ca<sup>2+</sup> Current.” *The Journal of Clinical Investigation* 118 (9): 3219–27. <https://doi.org/10.1172/JCI32519>.
- Skrzypiec-Spring, Monika, Bartosz Grotthus, Adam Szelag, and Richard Schulz. 2007. “Isolated Heart Perfusion According to Langendorff---Still Viable in the New Millennium.” *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 55 (2): 113–26. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.05.006>.
- Spanogiannopoulos, Peter, Elizabeth N. Bess, Rachel N. Carmody, and Peter J. Turnbaugh. 2016. “The Microbial Pharmacists within Us: A Metagenomic View of Xenobiotic Metabolism.” *Nature Reviews. Microbiology* 14 (5): 273–87. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.17>.
- Srikanth, C. V., and Beth A. McCormick. 2008. “Interactions of the Intestinal Epithelium with the Pathogen and the Indigenous Microbiota: A Three-Way Crosstalk.” *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2008: 626827. <https://doi.org/10.1155/2008/626827>.
- Steppan, Claire M., and Mitchell A. Lazar. 2002. “Resistin and Obesity-Associated Insulin

- Resistance.” *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 13 (1): 18–23.
- Taddei, S., L. Ghiadoni, A. Virdis, D. Versari, and A. Salvetti. 2003. “Mechanisms of Endothelial Dysfunction: Clinical Significance and Preventive Non-Pharmacological Therapeutic Strategies.” *Current Pharmaceutical Design* 9 (29): 2385–2402. <https://doi.org/10.2174/1381612033453866>.
- Tamada, A., Y. Hattori, H. Houzen, Y. Yamada, I. Sakuma, A. Kitabatake, and M. Kanno. 1998. “Effects of Beta-Adrenoceptor Stimulation on Contractility,  $[Ca^{2+}]_i$ , and  $Ca^{2+}$  Current in Diabetic Rat Cardiomyocytes.” *The American Journal of Physiology* 274 (6): H1849-1857. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.274.6.H1849>.
- Tamanai-Shacoori, Zohreh, Imen Smida, Latifa Bousarghin, Olivier Loreal, Vincent Meuric, Shao Bing Fong, Martine Bonnaure-Mallet, and Anne Jolivet-Gougeon. 2017. “Roseburia Spp.: A Marker of Health?” *Future Microbiology* 12: 157–70. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0130>.
- Thorin, Chantal, Mohamed Yassine Mallem, Jacques Noireaud, Marc Gogny, and Jean-Claude Desfontis. 2010. “Nonlinear Mixed Effects Models Applied to Cumulative Concentration-Response Curves.” *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 62 (3): 339–45. <https://doi.org/10.1211/jpp.62.03.0008>.
- Thorp, Alicia A., and Markus P. Schlaich. 2015. “Relevance of Sympathetic Nervous System Activation in Obesity and Metabolic Syndrome.” *Journal of Diabetes Research* 2015: 341583. <https://doi.org/10.1155/2015/341583>.
- Tian, Lijun, Lorraine S. Coghill, Heather McClafferty, Stephen H.-F. MacDonald, Ferenc A. Antoni, Peter Ruth, Hans-Guenther Knaus, and Michael J. Shipston. 2004. “Distinct Stoichiometry of BKCa Channel Tetramer Phosphorylation Specifies Channel Activation and Inhibition by CAMP-Dependent Protein Kinase.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (32): 11897–902. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402590101>.
- Trayhurn, Paul, and I. Stuart Wood. 2004. “Adipokines: Inflammation and the Pleiotropic Role of White Adipose Tissue.” *The British Journal of Nutrition* 92 (3): 347–55. <https://doi.org/10.1079/bjn20041213>.
- Trochu, J. N., V. Leblais, Y. Rautureau, F. Bévèrelli, H. Le Marec, A. Berdeaux, and C. Gauthier. 1999. “Beta 3-Adrenoceptor Stimulation Induces Vasorelaxation Mediated Essentially by Endothelium-Derived Nitric Oxide in Rat Thoracic Aorta.” *British Journal of Pharmacology* 128 (1): 69–76. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702797>.
- Tunapong, Wannipa, Nattayaporn Apaijai, Sakawdaurn Yasom, Pongpan Tanajak, Keerati

- Wanchai, Titikorn Chunchai, Sasiwan Kerdphoo, et al. 2018. “Chronic Treatment with Prebiotics, Probiotics and Synbiotics Attenuated Cardiac Dysfunction by Improving Cardiac Mitochondrial Dysfunction in Male Obese Insulin-Resistant Rats.” *European Journal of Nutrition* 57 (6): 2091–2104. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1482-3>.
- Tune, Johnathan D., Adam G. Goodwill, Daniel J. Sassoon, and Kieren J. Mather. 2017. “Cardiovascular Consequences of Metabolic Syndrome.” *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 183: 57–70. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.01.001>.
- Turnbaugh, Peter J., Fredrik Bäckhed, Lucinda Fulton, and Jeffrey I. Gordon. 2008. “Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome.” *Cell Host & Microbe* 3 (4): 213–23. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.02.015>.
- Turnbaugh, Peter J., Ruth E. Ley, Michael A. Mahowald, Vincent Magrini, Elaine R. Mardis, and Jeffrey I. Gordon. 2006. “An Obesity-Associated Gut Microbiome with Increased Capacity for Energy Harvest.” *Nature* 444 (7122): 1027–31. <https://doi.org/10.1038/nature05414>.
- Ufer, Christoph, and Renée Germack. 2009. “Cross-Regulation between B1- and B3-Adrenoceptors Following Chronic  $\beta$ -Adrenergic Stimulation in Neonatal Rat Cardiomyocytes.” *British Journal of Pharmacology* 158 (1): 300–313. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00328.x>.
- Umeda, Mamoru, Tsugiyasu Kanda, and Masami Murakami. 2003. “Effects of Angiotensin II Receptor Antagonists on Insulin Resistance Syndrome and Leptin in Sucrose-Fed Spontaneously Hypertensive Rats.” *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension* 26 (6): 485–92. <https://doi.org/10.1291/hypres.26.485>.
- Umpierrez, Guillermo E., Dawn Smiley, Gonzalo Robalino, Limin Peng, Abbas E. Kitabchi, Bobby Khan, Ahn Le, Arshed Quyyumi, Virgil Brown, and Lawrence S. Phillips. 2009. “Intravenous Intralipid-Induced Blood Pressure Elevation and Endothelial Dysfunction in Obese African-Americans with Type 2 Diabetes.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 94 (2): 609–14. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1590>.
- Uranga, Jose Antonio, Marta Castro, and Raquel Abalo. 2018. “Guanylate Cyclase C: A Current Hot Target, from Physiology to Pathology.” *Current Medicinal Chemistry* 25 (16): 1879–1908. <https://doi.org/10.2174/0929867325666171205150310>.
- Vadon-Le Goff, S, and N Sennequier. 1998. “Biosynthèse du monoxyde d’azote (NO) :

- mécanisme, régulation et contrôle.” *médecine/sciences* 14 (11): 1185.  
<https://doi.org/10.4267/10608/936>.
- Vague, J. 1996. “Sexual Differentiation. A Determinant Factor of the Forms of Obesity. 1947.”  
*Obesity Research* 4 (2): 201–3.
- Valdes, Ana M, Jens Walter, Eran Segal, and Tim D Spector. 2018. “Role of the Gut Microbiota  
in Nutrition and Health.” *The BMJ* 361 (June). <https://doi.org/10.1136/bmj.k2179>.
- Valensi, P., B. Chanu, and E. Cosson. 2006. “Obesity, Metabolic Syndrome, Diabetes and  
Arterial Hypertension.” Text. 2006.  
<https://doi.org/info:doi/10.2174/187152206778019222>.
- Vanhoutte, P. M., H. Shimokawa, M. Feletou, and E. H. C. Tang. 2017. “Endothelial  
Dysfunction and Vascular Disease - a 30th Anniversary Update.” *Acta Physiologica  
(Oxford, England)* 219 (1): 22–96. <https://doi.org/10.1111/apha.12646>.
- Vendrame, Stefano, Aleksandra S. Kristo, Dale A. Schuschke, and Dorothy Klimis-Zacas.  
2014. “Wild Blueberry Consumption Affects Aortic Vascular Function in the Obese  
Zucker Rat.” *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee,  
Nutrition Et Metabolisme* 39 (2): 255–61. <https://doi.org/10.1139/apnm-2013-0249>.
- Vendrame, Stefano, Panagiotis Tsakiroglou, Aleksandra S. Kristo, Dale A. Schuschke, and  
Dorothy Klimis-Zacas. 2016. “Wild Blueberry Consumption Attenuates Local  
Inflammation in the Perivascular Adipose Tissue of Obese Zucker Rats.” *Applied  
Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et  
Metabolisme* 41 (10): 1045–51. <https://doi.org/10.1139/apnm-2016-0160>.
- Venkatakrishnan, A. J., Xavier Deupi, Guillaume Lebon, Christopher G. Tate, Gebhard F.  
Schertler, and M. Madan Babu. 2013. “Molecular Signatures of G-Protein-Coupled  
Receptors.” *Nature* 494 (7436): 185–94. <https://doi.org/10.1038/nature11896>.
- Villarreal, D., G. Reams, R. H. Freeman, and A. Taraben. 1998. “Renal Effects of Leptin in  
Normotensive, Hypertensive, and Obese Rats.” *The American Journal of Physiology*  
275 (6): R2056-2060. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.275.6.R2056>.
- Violin, Jonathan D., Aimee L. Crombie, David G. Soergel, and Michael W. Lark. 2014. “Biased  
Ligands at G-Protein-Coupled Receptors: Promise and Progress.” *Trends in  
Pharmacological Sciences* 35 (7): 308–16. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.04.007>.
- Walford, G., and J. Loscalzo. 2003. “Nitric Oxide in Vascular Biology.” *Journal of Thrombosis  
and Haemostasis: JTH* 1 (10): 2112–18.
- Wallukat, Gerd. 2002. “The Beta-Adrenergic Receptors.” *Herz* 27 (7): 683–90.  
<https://doi.org/10.1007/s00059-002-2434-z>.

- Walther, Cornelia, and Stephen S. G. Ferguson. 2013. "Arrestins: Role in the Desensitization, Sequestration, and Vesicular Trafficking of G Protein-Coupled Receptors." *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 118: 93–113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394440-5.00004-8>.
- Wang, Qiong, George M. Garrity, James M. Tiedje, and James R. Cole. 2007. "Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (16): 5261–67. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>.
- Wassink, A. M. J., J. K. Olijhoek, and F. L. J. Visseren. 2007. "The Metabolic Syndrome: Metabolic Changes with Vascular Consequences." *European Journal of Clinical Investigation* 37 (1): 8–17. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2007.01755.x>.
- Wheatcroft, S. B., I. L. Williams, A. M. Shah, and M. T. Kearney. 2003. "Pathophysiological Implications of Insulin Resistance on Vascular Endothelial Function." *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association* 20 (4): 255–68. <https://doi.org/10.1046/j.1464-5491.2003.00869.x>.
- Widlansky, Michael E., Noyan Gokce, John F. Keaney, and Joseph A. Vita. 2003. "The Clinical Implications of Endothelial Dysfunction." *Journal of the American College of Cardiology* 42 (7): 1149–60. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(03\)00994-x](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(03)00994-x).
- Williams, I. L., S. B. Wheatcroft, A. M. Shah, and M. T. Kearney. 2002. "Obesity, Atherosclerosis and the Vascular Endothelium: Mechanisms of Reduced Nitric Oxide Bioavailability in Obese Humans." *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 26 (6): 754–64. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801995>.
- Wing, Rena R., Wei Lang, Thomas A. Wadden, Monika Safford, William C. Knowler, Alain G. Bertoni, James O. Hill, Frederick L. Brancati, Anne Peters, and Lynne Wagenknecht. 2011. "Benefits of Modest Weight Loss in Improving Cardiovascular Risk Factors in Overweight and Obese Individuals With Type 2 Diabetes." *Diabetes Care* 34 (7): 1481–86. <https://doi.org/10.2337/dc10-2415>.
- Wright, D. B., S. Tripathi, A. Sikarwar, K. T. Santosh, J. Perez-Zoghbi, O. O. Ojo, N. Irechukwu, J. P. T. Ward, and D. Schaafsma. 2013. "Regulation of GPCR-Mediated Smooth Muscle Contraction: Implications for Asthma and Pulmonary Hypertension." *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 26 (1): 121–31. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2012.06.005>.
- Xiao, R. P. 2001. "Beta-Adrenergic Signaling in the Heart: Dual Coupling of the Beta2-

- Adrenergic Receptor to G(s) and G(i) Proteins.” *Science’s STKE: Signal Transduction Knowledge Environment* 2001 (104): re15. <https://doi.org/10.1126/stke.2001.104.re15>.
- Xiao, Rui-Ping, Weizhong Zhu, Ming Zheng, Chunmei Cao, Youyi Zhang, Edward G. Lakatta, and Qide Han. 2006. “Subtype-Specific Alpha1- and Beta-Adrenoceptor Signaling in the Heart.” *Trends in Pharmacological Sciences* 27 (6): 330–37. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.04.009>.
- Xiao, Rui-Ping, Weizhong Zhu, Ming Zheng, Khalid Chakir, Richard Bond, Edward G. Lakatta, and Heping Cheng. 2004. “Subtype-Specific Beta-Adrenoceptor Signaling Pathways in the Heart and Their Potential Clinical Implications.” *Trends in Pharmacological Sciences* 25 (7): 358–65. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.05.007>.
- Yang, A.-L., J.-I. Chao, and S.-D. Lee. 2007. “Altered Insulin-Mediated and Insulin-like Growth Factor-1-Mediated Vasorelaxation in Aortas of Obese Zucker Rats.” *International Journal of Obesity (2005)* 31 (1): 72–77. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803364>.
- Yang, Tao, Monica M. Santisteban, Vermali Rodriguez, Eric Li, Niousha Ahmari, Jessica Marulanda Carvajal, Mojgan Zadeh, et al. 2015a. “Gut Dysbiosis Is Linked to Hypertension.” *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 65 (6): 1331–40. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05315>.
- Yang, Yang, Yun Shi, Shouli Guo, Shuang Zhang, Ningren Cui, Weiwei Shi, Daling Zhu, and Chun Jiang. 2008. “PKA-Dependent Activation of the Vascular Smooth Muscle Isoform of KATP Channels by Vasoactive Intestinal Polypeptide and Its Effect on Relaxation of the Mesenteric Resistance Artery.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1778 (1): 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.08.030>.
- Zambon, A., J. E. Hokanson, B. G. Brown, and J. D. Brunzell. 1999. “Evidence for a New Pathophysiological Mechanism for Coronary Artery Disease Regression: Hepatic Lipase-Mediated Changes in LDL Density.” *Circulation* 99 (15): 1959–64. <https://doi.org/10.1161/01.cir.99.15.1959>.
- Zhang, Chenhong, Shoufeng Li, Liu Yang, Ping Huang, Wenjun Li, Shengyue Wang, Guoping Zhao, et al. 2013. “Structural Modulation of Gut Microbiota in Life-Long Calorie-Restricted Mice.” *Nature Communications* 4: 2163. <https://doi.org/10.1038/ncomms3163>.
- Zhang, Weizhi, Naohiro Yano, Minzi Deng, Quanfu Mao, Sunil K. Shaw, and Yi-Tang Tseng. 2011. “ $\beta$ -Adrenergic Receptor-PI3K Signaling Crosstalk in Mouse Heart: Elucidation of Immediate Downstream Signaling Cascades.” *PloS One* 6 (10): e26581.



<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026581>.

Zhao, Feng-Qi, and Aileen F. Keating. 2007. "Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters." *Current Genomics* 8 (2): 113–28.

Zheng, Ming, Qi-De Han, and Rui-Ping Xiao. 2004. "Distinct Beta-Adrenergic Receptor Subtype Signaling in the Heart and Their Pathophysiological Relevance." *Sheng Li Xue Bao: [Acta Physiologica Sinica]* 56 (1): 1–15.

Zimmet, Paul, Dianna Magliano, Yuji Matsuzawa, George Alberti, and Jonathan Shaw. 2005. "The Metabolic Syndrome: A Global Public Health Problem and a New Definition." *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 12 (6): 295–300. <https://doi.org/10.5551/jat.12.295>.

**Titre :** Syndrome métabolique chez le rat spontanément hypertendu : Etude des effets des modulateurs de la voie du GMPc sur la réactivité cardiovasculaire et sur la composition du microbiote intestinal

**Mots clés :** syndrome métabolique, SHR, cafeteria diet, réactivité cardiovasculaire, microbiote intestinal

**Résumé :** Le syndrome métabolique associe plusieurs facteurs de risques cardiovasculaires chez le même individu. Des études ont montré une altération de la voie de signalisation du NO/GMPc au cours du syndrome métabolique. Le premier objectif de cette thèse a été d'étudier la modification de la fonction cardiaque globale et de la réactivité vasculaire des rats spontanément hypertendus (SHR) soumis à un régime hypercalorique de type « cafeteria diet » (CD). Dans un second temps, les effets de l'administration chronique des modulateurs de la voie du GMPc ont été évalués sur les paramètres métaboliques et la fonction circulatoire par des approches *in vivo* et *ex vivo* sur cœur et aorte isolés. Le microbiote intestinal apparait depuis quelques années comme un nouveau facteur impliqué dans la pathogenèse du syndrome métabolique et des altérations qui lui sont associées.

Ainsi, une troisième partie de la thèse a été consacrée à l'analyse du microbiote intestinal chez les SHR avant et après traitements. Cette étude a montré que le régime CD induit les différentes composantes du syndrome métabolique. Ces anomalies étaient associées à une altération de la contractilité cardiaque et vasculaire ainsi qu'à une altération de la vasorelaxation induite par l'insuline. De plus, notre étude a montré des modifications dans la composition du microbiote intestinal à l'échelle « famille » et « espèce ». L'activation chronique de la voie du GMPc a amélioré les paramètres métaboliques mesurés *in vivo* et a rétabli partiellement la fonction circulatoire. Notre étude a montré pour la première fois les effets de la modulation de la voie du GMPc sur la composition du microbiote intestinal.

**Title :** Metabolic syndrome in spontaneously hypertensive rats : Study of cGMP pathway modulators on cardiovascular reactivity and gut microbiota composition

**Keywords :** metabolic syndrome, SHR, cafeteria diet, cardiovascular reactivity, gut microbiota

**Abstract :** The metabolic syndrome associates several cardiovascular risk factors in the same individual. Studies have already shown an alteration of the NO/cGMP signaling pathway during metabolic syndrome. The first aim of this thesis was to study the modification of the global cardiac function and the vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats (SHR) subjected to a hypercaloric diet called "cafeteria diet" (CD). In a second step, effects of chronic administration of cGMP pathway modulators were evaluated on metabolic parameters and cardiovascular function using *in vivo* and *ex vivo* approaches on isolated heart and aorta. The gut microbiota has emerged for some years as a new factor involved in the pathogenesis of the metabolic syndrome and associated alterations. Thus, a third part of the thesis was devoted to

the analysis of gut microbiota in SHR before and after treatment. This study has shown that CD diet induces the different components of metabolic syndrome. These abnormalities were associated with impaired cardiac and vascular contractility and an altered insulin-induced vasorelaxation. On the other hand, our study showed changes in the gut microbiota composition at the "family" and "species" level. Chronic activation of the cGMP pathway improved metabolic parameters measured *in vivo* and partially restored cardiovascular function. Our study showed for the first time the effects of cGMP pathway modulation on gut microbiota composition.