

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Regenerative Nanomedicine – INSERM UMR 1260

THÈSE

présentée par :

Christophe BRUCKERT

soutenue le : 9 juillet 2021

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Pharmacologie et physiopathologie cardiovasculaire**

Rôle des co-transporteurs sodium glucose 1 et 2 dans la dysfonction vasculaire et cardiaque chez le rat hypertendu induit par l'Angiotensine II

THÈSE dirigée par :

Mme SCHINI-KERTH Valérie B.

Pr, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme GÖRLACH Agnes

Pr, Université de Munich

M. ZANNAD Faiez

Pr, CHU de Nancy

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme JEANDIDIER Nathalie

Pr, Université de Strasbourg

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères au **Professeur Valérie SCHINI-KERTH**, ma directrice de thèse, pour m'avoir conseillé, encouragé et soutenu tout au long de cette aventure avec patience et disponibilité, et pour la confiance qu'elle m'a accordée.

Je remercie très chaleureusement les **Professeurs Faiez ZANNAD, Agnes GÖRLACH et Nathalie JEANDIDIER** de me faire l'honneur de constituer mon jury et d'évaluer ce travail. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je remercie également les **Docteurs Cyril AUGER et Gilles KAUFFENSTEIN** pour leur disponibilité sans faille, leur précieux conseils ainsi que pour les longues discussions qui ont (presque) contribuées à refaire le monde...

Mes remerciements vont également à **Kensuke MATSUSHITA** dont la collaboration professionnelle fut un réel plaisir. Qu'il retrouve ici le témoignage de ma gratitude.

Je n'oublie pas l'ensemble des membres de l'équipe non cités au sein des lignes qui précèdent : **ma chère Margaux, Lamia, Ursula, Sandy, Walaa, Dal-Seong, Sin-Hee, Eugenia, Michaela, Abdul Wahid, Muhammad Akmal, Mohammad, Hyunho, Noura, Hanine et Hamid.** J'ai également une pensée particulière pour le **Professeur Paola ALGARA-SUAREZ** qui fut une merveilleuse rencontre du fait de l'intensité de son implication à la fois scientifique mais aussi humaniste au sein du laboratoire.

LISTE DES PUBLICATIONS

Publications

1. Sin-Hee Park, Muhammad Akmal Farooq, Sébastien Gaertner, **Christophe Bruckert**, Abdul Wahid Qureshi, Hyun-Ho Lee, Djamel Benrahla, Brigitte Pollet, Dominique Stephan, Patrick Ohlmann, Jean-Marc Lessinger, Eric Mayoux, Cyril Auger, Olivier Morel, Valérie B Schini-Kerth, "Empagliflozin improved systolic blood pressure, endothelial dysfunction and heart remodeling in the metabolic syndrome ZSF1 rats", *Cardiovascular Diabetology*, 19:19 (2020)
2. Ahmed Bey Chaker, Paola Algara-Suarez, Lamia Remila, **Christophe Bruckert**, Sin-Hee Park, Ursula Hougue, Eugenia Belcastro, Abdul Wahid Qureshi, Hanine El Hitawi, Florence Toti, Valérie B Schini-Kerth, Cyril Auger, "Anthocyanin-rich blackcurrant intake by old rats improves blood pressure, vascular oxidative stress and endothelial dysfunction associated with SGLT1 and 2-mediated vascular uptake of anthocyanin" en préparation
3. **Christophe Bruckert**, Kensuke Matsushita, Said Amissi, Cyril Auger, Ursula Hougue, Lamia Remila, Ahmed Bey Chaker, Sin-Hee Park, Paola Algara-Suarez, Eugenia Belcastro, Laurence Jesel, Patrick Ohlmann, Olivier Morel, Valérie Schini-Kerth. " Empagliflozin prevents angiotensin II-induced hypertension related micro and macrovascular endothelial dysfunction and diastolic dysfunction in rats despite persistent hypertension: Role of endothelial SGLT1 and 2 ", soumis en 2021.

4. Sin-Hee Park, Eugenia Belcastro, Paola Algara-Suarez, Kensuke Matsushita, **Christophe Bruckert**, Ahmed Bey Chaker, Cyril Auger, Laurence Jesel, Patrick Ohlmann, Olivier Morel, Jean-Philippe Mazzucotelli, Valérie B Schini-Kerth, "Expression of sodium-glucose co-transporter 1 and 2 in the internal mammary artery of patients with bypass surgery contributes to oxidative stress and is correlated with NF- κ B activation" en préparation.

5. Ursula Houngue, Ahmed Bey Chaker, Lamia Remila, **Christophe Bruckert**, Sin-Hee Park, Eugenia Belcastro, Idir Bouchakour, Jean-Marc Toukoudagba, Cyril Auger, Fernand Gbaguidi, Valérie B Schini-Kerth, "*Carissa edulis* extract, a medicinal plant of Benin pharmacopoeia, induces potent endothelium-dependent relaxation of coronary artery rings involving predominantly nitric oxide" en préparation.

LISTE DES POSTERS ET DES PRESENTATIONS

ORALES

1. Sin-Hee Park, Eugenia Belcastro, Hira Hasan, **Christophe Bruckert**, Cyril Auger, Valérie B Schini-Kerth. "Angiotensin II induced oxidative stress-mediated upregulation of sodium-glucose cotransporters 1 and 2 (SGLTs) expression in cultured coronary endothelial cells", World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Juillet 2018, Kyoto
2. Sin-Hee Park, Muhammad Akmal Farooq, Sébastien Gaertner, **Christophe Bruckert**, Abdul Wahid Qureshi, Hyun-Ho Lee, Djamel Benrahla, Brigitte Pollet, Dominique Stephan, Patrick Ohlmann, Jean-Marc Lessinger, Eric Mayoux, Cyril Auger, Olivier Morel, Valérie B Schini-Kerth, "Empagliflozin improved systolic blood pressure, endothelial dysfunction and heart remodeling in the metabolic syndrome ZSF1 rats", Printemps de la Cardiologie, Avril 2019, Lille
3. Sin-Hee Park, Muhammad Akmal Farooq, Sébastien Gaertner, **Christophe Bruckert**, Abdul Wahid Qureshi, Hyun-Ho Lee, Djamel Benrahla, Brigitte Pollet, Dominique Stephan, Patrick Ohlmann, Jean-Marc Lessinger, Eric Mayoux, Cyril Auger, Olivier Morel, Valérie B Schini-Kerth, "Empagliflozin, a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, improved heart remodeling and endothelial and vascular dysfunction in ZSF1 rats with metabolic syndrome", 55^{ème} Annual Meeting of the European Association for the study of Diabetes, Septembre 2019, Barcelone

4. **Christophe Bruckert**, Lamia Remila, Kensuke Matsushita, Cyril Auger, Ursula Hougue, Ahmed Bey Chaker, Sin-Hee Park, Paola Algara-Suarez, Eugenia Belcastro, Laurence Jesel, Patrick Ohlmann, Olivier Morel, Valérie B. Schini-Kerth, “Empagliflozin treatment did not affect the hypertensive response to Ang II administration but decreased oxidative stress in the arterial wall, and endothelial and cardiac dysfunction”, European Society of Cardiology, Août 2020, événement en ligne.
5. Sin-Hee Park, Said Amissi, Paola Algara-Suarez, Dal-Seong Gong, Mroueh, Eugenia Belcastro, Kensuke Matsushita, **Christophe Bruckert**, Ahmed Bey Chaker, Cyril Auger, Laurence Jesel, Patrick Ohlmann, Olivier Morel, Jean-Philippe Mazzucotelli, Valérie B. Schini-Kerth. “Sodium-glucose co-transporter 1 and 2 expression in the mammary artery of patients with bypass surgery: Role of the pro-inflammatory response and contribution to oxidative stress”, European Society of Cardiology, 2021,
6. **Christophe Bruckert**, Lamia Remila, Kensuke Matsushita, Cyril Auger, Ursula Hougue, Ahmed Bey Chaker, Sin-Hee Park, Paola Algara-Suarez, Eugenia Belcastro, Laurence Jesel, Patrick Ohlmann, Olivier Morel, Valérie B. Schini-Kerth. “Cardiac diastolic dysfunction in angiotensin II-treated hypertensive rats is associated with endothelial upregulation of SGLT1/2 in the macro and microcirculation: protective effect of empagliflozin”, Heart failure congress, 29 juin au 1^{er} juillet 2021, événement en ligne.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
LISTE DES PUBLICATIONS	3
LISTE DES POSTERS ET DES PRESENTATIONS ORALES	5
TABLE DES MATIERES	7
LISTE DES TABLEAUX	10
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION	18
Chapitre 1 : Les inhibiteurs des co-transporteurs sodium glucose (SGLT1 et 2) ou gliflozines	19
1.1 Genèse de la découverte des gliflozines.....	19
1.2 Les co-transporteurs sodium glucose 1 et 2 : cibles des gliflozines.....	22
1.3 Place des gliflozines dans l’arsenal thérapeutique du diabète de type 2	28
1.3.1 Généralités sur le diabète de type 2.....	28
1.3.2 Les nouvelles générations d’antidiabétiques.....	29
1.3.3 Première démonstration clinique de l’effet protecteur cardiovasculaire d’une gliflozine : l’étude EMPA-REG OUTCOME	32
1.4 Confirmation de l’effet protecteur cardiovasculaire de la classe des gliflozines	35
1.5 Mécanismes établis et hypothétiques de la protection cardiovasculaire des gliflozines	40
1.5.1 Réduction de la pression artérielle	41
1.5.2 Perte de poids	41

1.5.3 Réduction de l'acide urique plasmatique	42
1.5.4 Modification du profil lipidique	42
1.5.5 Amélioration de la stéatose hépatique.....	43
1.5.6 Elévation des corps cétoniques	44
1.5.7 Effets sur l'échangeur Na ⁺ /H ⁺	45
1.5.8 Inhibition des transporteurs SGLTs	46
1.5.9 Amélioration de la dysfonction endothéliale et de la rigidité vasculaire	48
1.5.10 Réduction de la fibrose cardiaque	50
1.5.11 Amélioration de la fonction ventriculaire gauche	52
1.5.12 Réduction du stress oxydant et de l'inflammation	58
Chapitre 2 : L'angiotensine II, facteur clé de la dysfonction cardiaque et vasculaire	63
2.1 Structure, rôle et régulation de l'angiotensine II et de ses récepteurs	63
2.1.1 Vue d'ensemble du système rénine-angiotensine-aldostérone.....	63
2.1.2 L'angiotensine II et ses récepteurs	65
2.2 Rôle de l'angiotensine II dans la physiologie et la physiopathologie rénale	67
2.3 Rôle de l'angiotensine II dans les troubles métaboliques	71
2.4 Physiopathologie cardiovasculaire de la voie de l'angiotensine II	76
2.4.1 Dysfonction endothéliale.....	77
2.4.2 Athérosclérose	78
2.4.3 Fibrose et rigidité vasculaire	79
2.4.4 Dysfonction diastolique et fibrose cardiaque	80
OBJECTIFS DE L'ETUDE	84
RESULTATS	88
Article principal	89
Article annexe	134

DISCUSSION GENERALE	149
CONCLUSION GENERALE	160
BIBLIOGRAPHIE	163

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Répartition tissulaire des isoformes de cotransporteurs SGLTs isolés chez l'Homme.....	25
Tableau 2. Première et seconde génération d'antidiabétiques oraux	31
Tableau 3. Mécanismes potentiels de protection CV des gliflozines.....	40
Tableau 4. Etudes cliniques étudiant le rôle des inhibiteurs de SGLT2 sur la fonction du VG.	57
Tableau 5. Etudes les plus récentes sur l'effet des inhibiteurs de SGLT2 sur la fonction du VG	58

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure chimique des O-glucosides et des C-glucosides	19
Figure 2. Hydrolyse in vivo de la phlorizine en son métabolite actif la phlorétine	20
Figure 3. Structures moléculaires des inhibiteurs des transporteurs SGLT2 approuvées par la FDA, l'EMA et la Pharmaceuticals and Medical Devices Agency	21
Figure 4. Structure moléculaire de la protéine humaine SGLT2.....	23
Figure 5. Modèle du mécanisme de transport du glucose couplé au sodium	24
Figure 6. L'inhibition de SGLT2 réduit la réabsorption rénale du glucose	26
Figure 7. Transport actif (SGLT2) et passif (GLUT2) du glucose dans les cellules épithéliales du tubule proximal rénal	26
Figure 8. Effets CV de l'étude EMPA-REG OUTCOME	34
Figure 9. Effets CV de l'étude DAPA-HF	38
Figure 10. Effets CV de l'étude EMPEROR.....	39
Figure 11. (A) Conséquences de la surexpression de la NHE due à l'IC diabétique sur le signal calcique et sodique. (B) Réduction des concentrations calciques et sodiques par les inhibiteurs de SGLT2 menant ainsi à une protection cardiaque	46
Figure 12. Effets CV d'un modèle de HFpEF et protection de l'empagliflozine.....	54
Figure 13. Mécanismes protecteurs de l'empagliflozine sur les lésions CV induites par la glucotoxicité.....	61
Figure 14. Vue d'ensemble du système rénine-angiotensine et de la diversité de ses récepteurs	64
Figure 15. Actions de l'Ang II lors de sa fixation sur AT2R au sein du système CV	66
Figure 16. Effets fibrogéniques de l'Ang II sur le rein	70

Figure 17. Effets de l'Ang II sur la voie de l'insuline au sein des cellules musculaires striés squelettiques	72
Figure 18. Représentation des mécanismes potentiels de protection de l'inhibition du SRAA sur les fonctions métaboliques telles que la résistance à l'insuline ou le développement du DT2.....	75
Figure 19. Rôles physiopathologiques de l'Ang II sur le système vasculaire.....	77
Figure 20. Rôles de l'Ang II dans la stimulation du processus d'hypertrophie cardiaque.....	83
Figure 21. Mécanisme d'action proposé de l'Ang II sur la CE et effets protecteurs de l'inhibition de SGLT1 et 2	156

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : acide arachidonique

ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine

AG : acides gras

AGE : produit avancé de glycation

ALAT : alanine amino transférase

Ang II : angiotensine II

AP : acide palmitique

ASAT : aspartate amino transférase

AT1R : récepteur de l'angiotensine de type 1

AT2R : récepteur de l'angiotensine de type 2

ATP : adénosine triphosphate

AVC : accident vasculaire cérébral

BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau

CaM : calmoduline

CEs : cellules endothéliales

CMLs : cellules musculaires lisses

COX : cyclooxygénases

CRP : protéine C réactive

CTGF : facteur de croissance du tissu conjonctif

CV : cardiovasculaire

DAG : diacylglycérol

ENaC : canal sodique de la membrane apicale des cellules épithéliales

eNOS : monoxyde d'azote synthase endothéliale

ESC : Société Européenne de Cardiologie

DT1 : diabète de type 1

DT2 : diabète de type 2

EGF : facteur de croissance épidermique

EGFR : récepteur du facteur de croissance épidermique

EMA : Agence Européenne du Médicament

ET-1 : endothéline 1

ERO : espèces réactives de l'oxygène

FDA : Food and Drug Administration

FE : fraction d'éjection

FMD : dilatation liée au flux

FT : facteur tissulaire

GGT : gamma-glutamyl transférase

GLP-1 : glucagon-like peptide-1

GLUT : transporteurs de glucose

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

HbA1c : hémoglobine glyquée

HDL : lipoprotéine de haute densité

HFpEF : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

HFrEF : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite

HIF-1 α : facteur induit par l'hypoxie de type 1 α

HNF : hepatocyte nuclear factor (facteur nucléaire hépatocytaire 1 α humain)

HTA : hypertension artérielle

HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

IC : insuffisance cardiaque

ICAM-1 : intercellular adhesion molecule

IDM : infarctus du myocarde

IFN- γ : interféron γ

IL : interleukine

IP3 : inositol triphosphate

IRS-1 : insulin receptor substrate-1

LAVI : index du volume atrial gauche

LB : lymphocyte B

LDL : lipoprotéines de faible densité

LT : lymphocyte T

LVEDV : volume télédiastolique du ventricule gauche

LVESV : volume télésystolique du ventricule gauche

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1

MEC : matrice extracellulaire

MLCK : kinase des chaînes légères de la myosine

MLCP : phosphatase des chaînes légères de la myosine

MMP : matrix metalloproteinase

NADPHox : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase

NCX : échangeur Na⁺/Ca²⁺

NF- κ B : facteur nucléaire κ B

NHE : échangeur Na⁺/H⁺

NKCC : cotransporteur Na⁺/K⁺/Cl⁻ de type 2

NO : monoxyde d'azote

PAD : pression artérielle diastolique

PAI-1 : inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1

PAS : pression artérielle systolique

PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

PWV : vitesse d'onde de pouls

RAGE : récepteur des produits avancés de glycation

RM : récepteur des minéralocorticoïdes

RSTK : récepteurs à activité sérine/thréonine kinase

RTK : récepteurs à activité tyrosine kinase

SA- β -gal : senescence-associated β -galactosidase

SGLT1 : cotransporteur sodium glucose 1

SGLT2 / cotransporteur sodium glucose 2

SNP : nitroprussiate de sodium

SOD : superoxyde dismutase

Sox : stress oxydant

SRAA : système rénine-angiotensine-aldostérone

STAT3 : signal transducer and activator of transcription-3

STNA : stéatopathie non alcoolique

SU : sulfonilurées

TBAR : substances réactives à l'acide thiobarbiturique

TCP : tube contourné proximal

TGF- β : transforming growth factor

TIMP : inhibiteurs tissulaires des MMPs

TNF- α : facteur de nécrose tumoral α

TZD : thiazolidinediones

VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule-1

VG : ventricule gauche

VOP : vitesse d'onde de pouls

ZSF1 : Zucker diabetic fatty/Spontaneously hypertensive heart Failure F1 hybrid

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Les inhibiteurs des co-transporteurs sodium glucose (SGLT1 et 2) ou gliflozines

1.1 Genèse de la découverte des gliflozines

En 1835, la phlorizine, un O-glucoside phénolique naturel, a été isolé de l'écorce, des feuilles et des fruits du pommier (**Figure 1**).

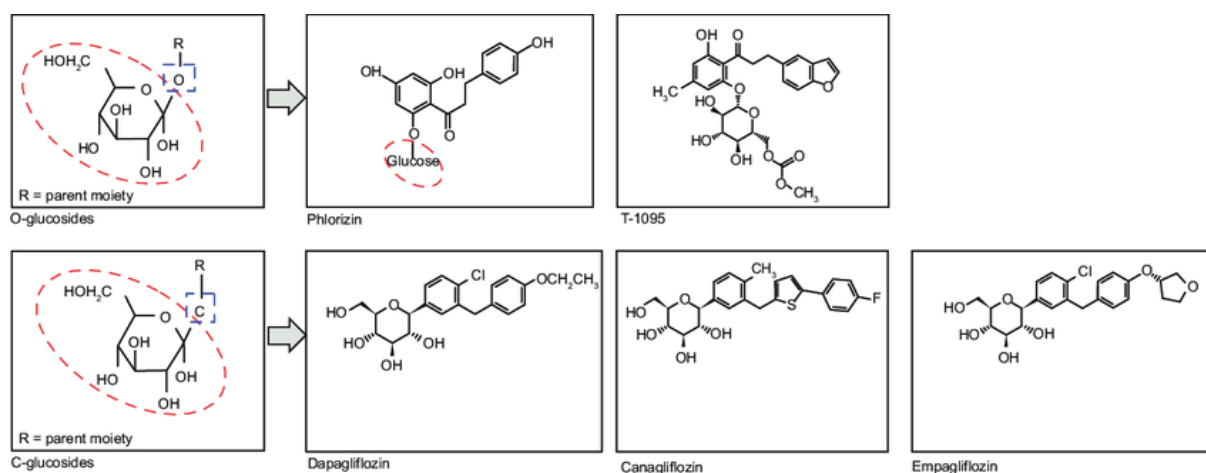


Figure 1. Structure chimique des O-glucosides (phlorizine et T-1095) et des C-glucosides (Dapagliflozine, Canagliflozine et Empagliflozine) (Nauck et al., 2014).

En 1933, Chasis et al. a montré que la phlorizine augmentait l'excrétion urinaire de glucose chez les sujets sains (Rieg et Vallon, 2018). L'administration sous-cutanée de phlorizine dans un modèle de rats résistants à l'insuline a montré une amélioration du profil glycémique et de la résistance à l'insuline (Rossetti et al., 1987). Cependant, devant sa faible solubilité dans l'eau, sa mauvaise biodisponibilité orale ainsi que son absence de sélectivité SGLT1/SGLT2, la phlorizine a été abandonnée pendant plus d'un siècle. En effet, le manque de sélectivité de la phlorizine a entraîné de nombreux effets indésirables gastrointestinaux

(diarrhées sévères et déshydratation) dus à l'inhibition des transporteurs SGLT1 fortement exprimés au niveau de la bordure en brosse intestinale. De plus, la structure de la phlorizine est hydrolysée *in vivo* par des β -glucosidases en phlorétine, une molécule inhibitrice des transporteurs GLUTs, voie principale d'entrée du glucose au sein des cellules de l'organisme par diffusion facilitée, entraînant ainsi une réduction du transport de glucose notamment au niveau des cellules du système nerveux central (**Figure 2**).

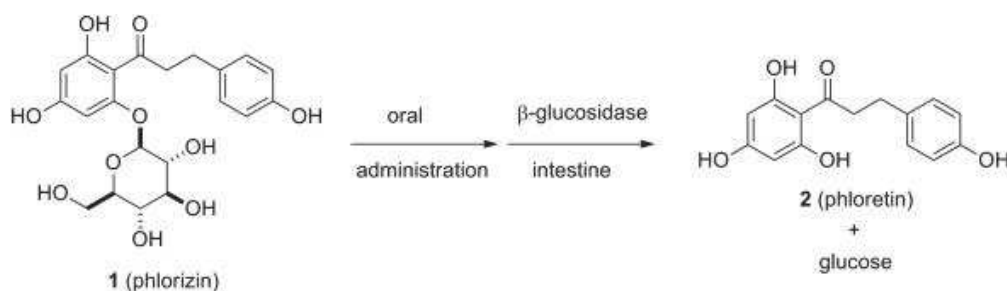


Figure 2. Hydrolyse *in vivo* de la phlorizine en son métabolite actif, la phlorétine (Nomura et al., 2017).

De nombreuses tentatives de synthèse d'un composé sélectif des transporteurs SGLT2 avec une meilleure biodisponibilité par voie orale ont été réalisées avec la synthèse notamment du composé T-1095 et de la sergliflozine. Cependant, leur insuffisante sélectivité vis-à-vis de SGLT2 ainsi que leur faible biodisponibilité ont été responsables de leur abandon. Au début des années 2010, les groupes Bristol Myers-Squibb et AstraZeneca ont conçu un C-glucoside où la liaison C-C n'est pas hydrolysable empêchant par la même sa dégradation par les β -glucosidases endogènes (**Figure 1**).

Ce composé a été nommé la dapagliflozine et a été rejeté par l'agence américaine du médicament (FDA) mais approuvé par l'agence européenne du médicament (EMA) sous l'appellation Forxiga[®]. Six inhibiteurs ont depuis été approuvés : il s'agit de la dapagliflozine,

de la canagliflozine (le premier, approuvé en 2013 par la FDA), de l'ipragliflozine, de l'empagliflozine, de la luséogliflozine et de la tofogliflozine. Trois autres inhibiteurs sont en phase d'études cliniques : il s'agit de la sotagliflozine, de l'ertugliflozine et de la bexagliflozine (**Figure 3**).

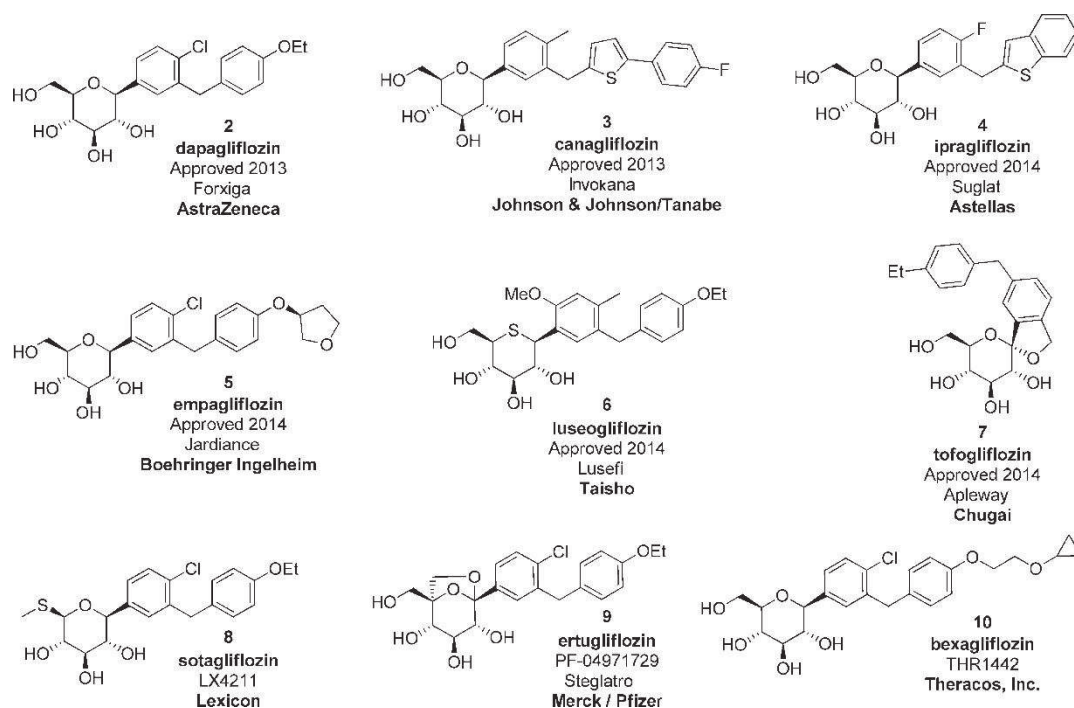


Figure 3. Structures moléculaires des inhibiteurs des transporteurs SGLT2 approuvées par la FDA, l'EMA) et la Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA). La sotagliflozine et la bexagliflozine sont en phase III d'études cliniques (Aguillón et al., 2018).

1.2 Les co-transporteurs sodium glucose 1 et 2 : cibles des gliflozines

Les co-transporteurs sodium glucose 1 et 2 (SGLT1 et SGLT2) font partie de la famille des gènes *SLC5A*. Ces gènes codent pour six protéines différentes chez l'Homme qui permettent le transport essentiellement du glucose (SGLT1,2,3,4,5), mais également du galactose (SGLT1), du mannose (SGLT4 et 5) ou encore du myo-inositol (SGLT6). Le transport du glucose se fait par transport actif secondaire, couplé au sodium selon une stœchiométrie de 2 Na⁺ pour 1 molécule de glucose (SGLT1) ou une stœchiométrie de 1 Na⁺ pour 1 molécule de glucose (SGLT2) (Wright et al., 2011). Les co-transporteurs SGLT1 et 2 sont des glycoprotéines de 72 kDa composées de 14 hélices α transmembranaires regroupées en 2 masses avec comme cœur de structure deux séquences inversées répétées (TM1-5 et TM6-10). La fixation du substrat (le glucose) a lieu au centre de la protéine de manière adjacente aux segments discontinus TM1 et TM6. Le site est isolé des milieux extra et intracellulaires par plusieurs résidus (L84, F98, F453 et Y290) (Poulsen et al., 2015) (**Figures 4 et 5**). L'ensemble des transporteurs SGLTs partagent un site commun de liaison Na⁺ (Na2) à l'exception de SGLT1 qui comporte un site supplémentaire de liaison au Na⁺ : Na1. D'importantes études biophysiques et biochimiques d'expression de SGLT1 au sein d'oocytes et de cellules en culture ont permis de dégager un modèle de la cinétique du transport du Na⁺ et du glucose par les transporteurs SGLTs. De manière schématique et simplifiée, le processus de transport peut se décomposer en cinq étapes. Tout d'abord, le transporteur se trouve en conformation fermée, le rendant ainsi réfractaire à toute fixation de ligands extracellulaires. L'étape 2 consiste en la fixation du Na⁺ extracellulaire sur le site Na2 (puis Na1 pour SGLT1) ce qui permet l'ouverture du canal d'entrée du glucose. Le glucose va ainsi se fixer sur son site de liaison entraînant ainsi la fermeture du canal du côté

extracellulaire. La fixation du glucose va entraîner, au cours de l'étape 4, un changement de conformation de la protéine (conformation ouverte) permettant l'ouverture d'un pore du côté intracellulaire libérant ainsi le glucose et le Na^+ dans la cellule. Au cours de la dernière étape, le canal du côté intracellulaire se ferme et la protéine change à nouveau de conformation afin de retrouver son état initial à savoir la conformation fermée. L'ensemble de ce cycle dure 20 ms et est réversible. Les paramètres du cycle sont déterminés par les gradients de concentration du glucose et du Na^+ entre les milieux extra- et intra-cellulaires et par le potentiel membranaire (Ghezzi et al., 2018).

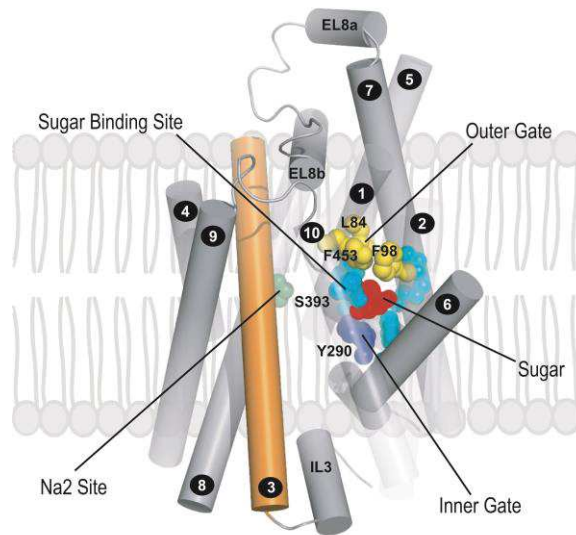


Figure 4. Structure moléculaire de la protéine humaine SGLT2 (Ghezzi et al. 2018).

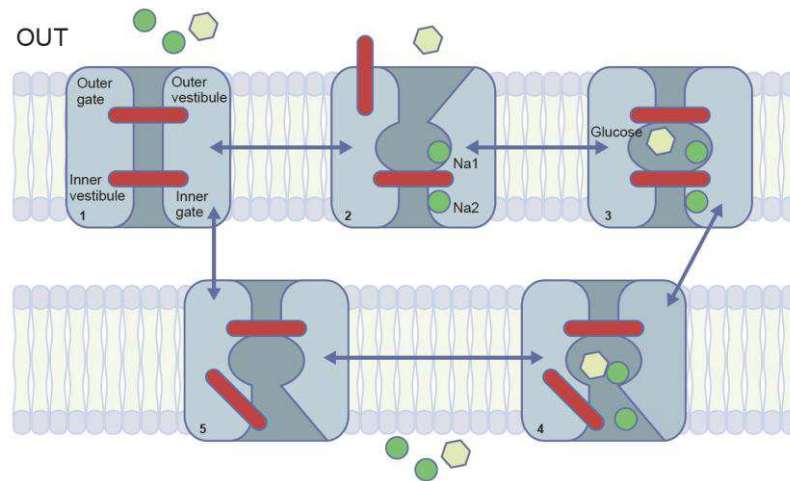


Figure 5. Modèle du mécanisme de transport du glucose couplé au sodium (Ghezzi et al. 2018).

La répartition tissulaire des transporteurs SGLTs varie selon l'isoforme considéré (**Tableau 1**). SGLT1 présente une localisation intestinale mais est également exprimé au sein du rein, des cardiomyocytes, du cerveau, de la trachée et des testicules. Il est responsable de l'absorption du glucose à la suite de la prise alimentaire. SGLT2 quant à lui, est fortement exprimé par le rein mais il est aussi exprimé dans le cerveau, le foie, la thyroïde et les glandes salivaires.

Tableau 1. Répartition tissulaire des isoformes de co-transporteurs SGLTs isolés chez l'Homme (Aguillón et al., 2018).

SGLT member	Substrate	Distribution in human tissue
SGLT1	Glucose, galactose	Intestine, trachea, kidney, heart, brain, testis, prostate
SGLT2	Glucose	Kidney, brain, liver, thyroid, muscle, heart
SGLT3	Glucose	Intestine, testis, uterus, lung, brain, thyroid
SGLT4	Glucose, mannose	Intestine, kidney, liver, brain, lung, trachea, uterus, pancreas
SGLT5	Glucose, galactose	Kidney
SGLT6	D-chiro-inositol	Brain, kidney, intestine

Les deux transporteurs SGLT1 et 2 sont physiologiquement important au niveau rénal. En effet, SGLT2 est situé dans le rein au niveau du segment S1 du tube contourné proximal et est responsable de la réabsorption de la très grande majorité du glucose filtré au niveau rénal (90 %) (**Figures 6 et 7**). Il est caractérisé par une faible affinité et par une très haute capacité de transport du glucose. Les 10 % restants du glucose filtré est réabsorbé par le transporteur de haute affinité mais de faible capacité, SGLT1, exprimé au niveau du segment S3 du tube contourné proximal ce qui empêche toute glycosurie chez un sujet sain. L'inhibition du transporteur SGLT2 entraîne une forte augmentation de l'excrétion urinaire de glucose (≈ 70 g/jour), ce qui représente une perte calorique de l'ordre de 300 kcal (Wright et al., 2011).

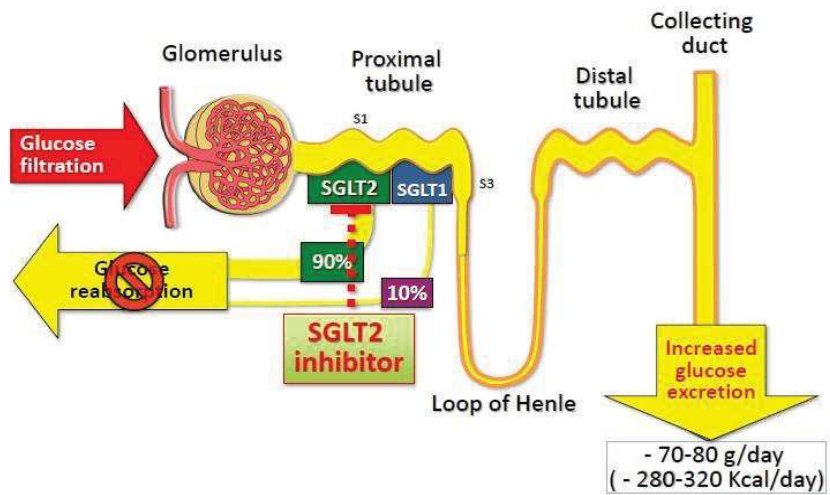


Figure 6. L'inhibition de SGLT2 réduit la réabsorption rénale du glucose (adapté de Girard, 2015).

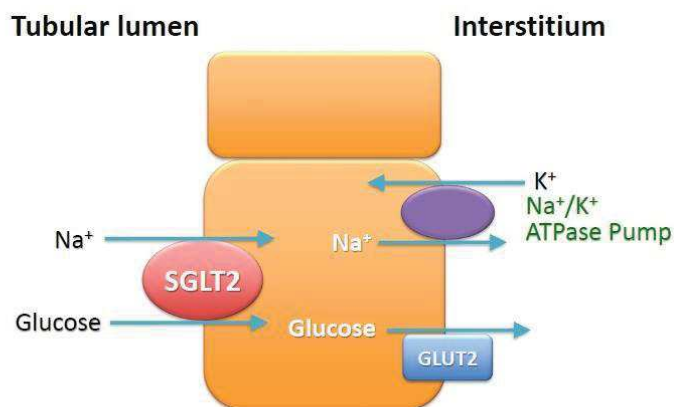


Figure 7. Transport actif (SGLT2) et passif (GLUT2) du glucose dans les cellules épithéliales du tubule proximal rénal (Nair et Wilding, 2010).

Ce mode d'action permet une réduction notable, à la fois de l'hyperglycémie à jeun et de l'hyperglycémie post-prandiale. Les inhibiteurs de SGLT2 diminuent donc la capacité maximale de réabsorption du glucose par les tubules rénaux, ce qui augmente *de facto*, l'excrétion urinaire de glucose et abaisse la glycémie. Il est important de noter qu'il s'agit du

premier traitement qui élimine le glucose excédentaire de l'organisme. De manière surprenante, les transporteurs SGLT2 sont surexprimés par les cellules épithéliales du tube contourné proximal chez les patients diabétiques (Rahmoune et al., 2005). De plus, des études menées sur des modèles de rongeurs diabétiques a montré une élévation de l'expression protéique des transporteurs SGLT1 et SGLT2 au sein des cellules épithéliales rénales mais aussi des ARNm correspondants chez le rat Zucker obèse ou chez des rats où le diabète a été induit par administration de streptozotocine ou d'alloxane (Tabatabai et al., 2009; Vestri et al., 2001). Les modes de régulation des transporteurs SGLT1 et 2 ainsi que les voies de signalisation impliqués ont fait l'objet de très peu d'études. Les promoteurs des gènes codant pour SGLT1 et 2 contiennent des sites de liaison pour le facteur nucléaire hépatocytaire 1 α humain (HNF1 α) dont la fixation augmente l'activité du promoteur. De plus, chez des souris où le gène HNF1 α est délété (Knock-out HNF1 α -/-), on observe une forte altération de la réabsorption rénale du glucose indiquant que la facteur HNF1 α régule également l'expression de SGLT2 (Pontoglio et al., 2000). Aucun phénotype lié à une altération de l'absorption intestinale de glucose n'a été observé ce qui suggère qu' HNF1 α régule l'expression rénale de SGLT2 mais pas l'expression intestinale de SGLT1 (Wright et al., 2011). Des expériences réalisées dans des cellules embryonnaires de rein humain de type HEK 293T ont montré que SGLT2 est régulé par la stimulation de protéines kinases, notamment la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC) (Ghezzi et Wright, 2012). Les protéines PKA et PKC induisent également l'augmentation de l'activité de SGLT1 par stimulation du nombre de transporteurs exprimés à la membrane cellulaire dans des oocytes de crapaud Xénope (Hirsch et al., 1996).

1.3 Place des gliflozines dans l'arsenal thérapeutique du diabète de type 2

1.3.1 Généralités sur le diabète de type 2

Le diabète de type 2 (DT2) est le trouble métabolique le plus répandu dans le monde et affecte toujours plus d'individus en particulier dans les pays en voie de développement (Inde, Chine...), où son incidence devient préoccupante. En effet, le DT2 affectait, en 2017, 451 millions de personnes dans le monde et affectera, 592 millions de malades en 2035 et même, si la tendance se poursuit, 693 millions en 2045 (Cho et al., 2018; Guariguata et al., 2014). La prévalence grandissante du DT2 est attribuée sans nul doute, à l'explosion de l'obésité, qui est aujourd'hui devenue un véritable enjeu de santé publique.

Le DT2 se définit comme une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L qui est accompagnée d'une élimination urinaire du glucose (glycosurie). De nombreuses études épidémiologiques ont montré que le risque majeur du DT2 est imputable à l'hyperglycémie chronique qui conduit par la suite à des complications neuro-cardiovasculaires. Les troubles vasculaires peuvent aussi bien affecter les micro-vaisseaux (vascularisation rétinienne, rénale) que les vaisseaux de gros calibre comme les artères coronaires et carotidiennes. Le DT2 est donc un facteur de risque cardiovasculaire (CV) à part entière, multipliant le risque de mortalité CV d'un facteur de 2 à 7 (Stamler et al., 1993). Il est également important de préciser que le DT2 est très fréquemment combiné à d'autres facteurs de risque CV tels que l'hypertension artérielle essentielle ou les dyslipidémies, pouvant mener au syndrome métabolique. L'ensemble de ces facteurs jouent un rôle multiplicatif sur le risque d'apparition de pathologies CV. En conséquence, la prise en charge thérapeutique du patient doit prendre en compte non seulement l'équilibre glycémique mais aussi les facteurs de risque CV et ce de manière prioritaire. Cependant, il a été montré qu'une réduction drastique et agressive de

l'hyperglycémie, surtout chez les diabétiques de grade sévère, est délétère et se traduit par un risque d'accident vasculaire cérébral (AVC) non-fatal et d'insuffisance cardiaque congestive augmentés de respectivement 1,2 et 1,3 fois face à une thérapie classique (Buse, 2007; Dluhy et McMahon, 2008; Ismail-Beigi et al., 2010). Il est donc crucial de s'assurer que les traitements antidiabétiques ne présentent pas d'effets délétères sur le système CV, et qu'idéalement ils soient en mesure d'abaisser la mortalité CV due au DT2. C'est ainsi que la FDA en 2008 et l'EMA en 2012 ont exigé que les nouveaux principes actifs développés comme antidiabétiques fassent l'objet d'études cliniques, afin de garantir leur innocuité vis-à-vis du système CV et que dans le meilleur des cas, ces principes actifs soient en mesure de réduire les hospitalisations pour infarctus du myocarde (IDM), accident vasculaire cérébral (AVC) ou autres événements d'origine CV.

1.3.2 Les nouvelles générations d'antidiabétiques

La plupart des thérapeutiques antidiabétiques de 1^{ère} génération incluant la metformine, les sulfonylurées (SU) et les thiazolidinediones (TZD) n'ont pas fait l'objet d'investigations cliniques où le critère de jugement principal était la fonction CV (Paredes et al., 2016). Un rappel des mécanismes d'action des principales classes d'antidiabétiques ainsi que les effets globaux CV sont synthétisés dans le Tableau 2. En plus d'un effet neutre voire néfaste sur le système CV, les SUs ont montré des effets de prise de poids (2 à 5 kg) et un risque d'hypoglycémie. Cette classe est très efficace dans l'abaissement de la glycémie grâce à son action stimulatrice de la sécrétion d'insuline, mais c'est cette activité dépendante de l'insuline qui est responsable des hypoglycémies médicamenteuses.

Plus récemment, de nouvelles classes d'agents antidiabétiques ciblant le système des incrélines ont vu le jour : les analogues du GLP-1, Glucagon-like peptide-1 (exénatide,

liraglutide), et les inhibiteurs de DPP-4, Dipeptidyl peptidase-4 (les gliptines). La progression du bol alimentaire le long du tube digestif entraîne la sécrétion par les cellules L de l'intestin grêle d'un neuropeptide, le GLP-1, qui fait partie de la famille des incrétines. Le peptide GLP-1 stimule la sécrétion d'insuline de manière dépendante du glucose ce qui a pour conséquence d'abaisser la glycémie sans exposer le patient à un risque d'hypoglycémie. Cependant, le GLP-1 présente un temps de demi-vie très court (de l'ordre de 1,5 à 5 min) dans le plasma et est ensuite dégradé en amide GLP-1 inactive par l'enzyme DPP-4 (Hui et al., 2002). Afin de contrer la faible stabilité du GLP-1 et de promouvoir l'effet incrétine, deux stratégies ont été développées : créer des analogues structuraux du GLP-1 avec une durée de vie plus élevée ou inhiber l'activité de DPP-4. L'avantage majeur de ces deux classes d'antidiabétiques réside dans le fait qu'elles ne sont pas associées aux hypoglycémies iatrogènes contrairement aux sulfonylurées. Malgré des bénéfices certains, les inhibiteurs de DPP-4 n'ont pas montré de réduction de la mortalité CV chez les DT2 (Green et al., 2015). A l'inverse, les analogues du GLP-1, et en particulier le liraglutide, ont montré récemment une réduction significative de la mortalité CV, des événements microvasculaires et de la mortalité toute cause (Pfeffer et al., 2015). Cependant, ces chiffres demeurent relativement modérés chez les DT2 traités (**Tableau 2** et (Bentley-Lewis et al., 2015)). Par exemple, si on compare la mortalité CV chez des DT2, on relève 219 décès dans le groupe traité au liraglutide (soit 4,7 % des malades), contre 278 décès (soit 6,8 % des malades) dans le groupe placebo (Marso et al., 2016).

Tableau 2. Première et seconde génération d'antidiabétiques oraux. IC : insuffisance cardiaque ; MACE : major adverse cardiovascular events ; ns : non significatif.

Molécule	Mécanisme d'action	Hb1Ac (%)	Effet CV global
Metformine	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ captage du glucose dépendant de l'insuline - ↓ production hépatique et rénale de glucose 	↓ 1,5	<p>↓ risque CV + mortalité globale.</p> <p>Risque d'IDM est abaissé de 39% avec metformine vs thérapie conventionnelle chez les patients obèses (King et al., 1999)</p>
Sulfonylurées	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ sécrétion d'insuline 	↓ 1,5	<p>↑ risque CV avec le tolbutamide : retrait (Knatterud et al., 1971), ns : autres composés</p>
Thiazolidinediones	<ul style="list-style-type: none"> - activation PPARγ - ↓ acides gras libres - ↑ captage du glucose par les muscles squelettiques - ↓ gluconéogenèse par le foie 	↓ 1,0	<p>↑ insuffisance cardiaque de 1,3 % avec rosiglitazone + insuline (2,4 %) versus insuline seule (1,1%) (Nissen et Wolski, 2007)</p> <p>Effet neutre de la Pioglitazone puis retrait mondial pour augmentation du risque de cancer de la vessie</p>
Analogues du GLP-1	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ sécrétion d'insuline - ↑ sensibilité à l'insuline 	↓ 1,0	<p>Protection CV modérée</p> <p>Peu de différences dans la mortalité CV et dans les hospitalisations pour IC avec lixisenatide vs placebo (Bentley-Lewis et al., 2015)</p> <p>Réduction de 12 % MACE, 9% hospitalisations pour IC 12 % mortalité toute cause (Kristensen et al., 2019)</p>

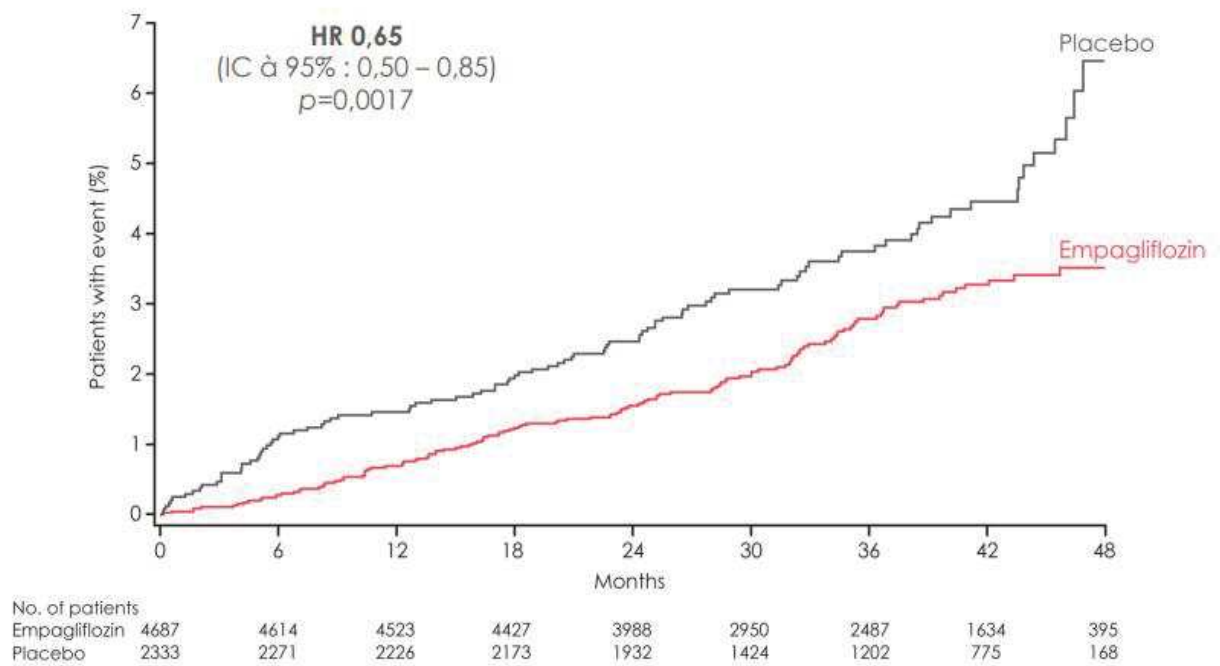
Inhibiteurs de DPP4	- ↑ sécrétion d'insuline dépendante du glucose	↓ 1,0	Pas de réduction du risque CV
----------------------------	--	-------	--------------------------------------

1.3.3 Première démonstration clinique de l'effet protecteur cardiovasculaire d'une gliflozine : l'étude EMPA-REG OUTCOME

L'étude EMPA-REG OUTCOME, publiée en 2015 dans le New England Journal of Medicine et incluant 7020 patients DT2, représente la première étude clinique qui a démontré que le traitement du DT2 à haut risque CV avec l'empagliflozine est associé à une réduction de 38 % de la mortalité CV et à une réduction de 32 % de la mortalité toute cause (**Figure 8**). En revanche, aucun effet sur le risque d'AVC non fatal n'a été mis en évidence contre placebo. Ces effets majeurs ont été observés dès 3 mois de traitement, et de ce fait, ne peuvent être expliqués par une réduction des phénomènes athérombotiques. Les principaux effets incluent une réduction du taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c) de l'ordre de 0,6 %, une perte de poids de 3 à 5 kg, un abaissement de la pression artérielle systolique (PAS) de 5 mm Hg en moyenne ainsi qu'une diurèse accrue. La conclusion principale de l'étude EMPA-REG OUTCOME est qu'il suffit de traiter seulement 39 patients DT2 à haut risque CV pour prévenir un décès. Cependant, les mécanismes impliqués dans ces bénéfices CV demeurent largement incompris. Les mécanismes potentiels suggérés incluent une protection rénale par le mode d'action de l'empagliflozine (glycosurie et natriurèse essentiellement) et un possible effet sur la fonction cardiaque. En effet, l'inhibition de SGLT2 favorise la glycosurie ce qui conduit d'une part, à un bilan calorique négatif et donc à une perte de poids ce qui peut contribuer à une diminution de la graisse épigardique augmentant ainsi la contractilité cardiaque et d'autre part, à une baisse modérée de l'HbA1c

(0,6 %). De plus, l'excrétion de Na^+ promeut la réduction de la PAS de 5 mm Hg (Heerspink et al., 2016). Cependant, les effets mis en évidence sur l'HbA1c, la PAS et le poids corporel sont malgré tout relativement modérés. Un résultat fondamental, plus inattendu, fut une réduction de 35% des hospitalisations pour IC dans le groupe traité avec l'empagliflozine ce qui cherchera à être confirmé avec les autres membres de la famille des gliflozines.

Hospitalisation pour insuffisance cardiaque



Décès CV

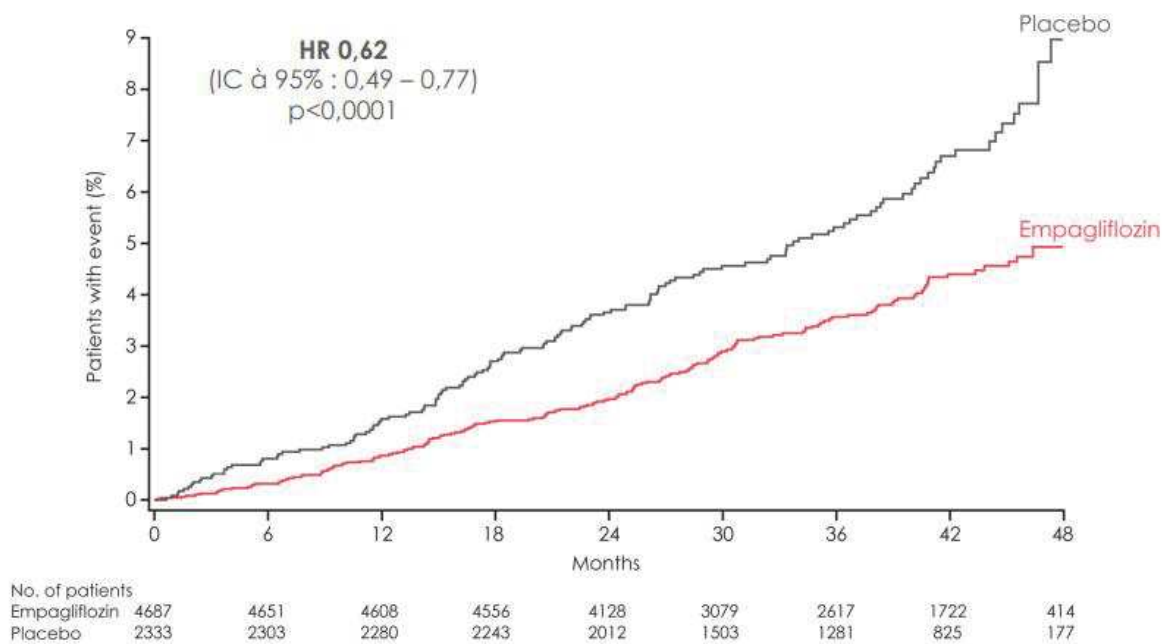


Figure 8. Effets CV de l'étude EMPA-REG OUTCOME (Zinman et al., 2015).

1.4 Confirmation de l'effet protecteur cardiovasculaire de la classe des gliflozines

Deux ans après la publication de l'étude EMPA-REG Outcome, une nouvelle étude clinique de grande ampleur testant cette fois-ci la canagliflozine, l'étude CANVAS, a été menée sur 10 142 patients présentant un DT2 ainsi qu'un risque CV élevé (Neal et al., 2017). Les principaux résultats de cette étude montrent une réduction significative du critère MACE (Major Adverse Cardiovascular Events) composé de la mortalité d'origine CV, des IDM non mortels ainsi que des AVC non-mortels (hazard ratio (HR) 0.86; 95% confidence interval (CI), 0.75 to 0.97). Les hospitalisations pour insuffisance cardiaque ont elles aussi diminué (HR 0.67; 95% IC, 0.52 to 0.87) par rapport au placebo (Kosiborod et al., 2017). La deuxième partie du programme CANVAS (CVD-REAL) a consisté à étudier l'effet CV de la canagliflozine par rapport aux autres traitements antidiabétiques. Les données ont montré une diminution des hospitalisations pour insuffisance cardiaque (HR 0.49; 95% IC, 0.41 to 0.57) ainsi qu'un abaissement de la mortalité toute cause (HR 0.61; 95% IC, 0.51 to 0.73).

En 2019, une nouvelle étude clinique a testé le troisième composé principal de la classe des gliflozines à savoir la dapagliflozine. L'essai clinique DECLARE-TMI 58 a inclus 17 160 patients dont les critères d'inclusions sont similaires à l'étude CANVAS. Les principales observations de cet essai sont une réduction significative de la mortalité d'origine CV ou d'hospitalisation pour insuffisance cardiaque (HR 0.83; 95% IC, 0.73 to 0.95) mais ne montrent pas en revanche, de diminution du critère de jugement principal, le MACE (Wiviott et al., 2019).

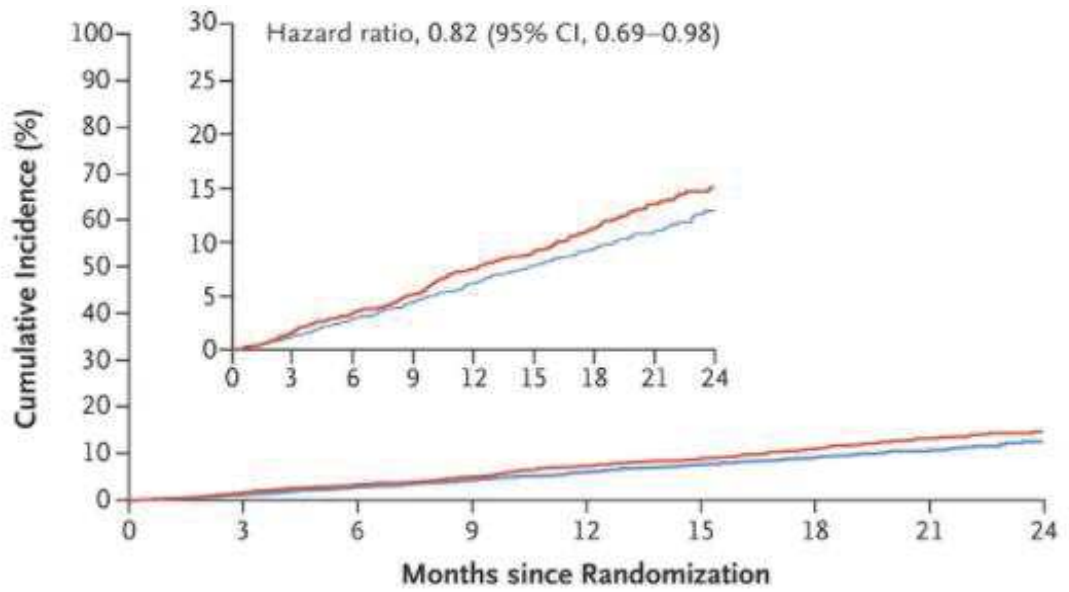
Dans l'ensemble des trois études cliniques, les seules constantes ont été une réduction de la mortalité d'origine CV ainsi qu'une diminution des hospitalisations pour insuffisance

cardiaque. Ainsi, de très récentes études ont testé l'effet de classe des gliflozines sur des patients atteints d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite (HFrEF).

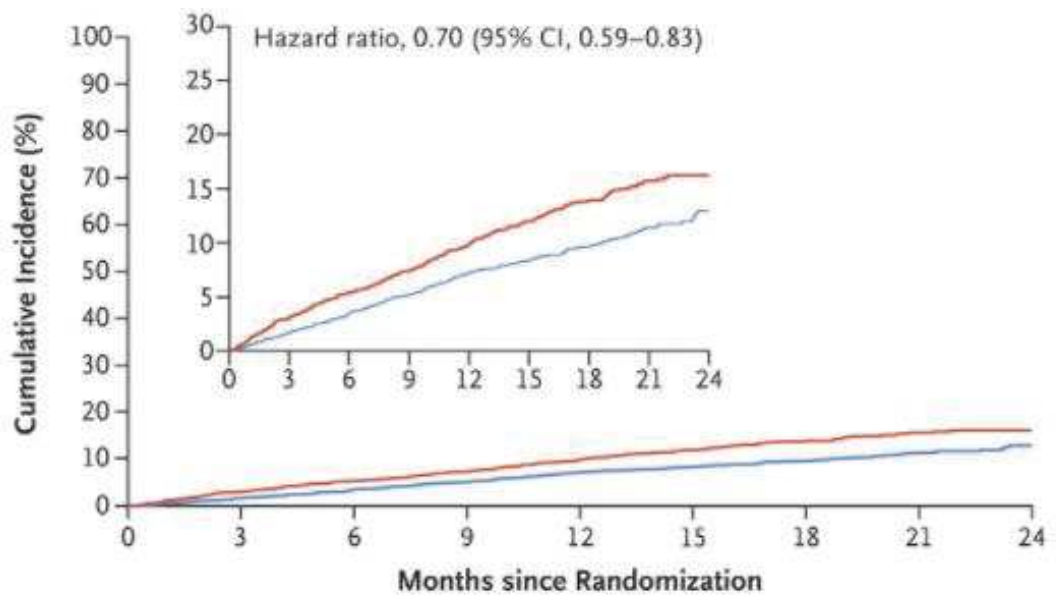
L'étude DAPA-HF a inclus 4744 patients présentant une IC avec une fraction d'éjection inférieure ou égale à 40% et a testé l'effet de 10 mg de dapagliflozine sur un critère composite incluant l'aggravation de l'IC et la mortalité d'origine CV. Les investigateurs de l'étude ont montré que le risque d'aggravation de l'IC et que la mortalité d'origine CV sont significativement abaissés dans le bras traité par la dapagliflozine (HR 0.70; 95% CI, 0.59 to 0.83) (HR 0.82; 95% CI, 0.69 to 0.98) respectivement (McMurray et al., 2019) (**Figure 9**). Les auteurs notent également que ces constats sont indépendants de la présence ou de l'absence de DT2 chez les patients. Cette observation confirme les conclusions d'Inzucchi et collègues qui précisent que la protection CV des patients DT2 atteints de pathologies CV est indépendante du contrôle glycémique des gliflozines (Inzucchi et al., 2018). En 2020, l'étude EMPEROR, testant l'empagliflozine, a délivré ses conclusions qui montrent une réduction de 25 % du risque relatif de mortalité CV ou d'hospitalisation pour IC chez des patients présentant une HFrEF avec ou sans DT2 (Packer et al., 2020) (**Figure 10**). D'autres résultats issus de l'étude VERTIS CV testant l'ertugliflozine ont montré que chez les patients DT2 ou avec une pathologie athérosclérotique, l'ertugliflozine réduisait le risque de primo-hospitalisation ou de nouvelle hospitalisation pour IC de 30 % avec une efficacité accrue chez les patients HFrEF avec une FE \leq 45 % (Cannon et al., 2020; Cosentino et al., 2020).

L'ensemble de ces études cliniques de grande ampleur a montré une protection importante des gliflozines contre les événements CV avec une constante qui réside dans la réduction de la mortalité d'origine CV et la réduction des hospitalisations pour IC. Malgré le nombre important d'hypothèses, les mécanismes à l'origine de la protection CV des gliflozines demeurent mal connus. Dans la partie qui suit nous détaillerons les diverses

hypothèses qui ont été émises en distinguant celles qui sont d'ores et déjà validées chez l'Homme de celles qui font encore l'objet de nombreuses investigations précliniques et cliniques.






No. at Risk									
Placebo	2371	2330	2279	2230	2091	1636	1219	664	234
Dapagliflozin	2373	2339	2293	2248	2127	1664	1242	671	232



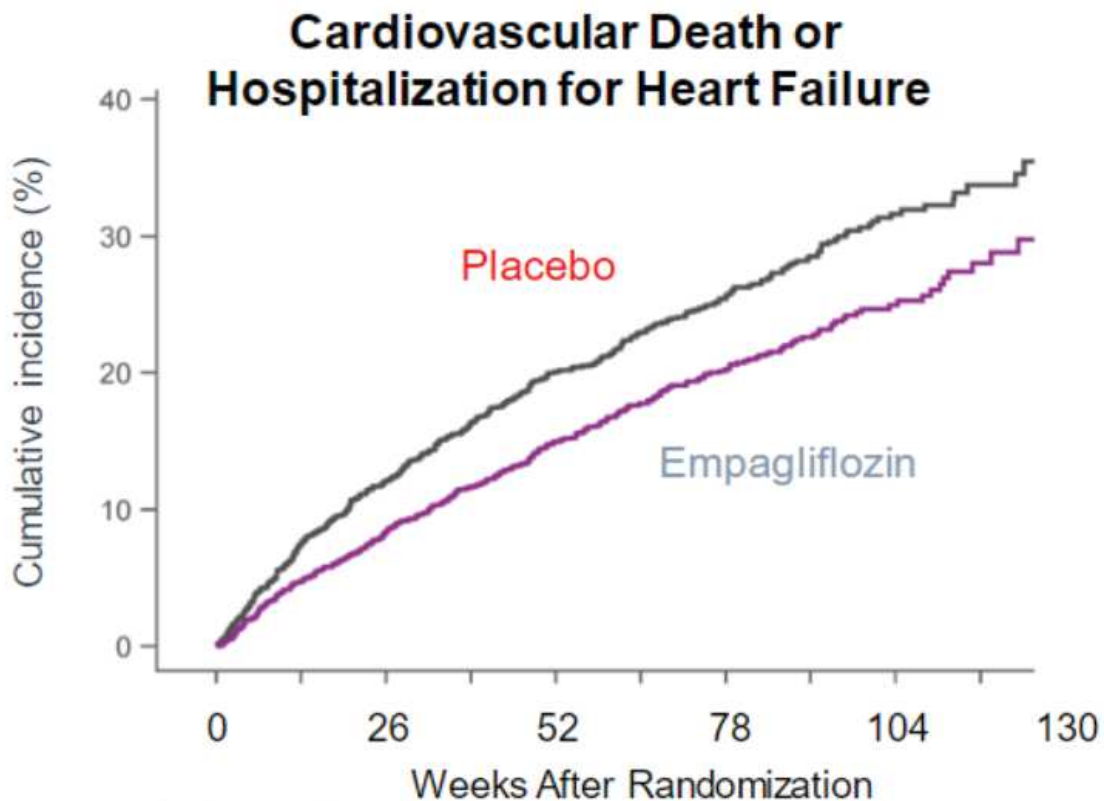
No. at Risk									
Placebo	2371	2264	2168	2082	1924	1483	1101	596	212
Dapagliflozin	2373	2306	2223	2153	2007	1563	1147	613	210

Figure 9. Effets CV de l'étude DAPA-HF (McMurray et al., 2019).

SGLT2 Inhibition With Empagliflozin Is Effective in Heart Failure With a Reduced Ejection Fraction With or Without Diabetes

	Primary Endpoint Composite of cardiovascular death or heart failure hospitalization	25% ↓ in risk P < 0.001
	First Secondary Endpoint Total (first and recurrent heart failure hospitalizations)	30% ↓ in risk P < 0.001
	Second Secondary Endpoint Slope of decline in glomerular filtration rate over time	P < 0.001 (50% ↓ in renal events)

Also achieved success on composite renal endpoint, KCCQ clinical summary score, and total number of hospitalizations for any reason (all nominal P < 0.01)



Hazard ratio 0.75 (25% reduction in risk)
 (95% CI 0.65, 0.86), P < 0.0001

Figure 10. Effets CV de l'étude EMPEROR (Packer et al., 2020).

1.5 Mécanismes établis et hypothétiques de la protection cardiovasculaire des gliflozines

Le **Tableau 3** présente les hypothèses les plus plausibles pouvant expliquer la protection CV des gliflozines.

Tableau 3. Mécanismes potentiels de protection CV des gliflozines (Bonora et al., 2020).

Action	Putative Mechanism	Source of the Evidence
Blood pressure reduction	Osmotic diuresis and Natriuresis Reduction of arterial stiffness Improved endothelial function	RCTs and CVOTs ^{10-13,47,52,53} Small human studies ⁹³⁻⁹⁵ Small human studies ^{94,96}
Body weight reduction	Increased glucose excretion	RCTs and CVOTs ^{10-13,47-49}
Uric acid reduction	Reduced urate reabsorption	RCTs and CVOTs ^{59,60}
Ketone bodies increase	Glucagon secretion and suppression of insulin production due to lower plasma glucose level Direct effect on alfa cells	Small human studies ⁶² Human alfa cells ⁶²
LDL and HDL cholesterol increase, triglycerides reduction	Increased lipoprotein lipase activity Accelerated clearance of VLDL Delayed turnover LDL	RCTs and CVOTs ^{10-13,77} Animal model (mice) ⁷⁸
Liver steatosis amelioration	Reduction of liver fat content Reduction in hepatocyte injury biomarkers (AST, ALT, GGT)	Small human studies ⁸¹⁻⁸⁴ Large RCTs ^{85,86}
Hematocrit increase	Reduction in plasma volume Increase in erythropoietin	RCTs and CVOTs ^{87,89} Small RCTs ⁸⁸
Cytoplasmic sodium and calcium concentration decreased, mitochondrial calcium concentration increased	Na ⁺ /H ⁺ exchange inhibition	Animal models (rabbits, rats and mice) ^{98,101}
Cardiac fibrosis reduction	Reduction of oxidative stress M2 macrophage polarization Reduction of TGF-β	Animal models (rats and mice) ^{105,106}
Epicaudal adipose tissue volume reduction	Weight loss? Unknown mechanism	Small human study ¹⁰⁸
Oxidative stress reduction	Decrease in NADPH oxidase activity Lowering AGEs generation Improving mitochondrial function Improvement of glycemic control	Animal models (mice, rats) ⁷⁰⁻⁷⁵
Lowering proinflammatory cytokine expression	Improvement of glycemic control Weight loss Decrease in reactive oxygen species production	Animal models, RCTs ^{70,72,76}
Arterial stiffness reduction	Weight loss Improvement of glycemic control Oxidative stress reduction Direct effects on vascular smooth muscle relaxation?	Small human studies ⁹³⁻⁹⁵
Endothelial dysfunction amelioration	Oxidative stress reduction Glucotoxicity reduction Direct effect on endothelium?	Small human studies ^{94,96}

1.5.1 Réduction de la pression artérielle

Au sein du tubule proximal du rein, la réabsorption de glucose est couplée au sodium. L'inhibition de SGLT2 résulte en une élévation de la natriurèse provoquant à son tour une diurèse osmotique. Un abaissement du volume plasmatique et du volume extracellulaire diminuera ainsi la pression hydrostatique sanguine et donc la PA. Plusieurs études ont retenu une réduction de 5 à 6 mmHg pour la pression artérielle systolique (PAS) et 1 à 2 mmHg pour la pression artérielle diastolique (PAD) (Heerspink et al., 2016; Neal et al., 2017; Wiviott et al., 2019; Zinman et al., 2015). Ces effets ont été observés pour l'ensemble des inhibiteurs de SGLT2 qu'ils soient comparés au placebo ou bien à d'autres thérapeutiques antidiabétiques même chez des patients déjà sous antihypertenseurs (Bolinder et al., 2012; Fadini et al., 2017; Fadini et al., 2019; Weber et al., 2016). De plus, les inhibiteurs de SGLT2 réduisent la PA sans activer le système nerveux sympathique et sans augmenter le rythme cardiaque contrairement aux analogues de GLP-1 (Robinson et al., 2013). La réduction de la précharge et de la postcharge conduit à une réduction du travail cardiaque et de la demande myocardique en oxygène ce qui améliore la fonction du ventricule gauche (VG). Cependant, la baisse de PA étant relativement modeste, elle ne peut pas expliquer à elle seule l'amélioration significative de la fonction CV. En effet, Whelton et al. ont montré qu'une réduction de la PAS de 5 mm Hg correspond à une diminution de la mortalité de seulement 7% et à une réduction du risque d'AVC de 14% (Whelton et al., 2002). De plus, la baisse de PA est souvent associée à une réduction d'événements d'origine macro vasculaire (AVC, IDM...) ce qui n'a pas été observé pour tous les inhibiteurs de SGLT2.

1.5.2 Perte de poids

Les inhibiteurs de SGLT2 s'appuient sur une élimination de glucose urinaire de l'ordre de 60 à 80 g par jour ce qui correspond à une perte énergétique de 240 à 320 calories par jour.

La perte moyenne s'établit autour de 2 à 4 kg de poids corporel quelle que soit l'inhibiteur testé. Il est intéressant de noter que des études d'absorptiométrie biphotonique à rayons X ont montré que 60 à 70% de la perte de poids correspond à de la masse grasse (Bolinder et al., 2012). D'autres études utilisant d'autres méthodes telles l'imagerie par résonance magnétique (IRM), montrent que la dapagliflozine réduit de manière équivalente le tissu adipeux sous-cutané et la graisse viscérale (Fadini et al., 2017). De plus, Ferrannini et al. ont montré que la perte de poids intervient lors des premières semaines de traitement puis se stabilise malgré une perte continue de glucose urinaire (Ferrannini et al., 2015).

1.5.3 Réduction de l'acide urique plasmatique

Les inhibiteurs de SGLT2 augmentent l'excrétion urinaire d'acide urique ce qui revient à abaisser l'uricémie. L'augmentation de l'excrétion urinaire correspond à un phénomène de compétition entre le glucose et les urates pour le transporteur GLUT9b ce qui diminue la réabsorption des urates au niveau du tube contourné proximal (Chino et al., 2014). Or l'hyperuricémie est associée à un risque accru d'hypertension, de pathologies CV et d'insuffisance rénale (Feig et al., 2008). Ainsi, la réduction de l'uricémie peut participer à la protection CV des gliflozines.

1.5.4 Modification du profil lipidique

Les effets des gliflozines sur le bilan lipidique sont sujets à hétérogénéité selon l'inhibiteur utilisé ainsi que selon le profil des patients inclus ou des modèles animaux utilisés. Néanmoins, il est fréquent d'observer une baisse significative des triglycérides ainsi qu'une légère hausse du cholestérol HDL (Storgaard et al., 2016). Ces effets bénéfiques sont en revanche, accompagnés d'une élévation du LDL cholestérol chez les patients DT2

essentiellement (Zinman et al., 2015). Une étude récente menée au sein de notre laboratoire a montré une réduction importante de la triglycéridémie ainsi que du cholestérol total mais pas d'effets significatifs sur ses différentes fractions chez un modèle de rat obèse avec syndrome métabolique (rat ZSF1) traité à l'empagliflozine (Park et al., 2020). La modification du profil lipidique apparaît comme un effet d'ampleur insuffisante pour constituer une explication majeure de la protection CV des gliflozines.

1.5.5 Amélioration de la stéatose hépatique

Le syndrome métabolique est fréquemment associé à une stéatopathie non alcoolique (STNA) qui elle-même contribue à la physiopathologie du DT2 en modulant la résistance à l'insuline, l'inflammation et les risques CV (Lonardo et al., 2018; Targher et Bonora, 2010). Quelques études cliniques ont montré que les inhibiteurs de SGLT2 permettent de réduire la stéatose hépatique et améliorent les marqueurs biologiques de la STNA chez les patients DT2 (Eriksson et al., 2018). L'étude conduite sur les rats ZSF1 a montré un effet mineur de l'empagliflozine sur l'aspartate aminotransférase (ASAT) et sur l'alanine aminotransférase (ALAT) (Park et al., 2020). Eriksson a montré, quant à lui, un abaissement significatif des ASAT, ALAT et de la gamma-glutamyl transférase (GGT) avec la dapagliflozine. Une seconde étude menée sur 50 patients DT2 a montré des résultats similaires avec l'empagliflozine pour l'ALAT avec cependant une réduction bien plus importante de la masse grasse hépatique et un effet neutre sur l'ASAT et la GGT (Kuchay et al., 2018). Les données provenant d'études de plus grande ampleur montrent que l'utilisation des inhibiteurs de SGLT2 est associée à une amélioration significative des marqueurs hépatiques ALAT, ASAT et GGT (Leiter et al., 2016; Sattar et al., 2018).

Les hypothèses qui sont présentées ci-dessous ne présentent pas de caractère avéré car les effets ont été soit observés chez des modèles animaux ou bien dans des études cliniques rassemblant un effectif faible. Elles font cependant l'objet d'investigations de plus en plus précises.

1.5.6 Elévation des corps cétoniques

Lors du traitement avec les inhibiteurs de SGLT2, la baisse de la glycémie engendrée par la glycosurie entraîne une modification du métabolisme cellulaire tendant à utiliser davantage les acides gras pour assurer leur production énergétique. L'oxydation des lipides associée à une réduction de l'oxydation du glucose est favorable à une production de corps cétoniques. De plus, l'augmentation du rapport glucagon/insuline promeut la cétogénèse (Ferrannini et al., 2016). Il est également intéressant de noter que le rendement énergétique de la cétogénèse est supérieur à l'oxydation du glucose ou des acides gras ce qui en fait une source d'énergie particulièrement intéressante pour le myocarde. En effet, une augmentation de la production de corps cétoniques peut expliquer en partie, l'effet de réduction de la mortalité d'origine CV ou de l'IC des gliflozines. Par ailleurs, il faut mettre en perspective l'effet protecteur cardiaque des corps cétoniques, de la complication majeure qu'ils peuvent occasionner chez les patients diabétiques, à savoir l'acidocétose diabétique (Bonora et al., 2018). Cet effet a été particulièrement observé chez les patients DT1, ce qui a conduit l'EMA à ne pas autoriser les inhibiteurs de SGLT2 chez les patients DT1 et à formuler, en 2016, des recommandations afin de minimiser les risques d'acidocétose chez les patients DT2 sous inhibiteurs de SGLT2.

1.5.7 Effets sur l'échangeur Na^+/H^+

L'échangeur Na^+/H^+ (NHE) permet l'entrée d'un ion Na^+ au sein des cellules contre la sortie d'un ion H^+ sans utilisation d'adénosine triphosphate (ATP) mais grâce au gradient électrochimique fourni par le Na^+ . La famille des NHE qui comporte dix isoformes joue un rôle fondamental dans la régulation du pH intracellulaire ainsi que du volume cellulaire (Vallés et al., 2015). Des études récentes ont montré que la surexpression de la NHE et ainsi, l'augmentation du Na^+ intracellulaire ($[\text{Na}^+]_i$), contribue à l'IC ainsi qu'au stress oxydant (Sox) au sein des cœurs diabétiques (Darmellah et al., 2007; Lambert et al., 2015). De plus, des études expérimentales ont révélé que les inhibiteurs de SGLT2 inhibent la NHE_1 au sein des cellules myocardiques (Baartscheer et al., 2017; Uthman et al., 2018) (**Figure 11**). En effet, Baartscheer et collègues ont isolé des cardiomyocytes à partir de cœurs de rats et de lapins puis ont mesuré l'activité de la NHE_1 ainsi que les concentrations de Na^+ et de Ca^{2+} . Le traitement avec l'empagliflozine inhibe la NHE réduisant ainsi la concentration cytoplasmique de Na^+ et de Ca^{2+} tout en augmentant le niveau de Ca^{2+} mitochondrial. Lorsque le traitement avec l'empagliflozine est couplé à un inhibiteur de la NHE, le cariporide, l'ensemble des effets a été accru suggérant une inhibition directe de la NHE par l'empagliflozine. Une autre étude portant sur des cardiomyocytes murins a mis en évidence des observations similaires avec la dapagliflozine et la canagliflozine suggérant un effet de classe des gliflozines (Uthman et al., 2018). Il est également intéressant de noter que SGLT2 n'est pas exprimé par les cardiomyocytes humains rendant ainsi les mécanismes fort complexes à interpréter.

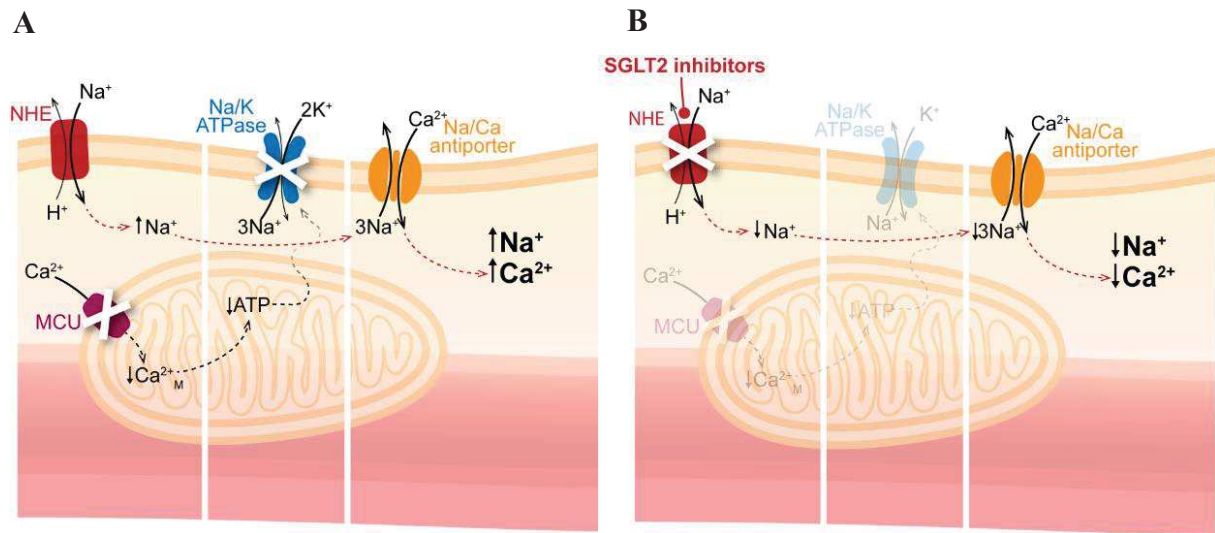


Figure 11. (A) Conséquences de la surexpression de la NHE due à l'IC diabétique sur le signal calcique et sodique. (B) Réduction des concentrations calciques et sodiques par les inhibiteurs de SGLT2 menant ainsi à une protection cardiaque (Verma et al., 2018).

1.5.8 Inhibition des transporteurs SGLTs

Le transporteur SGLT2 a été mis en évidence depuis plusieurs décennies au sein des cellules épithéliales rénales du tube contourné proximal (TCP). En revanche, SGLT2 n'a pas été mis en évidence au sein du tissu cardiaque sain ni dans le cœur hypertrophique chez l'homme (Di Franco et al., 2017). Cependant, une étude très récente réalisée chez des souris ayant subi une ligation de l'artère descendante antérieure gauche – modèle d'infarctus du myocarde – a mis en évidence 24 h après l'infarctus, l'apparition de la protéine SGLT2 dans le tissu cardiaque infarci, dont l'expression ne cesse d'augmenter jusqu'à 72 h après l'IDM (Lee et al., 2020). Il est à noter que 6 h après l'IDM, la protéine SGLT2 n'était pas détectable. De plus, 28 jours après l'IDM, la protéine SGLT2 n'était plus exprimée par le tissu (Lee et al., 2020). Un prétraitement avec l'empagliflozine a permis de réduire l'expression de SGLT2 ainsi que de diminuer la consommation de glucose des cellules. Ces résultats discordants pourraient s'expliquer par le fait que la cardiomyopathie ischémique expérimentée par Di Franco et collègues, correspond à une altération chronique du tissu et soit équivalent au jour

28 des travaux de Lee et collègues. Les auteurs ont identifié des modulateurs potentiels de SGLT2 tels que HIF-1 α , TGF- β 1 et p-SMAD3. En effet, leur augmentation à la suite de l'IDM a été fortement réduite avec un prétraitement avec l'empagliflozine.

Des faisceaux de preuves évoquent également l'expression de SGLT2 au sein des cellules endothéliales (CEs). En effet, une étude a montré que SGLT1 et 2 sont exprimés par les cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) et que leur activation par l'acide palmitique (AP) augmentait significativement leurs expressions (Li et al., 2018). Le traitement avec la phlorizine a amélioré la dysfonction endothéliale ainsi que la résistance à l'insuline en activant la voie de signalisation PI3K/AKT/eNOS, augmentant ainsi la libération de monoxyde d'azote (NO) ainsi que la consommation de glucose au sein des cellules. L'utilisation d'un siRNA dirigé spécifiquement contre SGLT2 conduit au même type de résultat suggérant que l'effet bénéfique de la phlorizine est vraisemblablement lié à SGLT1 et 2.

Le transporteur SGLT1 est, en revanche, exprimé à l'état basal par le tissu cardiaque et est exprimé dix fois plus qu'au sein des cellules rénales (Zhou et al., 2003). Banerjee et collègues ont montré une expression de SGLT1 au sein du sarcolemme des cardiomyocytes (Banerjee et al., 2009). Ils ont également identifié une surexpression de SGLT1 de l'ordre de trois fois au sein de cardiomyocytes murins dans un contexte de DT2 ou d'ischémie myocardique. Chez l'homme, une augmentation d'un facteur deux a été observée dans des tissus provenant de patients en IC sévère par rapport à des tissus sains. Ils ont également identifié l'effet stimulateur de l'insuline et de la leptine sur l'expression de l'ARNm de SGLT1. Le mécanisme proposé serait une phosphorylation de la PKC par l'insuline qui phosphoryle à son tour SGLT1 permettant ainsi son recrutement à la membrane plasmique (Hirsch et al., 1996; Turk et al., 1996; Wright et al., 1997). De plus, un travail de recherche a

confirmé l'expression de SGLT1 au sein du tissu cardiaque humain et au sein de cœurs perfusés de souris (Kashiwagi et al., 2015). Ce travail a également testé l'effet de la phlorizine sur la fonction cardiaque ainsi que sa réponse sur l'ischémie-reperfusion à partir d'un système de Langendorff murin. La perfusion de phlorizine a altéré la récupération contractile du VG pendant l'ischémie qui est associée à une zone infarctée plus étendue. L'explication avancée est une réduction de la captation du glucose associée à une réduction du contenu en ATP dans les cellules cardiaques (Kashiwagi et al., 2015). Ceci montre un rôle probable de SGLT1 dans l'optimisation du métabolisme énergétique cardiaque dans des conditions pathologiques spécifiques.

1.5.9 Amélioration de la dysfonction endothéliale et de la rigidité vasculaire

Il est clairement établi que la rigidité vasculaire est un robuste facteur prédictif des événements CV ainsi que de la mortalité d'origine CV (Vlachopoulos et al., 2010a). La dysfonction endothéliale constitue un événement précoce du phénomène athérosclérotique qui, lui-même, contribue fortement au développement des pathologies rénales et CV (Anderson et al., 1995; Kinlay et Ganz, 1997; Zhang et al., 2017). Ainsi, ces deux facteurs sont pertinents dans la détermination du risque CV (Anderson et al., 2006).

De nombreuses études précliniques ont mis en évidence l'effet bénéfique des inhibiteurs de SGLT2 sur la fonction endothéliale dans des modèles diabétiques. Oelze et collègues ont montré chez des rats traités à la streptozotocine que le traitement avec l'empagliflozine normalisait la fonction endothéliale – mesurée par le pourcentage de relaxation en réponse à l'acétylcholine – de l'aorte par rapport aux rats diabétiques, et réduisait le Sox vasculaire (Oelze et al., 2014). Une autre étude récente a confirmé le rôle protecteur de l'ipragliflozine sur la fonction endothéliale dans un modèle de souris

diabétiques induit par la streptozotocine (Fukuda and Sata, 2016). Il est intéressant de noter que dans ces deux études, la relaxation indépendante de l'endothélium en réponse au nitroprussiate de sodium (SNP) n'a pas été affectée ni par le diabète ni par les inhibiteurs de SGLT2. D'autres travaux ont été menés sur des modèles de DT2. Une étude de 2018 ayant testé la dapagliflozine sur des souris obèses db/db, met en évidence une réduction de la rigidité vasculaire au niveau de l'aorte abdominale et de la crosse aortique ainsi qu'une amélioration de la fonction endothéliale en réponse à l'acétylcholine au niveau des artères mésentériques de second ordre par rapport aux souris obèses non traitées (Lee et al., 2018). Les travaux de notre équipe de recherche ont permis de dégager la même conclusion au sein d'un modèle de syndrome métabolique de rat (rat ZSF1). En effet, le traitement avec l'empagliflozine a permis d'améliorer les relaxations dépendantes de l'endothélium ainsi que de diminuer les réponses contractiles dépendantes de l'endothélium au sein de l'artère mésentérique principale (Park et al., 2020). De façon plus fine, cette étude a pointé l'importance de la voie des cyclooxygénases dans les phénomènes contractiles en réponse à l'acétylcholine et le rôle crucial de la voie du NO dans les relaxations dépendantes de l'endothélium chez les rats ZSF1.

Quelques études ont ensuite mis en évidence une réduction significative de la rigidité vasculaire ainsi qu'une amélioration de la fonction endothéliale après traitement aigu ou chronique avec des inhibiteurs de SGLT2. Un essai clinique incluant 40 patients DT1 a permis de montrer que l'empagliflozine a fortement réduit la vitesse d'onde de pouls (VOP) radiale de la carotide ainsi que l'indice d'augmentation radial témoignant d'une moindre rigidité vasculaire (Cherney et al., 2014). De plus, une autre étude a montré l'amélioration de la dilatation liée au flux (FMD) de l'artère brachiale accompagnée d'une protection contre la rigidité vasculaire après traitement aigu (2 jours) avec la dapagliflozine chez 16 patients DT2

(Solini et al., 2017). Les auteurs précisent que l'effet observé sur la FMD est indépendant des variations de PA. De la même manière, Ramirez et collègues ont comparé l'effet de la canagliflozine avec l'effet du péridopril sur la PA et la VOP (mesurée à la carotide fémorale) chez 30 patients DT2 et hypertendus traité avec l'amlodipine. Après six mois de traitement, les deux molécules ont significativement réduit la PA et la VOP mais seule la canagliflozine a maintenu l'effet de diminution de la VOP après ajustement des PA (Ramirez et al., 2019). Une étude japonaise a comparé un groupe de patients DT2 traité avec la metformine avec un autre groupe de patients DT2 traité avec la metformine et la dapagliflozine durant 16 semaines (Shigiyama et al., 2017). La dapagliflozine a montré une amélioration plus nette de la FMD chez les patients ayant une HbA1c > 7 % par rapport au traitement avec la seule metformine, et surtout une importante réduction du Sox dans le groupe traité avec la dapagliflozine pouvant ainsi partiellement expliquer la plus forte amélioration de la FMD avec la dapagliflozine. Contrastant avec les précédentes, une récente étude japonaise, incluant 105 patients DT2 présentant au moins une pathologie CV, n'est pas parvenue à mettre en évidence une amélioration de l'index d'hyperémie réactionnelle avec l'empagliflozine au sein de cette population (Tanaka et al., 2019).

En conclusion, l'amélioration de la fonction endothéliale est fréquemment retrouvée après traitement avec les inhibiteurs de SGLT2, mais les mécanismes contribuant à ces observations demeurent très peu connus. Des études réalisées au sein de notre groupe seront détaillées dans la partie discussion générale.

1.5.10 Réduction de la fibrose cardiaque

La fibrose myocardique est un processus contribuant à l'altération de la fonction de contraction cardiaque et à la dysfonction ventriculaire gauche qui, toutes les deux, mènent au

développement de l'IC (Kong et al., 2014). Une étude conduite chez des rats sains Wistar ayant subi une ligature de l'artère coronaire antérieure descendante (modèle d'IDM), a montré une réduction de la fibrose du VG après traitement avec la dapagliflozine (Lee et al., 2017). Cet effet sur la fibrose est associé à une diminution de la production de superoxyde et de nitrotyrosine au sein du tissu myocardique, à une réduction des myofibroblastes ainsi qu'à un effet stimulateur sur les macrophages de type anti-inflammatoires M2 dans la zone infarctée. De plus, cette étude nous livre quelques éléments mécanistiques qui impliquent la génération d'EROs ainsi que l'activateur et le transducteur de signal de la transcription 3 (STAT3) dans l'effet protecteur de la dapagliflozine. En effet, l'utilisation de la 3-morpholinopyridone (génératrice de peroxynitrite), et de S3I-201 (un inhibiteur de STAT3) abolissent de façon complète le bénéfice cardiaque de la dapagliflozine. Un autre travail de recherche mené sur 30 souris diabétiques KK-Ay, montre que l'empagliflozine a réduit la fibrose cardiaque en diminuant l'expression du transforming growth factor β (TGF- β), du collagène I et du collagène III par rapport aux souris diabétiques non traitées suggérant l'implication de la voie de signalisation Smad (Li et al., 2019). De plus, la baisse observée du Sox provient de l'activation de la translocation de Nrf2 dans le noyau et ainsi, de la stimulation de la voie de signalisation Nrf2/ARE. Encore plus récemment, une étude a évalué l'effet de l'empagliflozine sur la fonction diastolique et sur la fibrose et la rigidité cardiaque dans un modèle de porc normo glycémique avec HF_rEF (Santos-Gallego et al., 2021). Les porcs ont subi une occlusion de l'artère coronaire antérieure descendante gauche à l'aide d'un ballon d'angioplastie pendant 2 h puis ont été divisés en deux groupes : l'un recevant un placebo et l'autre traité avec l'empagliflozine pendant deux mois. Malgré une lésion ischémique de taille similaire au début de l'étude, l'empagliflozine a montré une réduction significative de la fibrose interstitielle du myocarde par des techniques histologiques, moléculaires et

d'imagerie. De plus, l'empagliflozine a réduit le Sox cardiaque, a augmenté l'activité de la eNOS, la biodisponibilité du NO, le contenu en guanosine monophosphate cyclique (GMPc), l'activité de la protéine kinase G (PKG) et a également augmenté la phosphorylation de la titine. Ces effets démontrent une réduction de la rigidité cardiaque, qui, combinée à la diminution de la fibrose myocardique, permet d'expliquer l'amélioration de la fonction diastolique.

1.5.11 Amélioration de la fonction ventriculaire gauche

Le DT2 est fréquemment associé à un risque accru d'IC, que ce soit une HFrEF ou une HFpEF (Bouthoorn et al., 2018; McMurray et al., 2014). L'HFpEF est définie par la Société Européenne de Cardiologie (ESC) à l'aide de quatre critères cumulatifs dont des symptômes cliniques d'IC, une fraction d'éjection (FE) du VG $\geq 50\%$, une élévation de la concentration des peptides natriurétiques et un remodelage cardiaque ou une dysfonction diastolique du VG (Ponikowski et al., 2016). Les altérations structurelles déterminées par échocardiographie mettent en évidence une augmentation de la masse du VG, une augmentation de la vitesse de l'onde E ou une réduction de la vitesse de l'onde e' d'où un rapport E/e' augmenté, ainsi qu'une plus grande vitesse de régurgitation tricuspide. De plus, la dysfonction diastolique seule, constitue un facteur causal majeur de HFpEF qui est elle aussi souvent retrouvée chez les sujets diabétiques (Bouthoorn et al., 2018; From Aaron M. et al., 2010). On peut donc supposer que de nombreux patients diabétiques inclus dans les essais cliniques présentaient une dysfonction diastolique du VG non diagnostiquée ou bien en phase non clinique. Les effets majeurs de réduction des hospitalisations pour IC observés dans les études cliniques testant les inhibiteurs de SGLT2 décrites précédemment, suggèrent un rôle des gliflozines sur l'hémodynamie du VG ou précharge cardiaque (diurèse, natriurèse, glycosurie, pression intraglomérulaire) en conjonction avec une diminution de la postcharge cardiaque (résistances

périphériques telles que la rigidité vasculaire, la fonction endothéliale...) (Lan et al., 2019; Sattar et al., 2016).

Quelques études réalisées sur des souris obèses et diabétiques ou avec une dysfonction diastolique ont montré l'effet protecteur de la fonction du VG de l'empagliflozine (Habibi et al., 2017; Hammoudi et al., 2017). Ces deux études ont mis en évidence une altération de la fonction diastolique, une fibrose et une apoptose cardiaque accrue, une hypertrophie des cardiomyocytes et une altération de la fonction de contraction cardiaque (faible phosphorylation du phospholambane qui inhibe ainsi la principale pompe calcique du réticulum sarcoplasmique – SERCA2a et diminue la force de contraction cardiaque), chez les souris obèses db/db et ob/ob. L'ensemble de ces effets ont été restaurés au moins en partie par l'empagliflozine. Il est intéressant de noter que la fonction systolique et la PA n'ont pas été affectées par le traitement. En revanche, l'administration de dapagliflozine à des souris diabétiques non-obèses présentant une dysfonction diastolique accompagnée d'une cardiomyopathie hypertrophique, a permis de prévenir l'hypertrophie cardiaque et a amélioré à la fois la fonction diastolique mais également la fonction systolique (Joubert et al., 2017). Les auteurs mettent en exergue la réduction des niveaux de résidus N-Acétyleglucosamine sur les protéines (produit majeur de la voie des hexosamines) par l'inhibition du captage du glucose par les cardiomyocytes induit par la dapagliflozine. Une équipe canadienne a par la suite étudié les effets de l'empagliflozine sur des modèles de souris non diabétiques avec HFpEF, et ont montré une réduction de l'hypertrophie cardiaque, de la masse du VG, et une amélioration de la fonction diastolique du VG (par un abaissement de tau) sans affecter la PAS ni les marqueurs de fibrose cardiaque (Connelly et al., 2019; Desjardins et al., 2017) **(Figure 12)**.

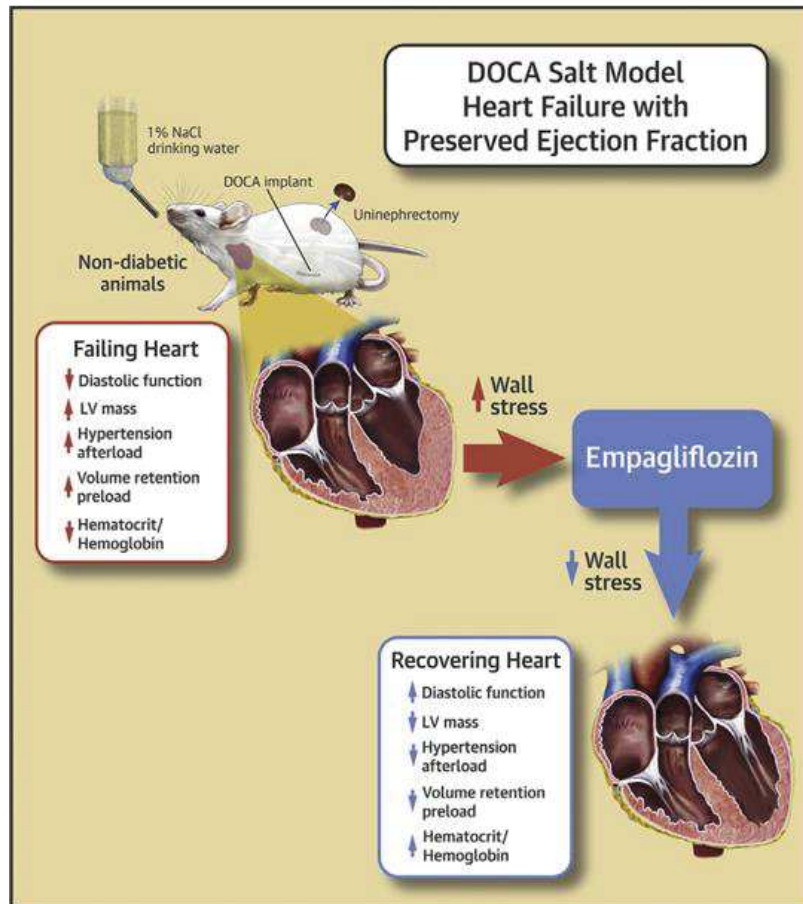


Figure 12. Effets CV d'un modèle de HFpEF et protection de l'empagliflozine (Connelly et al., 2019).

Les effets ciblés des gliflozines sur la fonction diastolique ont été confirmés sur des cultures d'explants de cœurs de patients avec une HFrEF terminale ainsi que sur des souris (db/db) et des rats diabétiques (ZDF) (Pabel et al., 2018). En effet, l'empagliflozine a réduit la force diastolique mais n'a pas affecté la force systolique dans l'ensemble des modèles. Les mécanismes mis en évidence par les auteurs consistent en l'amélioration de la fonction des myofilaments par phosphorylation accrue des protéines de régulation (troponine I, titine, protéine de liaison à la myosine C...) ce qui diminue la rigidité diastolique des myofilaments. Il est à noter qu'aucun changement du signal calcique en diastole n'a été détecté par le traitement avec l'empagliflozine.

En parallèle des études sur modèles animaux, quelques travaux de recherche ont été menés sur des patients DT2 présentant soit des antécédents de pathologies CV soit une HFrEF ou une HFpEF (**Tableau 4**). Une étude de faible ampleur a montré une amélioration de la fonction diastolique par augmentation de l'onde e' des patients DT2 traités avec l'empagliflozine, ainsi qu'une réduction de la masse du VG (Verma et al., 2016). Un travail similaire, plus exhaustif dans les paramètres mesurés, testant la canagliflozine, a mis en évidence les mêmes résultats à savoir une amélioration de la fonction diastolique reflétée par une réduction du rapport E/e' septal et par une réduction de l'index de masse du VG (Matsutani et al., 2018). Une étude incluant des patients DT2 avec HFpEF et testant l'empagliflozine, la luséogliflozine et la tofogliflozine, a montré après trois mois de traitement, une FMD plus élevée, une diminution du rapport E/A, et une diminution du rapport E/e'(Takaaki et Shinichiro, 2017). Ces trois composés ont permis de protéger la fonction diastolique du VG et de réduire la dysfonction endothéliale des patients. Il est intéressant de noter qu'aucune de ces études n'a constaté un changement de la fonction systolique ou du volume du VG. Un seul travail, celui de Soga et collègues, a mis en évidence une augmentation modeste mais significative (1,3%), de la fraction d'éjection du VG en association avec une diminution du rapport E/e', de la masse du VG et de l'index du volume atrial gauche (LAVI) (Soga et al., 2018). Le niveau de BNP est demeuré inchangé malgré les six mois de traitement avec la dapagliflozine. L'ensemble des études décrites ci-dessus présentent de nombreuses limitations parmi lesquelles, l'utilisation d'une seule technique d'investigation (échocardiographie), une faible durée de suivi (trois à six mois), un très faible effectif de volontaires ainsi que l'absence de randomisation des essais.

Plus récemment, un essai randomisé contre placebo mené chez des patients DT2 avec des antécédents CV, l'étude EMPA-HEART, a montré une réduction significative de l'index de masse du VG après six mois de traitement avec l'empagliflozine (Verma et al., 2019). Les auteurs concluent que ce phénomène contribue au moins pour partie, aux bénéfices CV observés chez les patients DT2 traités avec les inhibiteurs de SGLT2. La même année, un nouvel essai utilisant également l'imagerie par résonance magnétique, n'a pas mis en évidence de modification de l'index de masse du VG chez les patients traités avec l'empagliflozine mais a observé une réduction du volume télédiastolique du VG (LVEDV) vraisemblablement due à une diminution de la volémie qui a été observée dans de nombreux essais cliniques dont l'étude EMPA-REG OUTCOME (Cohen et al., 2019).

Tableau 4. Etudes cliniques étudiant le rôle des inhibiteurs de SGLT2 sur la fonction du VG (Lan et al., 2019).

Author	SGLT2 inhibitor	Cohort	Imaging modality	Imaging findings
Verma S., et al.	Empagliflozin	10 people with T2DM and CVD	TTE before and 3 months after	<ul style="list-style-type: none"> • Improved LV diastolic function according to early lateral e' • Reduced LV mass index • No difference in LV volumes and LV EF
Matsutani D., et al.	Canagliflozin	37 people with T2DM and ≥ 2 CVD risk factors or CVD	TTE before and 3 months after	<ul style="list-style-type: none"> • Improved LV diastolic function according to the E/e' ratio • Reduced LV mass index • No difference in LV diameters, LV EF, and left atrial diameter
Soga F., et al.	Dapagliflozin	53 people with T2DM and stable HFrEF or HFpEF	TTE before and 6 months after	<ul style="list-style-type: none"> • Improved LV diastolic function according to the E/e' ratio • Reduced LV mass index and left atrial volume index • No difference in LV volumes • Improved LV EF • Improved LV diastolic function according to the E/A and E/e' ratios
Sakai T., et al. ^a	Empagliflozin Luseogliflozin Tofogliflozin	59 people with T2DM and HFpEF 63 people with T2DM and HFpEF 62 people with T2DM and HFpEF	TTE before and 3 months after	<ul style="list-style-type: none"> • Improved LV mass index • No difference in LV EF and LV end-systolic volume
Verma S., et al. ^a	Empagliflozin vs. placebo	97 people with T2DM and CVD (49 drug and 48 placebo)	Cardiac MRI before and 6 months after	<ul style="list-style-type: none"> • Improved LV mass index • No difference in LV EF and LV end-systolic volume
Cohen N., et al.	Empagliflozin vs. placebo	25 people with T2DM (17 drug and 8 placebo)	Cardiac MRI before and 6 months after	<ul style="list-style-type: none"> • Reduced LV end-diastolic volume • No difference in LV mass, LV EF, atrial volumes, and markers of cardiac fibrosis

A, mitral peak A-wave velocity; CVD, cardiovascular disease; E, mitral peak E-wave velocity; e', early annular tissue Doppler velocity; EF, ejection fraction; HFpEF, heart failure with preserved ejection fraction; HFrEF, heart failure with reduced ejection fraction; LV, left ventricular; MRI, magnetic resonance imaging; SGLT2, sodium-glucose cotransporter 2; T2DM, type 2 diabetes mellitus; TTE, transthoracic echocardiography.

^aPreliminary data obtained from abstract or conference presentation.

L'ensemble des études précédentes ont toutes recherché l'effet des gliflozines chez les patients DT2 avec des antécédents CV. Cependant, plusieurs travaux et essais cliniques ont montré une protection CV des inhibiteurs de SGLT2 chez des patients sans DT2 avec HFrEF ou HFpEF (McMurray et al., 2019; Packer et al., 2020). Très récemment, une étude rassemblant 84 patients, a permis de tester les effets de l'empagliflozine sur le LVEDV, le volume télésystolique du VG (LVESV), la masse du VG, la FE du VG ainsi que sur la qualité de vie chez des patients avec HFrEF (Kansas city cardiomyopathy questionnaire) (Santos-Gallego Carlos et al., 2021) (**Tableau 5**). Le traitement avec l'empagliflozine a amélioré les volumes du VG, la masse du VG, la fonction systolique ainsi que la qualité de vie globale, démontrant que la protection CV des inhibiteurs de SGLT2 se fait indépendamment de leur

effet sur la régulation glycémique et que le traitement de patients avec HFrEF ou HFpEF devient de plus en plus pertinent.

Tableau 5. Etudes les plus récentes sur l'effet des inhibiteurs de SGLT2 sur la fonction du VG (Lan et al., 2019).

Study name	SGLT2 inhibitor	Anticipated cohort	Imaging modality	Imaging outcome	Estimated end date
Research Into the Effect of SGLT2 Inhibition on Left Ventricular Remodeling in Patients With Heart Failure and Diabetes Mellitus (REFORM) (NCT02397421)	Dapagliflozin vs. placebo	56 people with T2DM and HFrEF	Cardiac MRI before and 12 months after	Primary: Change in LV end-systolic and end-diastolic volumes Secondary: Change in LV mass and EF, RV volumes and EF, atrial size, and LV remodelling index	August 2017 (not reported)
Does Dapagliflozin Regress Left Ventricular Hypertrophy In Patients With Type 2 Diabetes? (DAPA-LVH) (NCT02956811)	Dapagliflozin vs. placebo	64 people with T2DM and LV hypertrophy	Cardiac MRI before and 12 months after	Primary: Change in LV mass Secondary: Change in LV diastolic function and global longitudinal strain	March 2019
Effects of Empagliflozin on Left Ventricular Diastolic Function Compared to Usual Care in Type 2 Diabetics (EmDia) (NCT02932436) EMPA-HEART trial ^a	Empagliflozin vs. placebo	158 people with T2DM and LV diastolic dysfunction (E/e' ratio \geq 8)	TTE before and 3 months after	Primary: Change in E/e' ratio Secondary: Change in LV EF and end-diastolic volume	June 2019
	Empagliflozin vs. sitagliptin	75 people with T2DM and subclinical LV dysfunction	TTE before and at 1 month and 6 months after	Primary: Change in global longitudinal strain Secondary: Change in EF, left atrial volume, and E/e' by 3-D TTE	July 2019
Are the "Cardiac Benefits" of Empagliflozin Independent of Its Hypoglycemic Activity? (ATRU-4) (EMPA-TROPISM) (NCT03485222)	Empagliflozin vs. placebo	80 people with T2DM and HFrEF	Cardiac MRI before and 6 months after	Primary: Change in LV end-systolic and end-diastolic volumes Secondary: Change in LV EF	December 2020
ERTugliflozin triAl in Diabetes With Preserved or Reduced ejection FrACtion mEchanistic Evaluation in Heart Failure (ERADICATE-HF) (NCT03416270)	Ertugliflozin vs. placebo	36 people with T2DM and HF	TTE before and at 1 week and 3 months after	Primary: N/A Secondary: Change in systolic and diastolic function	March 2021

3-D, three-dimensional; E, mitral peak E-wave velocity; e', early annular tissue Doppler velocity; EF, ejection fraction; HF, heart failure; HFrEF, heart failure with reduced ejection fraction; LV, left ventricular; MRI, magnetic resonance imaging; SGLT2, sodium-glucose cotransporter 2; T2DM, type 2 diabetes mellitus.

^aThere is another trial with a similar name.

1.5.12 Réduction du stress oxydant et de l'inflammation

Le Sox est impliqué dans le développement des complications du diabète mais joue un rôle important dans l'ensemble des pathologies CV, comme dans la progression du processus athérosclérotique (Förstermann et al., 2017; Giacco et Brownlee, 2010; Harrison et al., 2003; Man Son et al., 2004). Le déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et antioxydants

constitue ainsi un facteur prédictif majeur de dysfonction endothéliale notamment par une inhibition de la voie du NO dans un premier temps, pouvant mener par la suite à des complications vasculaires du diabète mais aussi à d'autres événements CV. Depuis quelques années, des travaux montrant l'effet de réduction du Sox des gliflozines et leur capacité à rééquilibrer la balance entre les adipokines et cytokines pro- ou anti-inflammatoires se multiplient. Une étude a rapporté qu'un traitement de douze semaines avec l'ipragliflozine chez des rats DT1 induits par la streptozotocine a significativement réduit le niveau des biomarqueurs du Sox hépatique (les substances réactives à l'acide thiobarbiturique – TBARs et les protéines carbonyles) et a abaissé les marqueurs inflammatoires plasmatiques (interleukine 6 – IL-6, le tumor necrosis factor – TNF α , la monocyte chemoattractant protein-1 – MCP-1 et la protéine C réactive – CRP) (Tahara et al., 2014). Un autre travail, également réalisé chez des rats DT1 induits par la streptozotocine, a confirmé la réduction du Sox vasculaire par l'empagliflozine et a mis en évidence l'implication de la NADPHox (Oelze et al., 2014). En effet, l'expression des enzymes Nox1 et Nox2 est significativement réduite chez les rats traités par l'empagliflozine par rapport aux rats DT1. Les auteurs ont proposé des éléments mécanistiques mettant en exergue le rôle majeur du stress oxydant, de la glucotoxicité, de l'inflammation et de la résistance à l'insuline dans la dysfonction endothéliale observée (**Figure 13**). L'ensemble de ces paramètres a été fortement réduit par l'utilisation de l'empagliflozine. La même année, Terami et collègues ont testé l'effet de la dapagliflozine sur le Sox et l'inflammation chez des souris obèses db/db (Terami et al., 2014). Le traitement avec la dapagliflozine a réduit l'expression de l'isoforme Nox4 de la NADPHox et l'expression de nombreux gènes pro-inflammatoires tels que le TGF- β , MCP-1, l'ostéopontine et la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1) dans le rein. L'inhibiteur de SGLT2 a également empêché l'infiltration des macrophages pro-inflammatoires M1 ainsi

que l'accumulation de matrice extracellulaire (MEC) et la fibrose au sein du tissu rénal. Deux autres études testant l'empagliflozine, l'une sur des souris obèses et diabétiques et l'autre sur des rats prédiabétiques, ont toutes deux mis en évidence une réduction de la fibrose et de l'hypertrophie cardiaque, une amélioration de la fonction vasculaire et une diminution de l'infiltration des macrophages associées à une réduction significative du Sox (Kusaka et al., 2016; Lin et al., 2014). De plus, Lin et collègues ont pointé un rôle protecteur de l'empagliflozine sur la fonction cognitive notamment grâce à la réduction du Sox cérébral et à la stimulation du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF). En 2017, l'équipe de Oelze a mené une étude similaire à celle de 2014 mais sur le modèle de rat ZDF qui présente un DT2 (Steven et al., 2017). L'empagliflozine administrée dans l'eau de boisson pendant six semaines, est associée à une réduction du Sox dans l'aorte et le plasma. Le traitement avec la gliflozine a significativement prévenu l'inflammation et la glucotoxicité. D'autres études réalisées sur des modèles animaux ou des cultures cellulaires humaines ont confirmé les travaux de Oelze et collègues, qui montrent que les inhibiteurs de SGLT2 diminuent la production de radicaux libres essentiellement par réduction de la libération des produits avancés de glycation (AGE) et par l'amélioration de la fonction mitochondriale (Yaribeygi et al., 2019).

Récemment, une étude clinique incluant 200 patients DT2 a comparé l'effet de la canagliflozine par rapport au glimépiride sur les concentrations sériques des adipokines, de biomarqueurs inflammatoires et de chemokines (Garvey et al., 2018). Le traitement avec la canagliflozine a diminué de 22% la concentration d'IL-6 et a augmenté de 7% la concentration de TNF α dans le sérum comparé au bras recevant le glimépiride. Les niveaux de CRP, de MCP-1, de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1), et de la

molécule d'adhérence cellulaire vasculaire (VCAM-1), sont légèrement affectés par la canagliflozine mais ils n'atteignent pas le seuil de significativité.

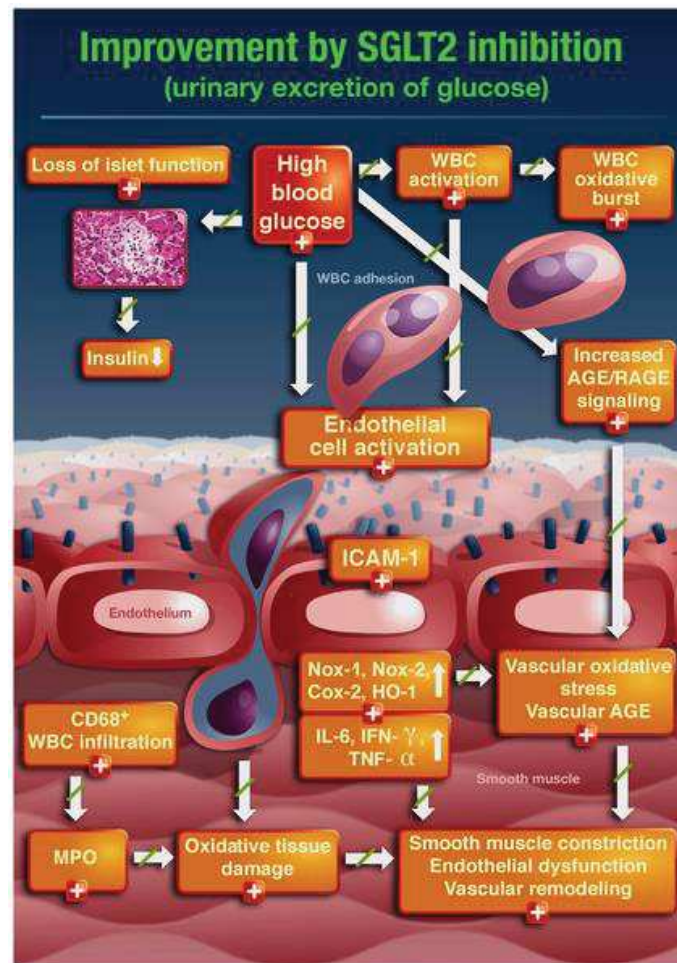


Figure 13. Mécanismes protecteurs de l'empagliflozine sur les lésions CV induites par la glucotoxicité (Oelze et al., 2014).

En conclusion, les effets protecteurs CV des glyflozines chez les patients DT2 sont désormais clairement établis. Deuxièmement, la réduction des hospitalisations pour IC a pu être transposée chez des malades présentant une HFrEF ou une HFpEF sans DT2. Cependant, les mécanismes à l'origine de cette protection et plus particulièrement leur importance relative, demeurent indéterminés. Il est vraisemblable qu'un effet direct sur la fonction diastolique soit majeur, mais que la combinaison des autres effets tels que la réduction du

remodelage CV, de la fibrose CV, de la dysfonction endothéliale ainsi que le changement de profil métabolique des cellules myocardiques, soit déterminante afin d'expliquer le bénéfice CV dans son ensemble.

Chapitre 2 : L'angiotensine II, facteur clé de la dysfonction cardiaque et vasculaire

2.1 Structure, rôle et régulation de l'angiotensine II et de ses récepteurs

2.1.1 Vue d'ensemble du système rénine-angiotensine-aldostérone

Le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) est impliqué dans de nombreux processus physiologiques qui régulent le volume des liquides cellulaires, le débit cardiaque, la vasoconstriction, la croissance cellulaire, l'intégrité du lit vasculaire, l'angiogenèse par exemple. Ce système est également fondamental dans les mécanismes physiopathologiques des maladies CV incluant l'HTA, la fibrose CV, l'hypertrophie cardiaque, la dysfonction endothéliale, l'athérosclérose, l'inflammation, la résistance à l'insuline et le vieillissement vasculaire. Il s'agit d'un système enzymatique dont le précurseur est la pré-prorénine sécrétée par les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire situées à proximité du glomérule rénal. La préprorénine subit un clivage protéolytique du peptide signal devenant ainsi la prorénine, qui quitte les corps denses vésiculaires et subit un nouveau clivage, aboutissant ainsi à la rénine, biologiquement active, sécrétée dans la circulation sanguine. La rénine va cliver l'angiotensinogène, d'origine hépatique, en angiotensine I, un décapeptide, qui lui-même sera clivé par l'enzyme de conversion (ACE) en angiotensine II (Ang II) ou Ang 1-8, octapeptide biologiquement actif (Wayne et al., 2019) (**Figure 14**). Le SRAA est clé dans la régulation de la PA et est donc impliqué dans l'HTA.

En plus de ce SRAA de type endocrine, il existe le système angiotensine local (Lavoie et Sigmund, 2003; Satou et al., 2015) qui agit essentiellement sur les CMLs et les CE. Il est

impliqué dans la génération d'EROs, l'activation des voies pro-apoptotiques, et l'activation de la coagulation.

Récemment, la complexité du SRAA a été fortement renforcée par la découverte de plusieurs autres peptides résultant de cette voie de signalisation tel que l'angiotensine 1-7 (Ang 1-7) qui se lie au récepteur Mas, et entraîne des effets généralement opposés à ceux induits par l'Ang II, l'angiotensine 2-8 (Ang III) et l'angiotensine 3-8 (Ang IV) (Bader, 2013).

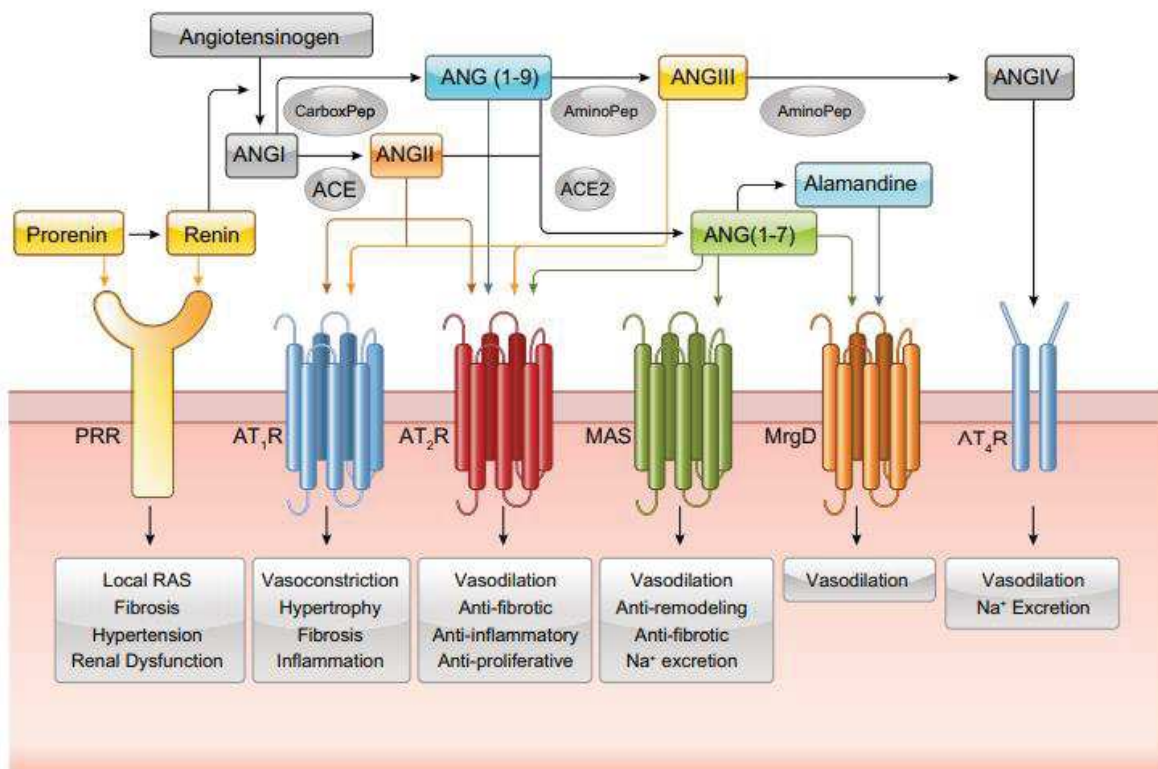


Figure 14. Vue d'ensemble du système rénine-angiotensine et de la diversité de ses récepteurs (Forrester et al., 2018).

2.1.2 L'angiotensine II et ses récepteurs

L'Ang II peut se fixer à deux récepteurs majeurs : le récepteur AT1 (AT1R) et le récepteur AT2 (AT2R). L'AT1R est exprimé dans de nombreux tissus incluant les CMLs, les CEs, le cœur, les reins, le cerveau et le tissu adipeux (De Gasparo et al., 2000). AT1R est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines $G_{q/11}$, $G_{12/13}$, et G_i qui vont activer des seconds messagers dont les principaux sont l'inositol triphosphate (IP3), le diacylglycérol (DAG), l'acide arachidonique (AA) et les EROs, activant à leur tour les phospholipases C, A et D (PLC, PLA, PLD). Selon le tissu considéré, les effecteurs activés entraîneront une réponse différente. Par exemple, au sein des CMLs, les protéines $G_{q/11}$ activent, *via* le signal calcique, la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK) et les protéines $G_{12/13}$ inhibent la phosphatase des chaînes légères de myosine (MLCP). AT1R permet l'activation de nombreuses protéines kinases intracellulaires incluant des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) ou des récepteurs à activité sérine/thréonine kinase (RSTK) comme la voie des MAP kinases (Higuchi et al., 2007; Mehta et Griendling, 2007). La fixation de l'Ang II sur AT1R déclenche également au sein des CMLs, la transactivation de plusieurs récepteurs de facteurs de croissance tels que l'EGFR, le PDGFR, l'IGF-IR, contribuant ainsi à l'augmentation de la synthèse protéique ce qui dynamise l'hypertrophie et la migration cellulaire, la fibrose vasculaire et cardiaque (Delafontaine et al., 1996; Eguchi et al., 2018; Elliott et al., 2013; Forrester et al., 2016; Heeneman et al., 2000; Ohtsu et al., 2006). Une autre voie, fortement activée par l'Ang II est celle conduisant à la libération d'EROs (anions superoxydes et peroxyde d'hydrogène notamment) par la stimulation de l'activité et de l'expression de la NADPHox (Garrido et Griendling, 2009; Mehta et Griendling, 2007). Le Sox ainsi généré est fondamental dans de nombreux phénomènes physiopathologiques tels que les troubles métaboliques ou les pathologies CV qui seront décrits dans les parties suivantes.

AT2R, quant à lui, a été moins étudié mais possède globalement des effets opposés à AT1R (Chow et Allen, 2016; Matavelli et Siragy, 2015; Padia et Carey, 2013; Sumners et al., 2015) (**Figure 15**). Ainsi, au sein du système CV, AT2R promeut la vasorelaxation par activation de la eNOS, prévient le remodelage CV et la sénescence vasculaire induite par l'Ang II, et préserve un environnement anti-inflammatoire en stimulant la polarisation des macrophages.

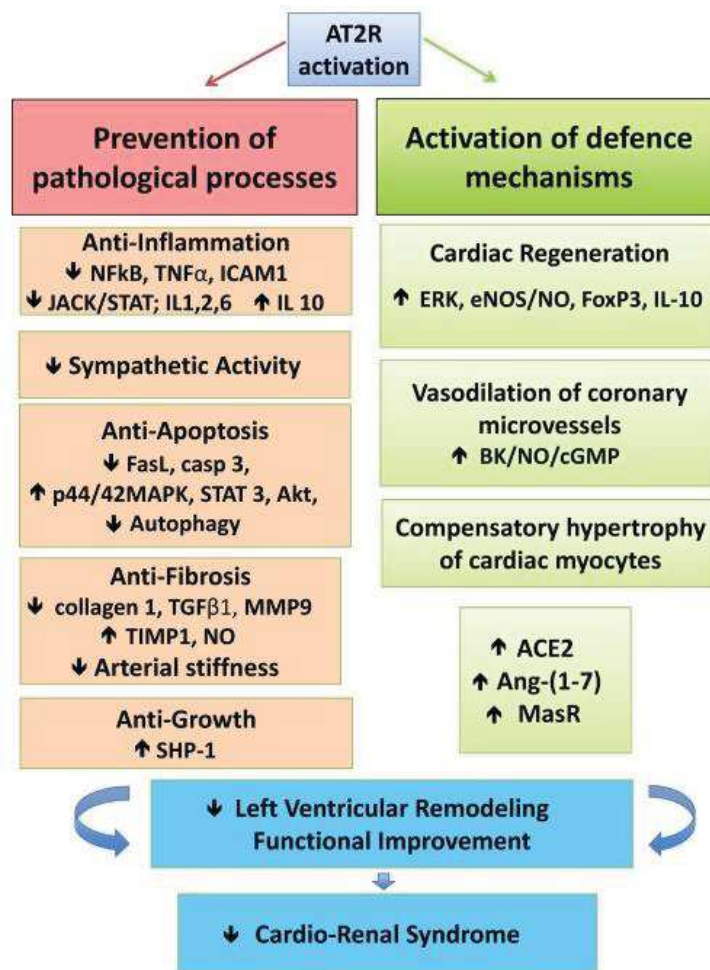


Figure 15. Actions de l'Ang II lors de sa fixation sur AT2R au sein du système CV (Kaschina et al., 2017).

Dans la suite de ce chapitre, nous nous concentrerons sur les effets induits par l'Ang II lors de sa fixation sur AT1R.

2.2 Rôle de l'angiotensine II dans la physiologie et la physiopathologie rénale

L'Ang II joue un rôle essentiel dans la régulation hydrosodée dans les cas de déshydratation ou de contraction du volume du liquide extracellulaire (Sparks et al., 2014). Une dérégulation du SRAA est associée à l'HTA essentielle par effet direct sur les CMLs qui entraîne une vasoconstriction des artérioles afférentes et efférentes, liée à une augmentation du signal calcique qui modifie le cytosquelette menant à la réduction du flux sanguin rénal. Cet effet est dépendant de la fixation de l'Ang II sur AT1R (Crowley et al., 2006; Sparks et al., 2014). D'autres études ont mis en évidence le rôle du Sox dans la vasoconstriction des artérioles afférentes induite par l'Ang II (Lai En Yin et al., 2012; Li et al., 2015a). En effet, des souris délétées pour la sous-unité p47^{phox} de la NADPHox ou pour la superoxyde dismutase (SOD), ne sont plus sensibles à la vasoconstriction de l'artériole afférente induite par l'Ang II. L'Ang II stimule également directement la réabsorption de Na⁺ et d'eau par le néphron mais aussi par activation de l'aldostérone (Mennuni et al., 2014). En effet, après vingt minutes d'une injection d'Ang II, une rapide rétention hydrosodée prend place par stimulation de l'échangeur Na⁺/H⁺ (NHE3) et du cotransporteur Na⁺/P_i de type 2 (NaPi2) au niveau de la bordure en brosse du tubule proximal (Riquier-Brison et al., 2009). Une administration d'Ang II pendant plus de trois jours, active plus fortement la NHE3 mais également le cotransporteur Na⁺/K⁺/Cl⁻ de type 2 (NKCC2) et le canal sodique de la membrane apicale des cellules épithéliales (ENaC), renforçant la réabsorption de sodium et d'eau et ainsi l'hypertension dans des modèles murins (Li et al., 2015b). L'Ang II active la NHE3 par la voie du calcium, de la calmoduline (CaM) et de la calmoduline kinase II (CaMKII) qui régule elle-même le complexe JAK2/CaM dépendant du Sox (Banday et Lokhandwala, 2011; Pontes et al., 2015a, 2015b).

L'Ang II exerce non seulement un rôle hémodynamique régulateur en stimulant le rétrocontrôle tubulo-glomérulaire qui abaisse progressivement le débit de filtration (pouvant participer à l'insuffisance rénale (IR)), mais exerce aussi des actions non hémodynamiques contribuant à la physiopathologie de l'hypertension rénale, telles que le Sox, la dysfonction endothéliale, la réponse inflammatoire et la fibrose interstitielle. L'action de l'Ang II est également associée à la synthèse accrue d'endothéline 1 (ET-1) et de TGF- β (Mennuni et al., 2014). Le rôle du SRAA dans la physiopathologie rénale, qui inclut l'hypertension rénale, la fibrose et l'inflammation a été très étudié (Giani et al., 2015; Kobori et al., 2007; Ramkumar et Kohan, 2016; Satou et al., 2015). Il a été montré que ces phénomènes représentent d'importants contributeurs de l'insuffisance rénale, par l'efficacité clinique des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) et des antagonistes des récepteurs AT1. Le rôle central du TGF- β dans la transition épithélio-mésenchymateuse et ainsi, dans la fibrose induite par l'Ang II a été démontré (Chen et al., 2012; Rüster et Wolf, 2011) (**Figure 16**). Le signal fibrogénique de l'Ang II est également amplifié par de nombreux effecteurs tels que VCAM-1, IL-6, TNF α , ET-1, la cyclooxygénase de type 2 (COX-2), PAI-1, et le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF) qui stimulent la synthèse de MEC ainsi que la réponse inflammatoire, menant par la suite à la fibrose rénale (Rüster et Wolf, 2011). L'implication des voies p38MAPK et Rho kinase a été mise en évidence par l'activation respective du CTGF qui entraîne la sécrétion du collagène I, et par la stimulation de la voie de NF- κ B qui active le facteur induit par l'hypoxie de type 1 α (HIF-1 α) au niveau des CEs. En effet, une délétion de HIF-1 α au sein des CEs chez la souris protège des effets hypertenseurs et fibrogéniques de l'Ang II (Luo et al., 2015; Zhu et al., 2011). De plus, l'activation du TNF α et de MCP-1 par la fixation de l'Ang II sur le récepteur AT1 des macrophages pro-inflammatoires M1, exacerbe

fortement leur recrutement et donc le phénomène d'inflammation qui amplifie lui-même la fibrose interstitielle rénale (Singh et al., 2013; Zhang et al., 2014).

L'Ang II est également un activateur de la synthèse d'interféron γ (IFN- γ) par les lymphocytes T (LT). Cet effet peut être bloqué avec des antagonistes d'AT1R indépendamment des réponses hémodynamiques induites par l'Ang II. En effet, le traitement avec l'Ang II de souris déficientes en LT et en lymphocytes B (LB), n'entraîne pas les effets habituellement observés comme l'hypertension, le remodelage vasculaire et la libération accrue d'EROs par le système vasculaire (Guzik et al., 2007). De plus, chez des souris inactivées pour l'interleukine 17 (IL-17), l'Ang II n'entraîne pas une augmentation de la PA et cette absence d'effet est associée à une réduction de l'infiltration de LT dans le tissu adipeux périvasculaire et à une annihilation de la libération d'anions superoxydes par les anneaux aortiques en réponse à l'Ang II (Madhur et al., 2010). Ces données suggèrent l'implication des lymphocytes T régulateurs 17 (LT17) qui produisent l'interleukine 17, dans la persistance de l'HTA. Ces données suggèrent que la modulation du système immunitaire pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique afin de réduire les événements CV dans l'HTA par exemple, d'autant plus que chez des sujets présentant des pathologies coronaires, le nombre de LT17 circulants est accru (Harrison et al., 2011).

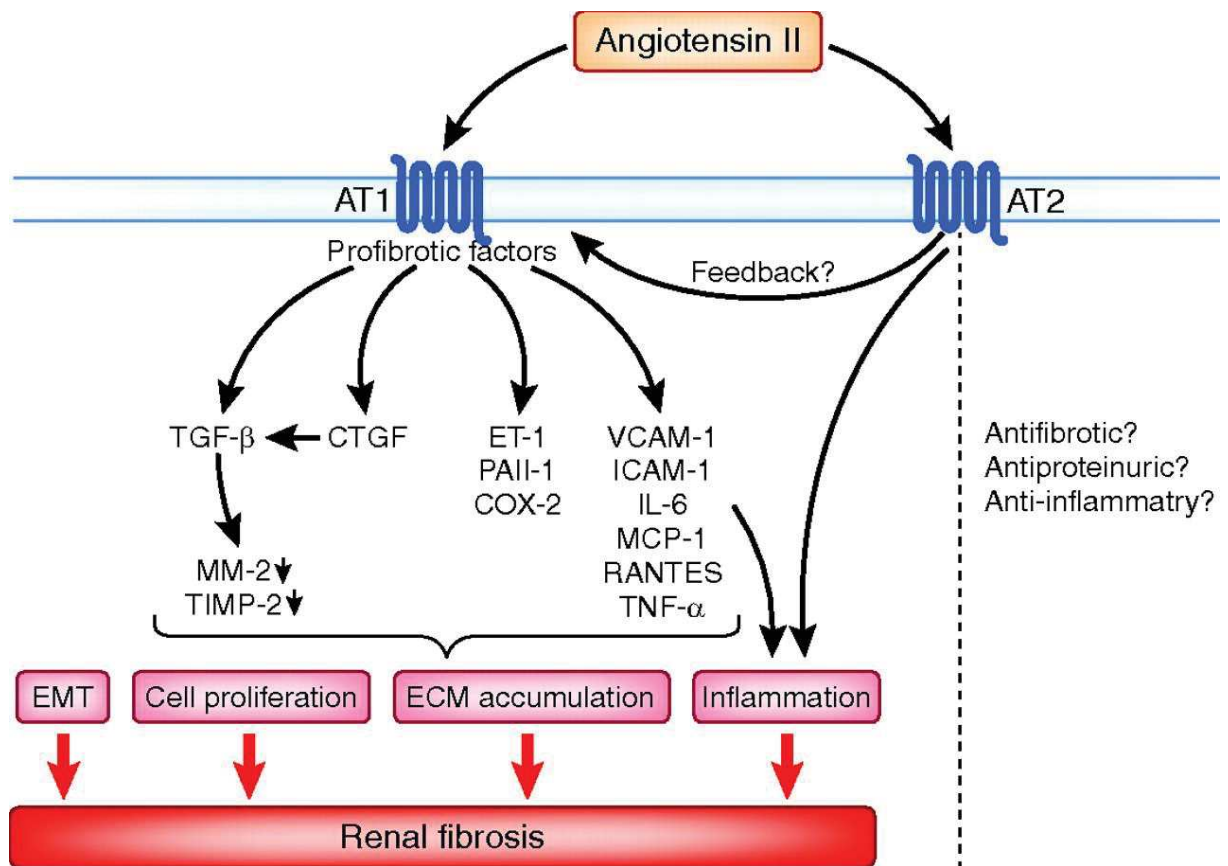


Figure 16. Effets fibrogéniques de l'Ang II sur le rein (Rüster et Wolf, 2011).

2.3 Rôle de l'angiotensine II dans les troubles métaboliques

Depuis près de deux décennies, des liens ont été établis entre la voie du SRAA et les troubles métaboliques (Dahlöf et al., 2002; Hansson et al., 1999). En effet, l'utilisation d'un inhibiteur d'ACE (captopril) ou d'un antagoniste de AT1R (losartan) pour traiter l'HTA, a montré une incidence moindre de nouveaux cas de DT2 par rapport à la thérapie conventionnelle de cette époque, que furent les β -bloquants et les diurétiques. Une étude a, par la suite, montré que le traitement de rats avec le captopril a réduit l'obésité induite par un régime hypercalorique et a amélioré la tolérance au glucose essentiellement par une réduction de la prise alimentaire témoignant ainsi de l'implication du SRAA dans la régulation métabolique (De Kloet et al., 2009). De plus, la délétion de ACE chez des souris a montré un moindre poids corporel, une masse grasse abdominale moins importante, une dépense énergétique totale plus faible essentiellement dus à une expression accrue des enzymes de la lipolyse et de l'oxydation des acides gras (AG) comme la lipoprotéine lipase, la carnitine palmitoyl transférase, et l'acétyl CoA deshydrogénase des AG à longues chaînes (Jayasooriya et al., 2008). Ces observations n'ont pas été accompagnées de modifications de la prise alimentaire, de l'activité diurne ou d'excrétion lipidique par rapport aux souris sauvages. Ces résultats ont été confirmés par la mise en évidence au sein des adipocytes, de l'ensemble des effecteurs du SRAA (rénine, ACE, AT1R, AT2R) ainsi que par une expression différentielle de ces acteurs entre le tissu adipeux viscéral, et en particulier abdominal, et le tissu adipeux sous-cutané renforçant l'hypothèse de liens existants entre l'obésité et les pathologies CV (Cassis et al., 2008). Le SRAA adipocytaire a ensuite été impliqué dans d'autres phénomènes pathologiques tels que l'HTA, la résistance à l'insuline précédant le DT2 ou l'obésité.

Le rôle fondamental du SRAA dans la résistance à l'insuline a fait l'objet de nombreux travaux mais les mécanismes moléculaires ne sont pas encore totalement élucidés.

La voie de l'Ang II interagit avec celle de l'insuline essentiellement par l'activation de la petite protéine GTPase, RhoA, qui inhibe la PKA et le substrat du récepteur à l'insuline 1 (IRS-1) d'une part, et par la synthèse accrue d'EROs et de cytokines pro-inflammatoires d'autre part (Folli et al., 1997; Velloso et al., 1996) (**Figure 17**). De plus, la voie de l'Ang II par l'activation de RhoA, inhibe l'adressage du transporteur de glucose GLUT4 à la membrane des tissus insulino-sensibles ce qui favorise l'hyperglycémie et ainsi la libération de molécules pro-oxydantes (Rojas et al., 2012).

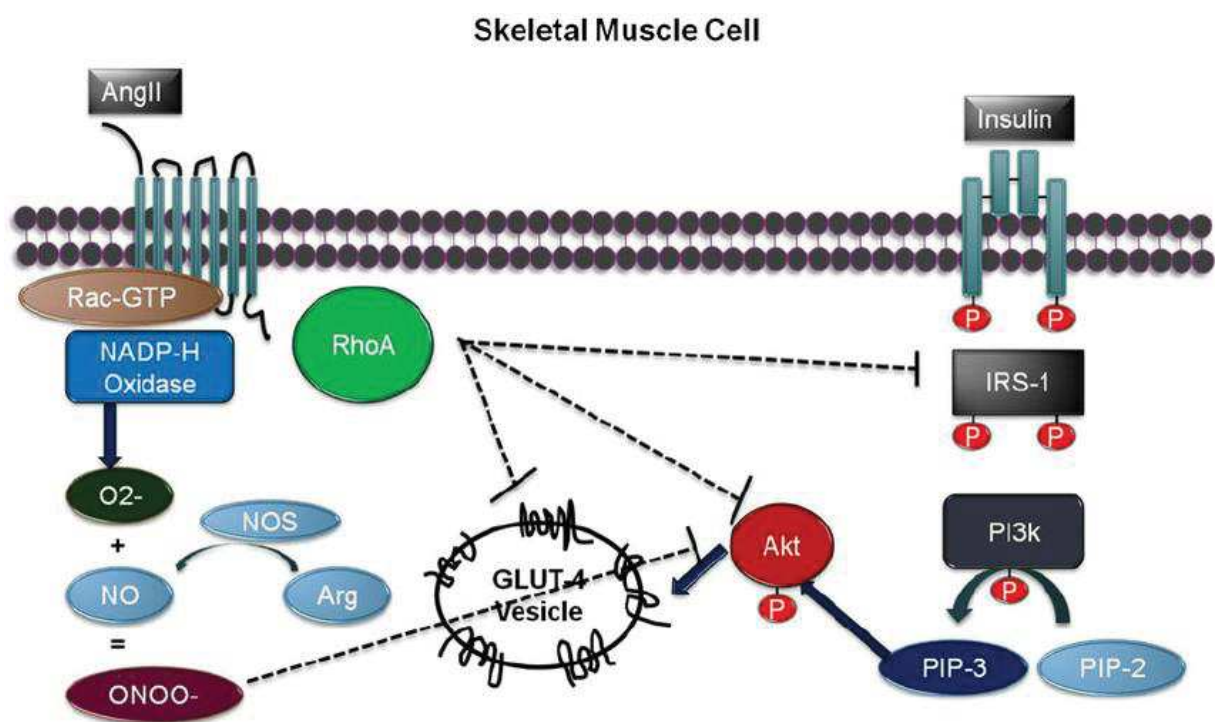


Figure 17. Effets de l'Ang II sur la voie de l'insuline au sein des cellules musculaires striés squelettiques (Rojas et al., 2012).

Plusieurs études ont démontré par la suite une fine connexion entre la résistance à l'insuline et de nombreuses pathologies CV (allant du DT2 à l'IC) témoignant de l'intrication existante entre le SRAA et la régulation métabolique de nombreux organes (Dominici et al., 2014; Lastra et al., 2010; Zhou et al., 2012). Dans le syndrome métabolique, la résistance à

l'insuline et la dysfonction endothéliale représentent les deux phénomènes majeurs de cet état pathologique (Steinberg et al., 1996). Au sein du système vasculaire, la résistance à l'insuline se manifeste par une altération de la vasodilatation, des atteintes micro vasculaires et nerveuses (rétinopathies, néphropathies et neuropathies), une inflammation vasculaire et la formation de lésions athérosclérotiques (Schulman et Zhou, 2009). Les patients DT2 et/ou obèses présentent une inhibition de la voie PI3 kinase (PI3K) avec souvent une relaxation dépendante de l'endothélium en réponse à l'insuline ou à l'acétylcholine, entièrement abolie (Lteif et al., 2005). Un nombre important d'études précliniques et cliniques ont permis de conclure que l'activation du SRAA joue un rôle important dans le développement de la dysfonction endothéliale et de la résistance à l'insuline dans de nombreuses pathologies CV et chez les patients DT2 (Lee et al., 2008; Shiuchi et al., 2004). L'activation du SRAA est associée à un signal insulinique altéré et à une résistance à l'insuline de nombreux tissus tels le tissu adipeux et le muscle squelettique, décrits précédemment, mais aussi les tissus rénaux, vasculaires et cardiaques (Wei et al., 2006, 2008). Quelques travaux cliniques ont mis en évidence une association entre la résistance à l'insuline et l'HTA qui est causée par l'activation du SRAA et le Sox (Sowers et al., 2004; Sowers et al., 2009). Le lien entre activation du SRAA et dysfonction endothéliale provient de l'augmentation du Sox par stimulation de la NADPHox (Wei et al., 2007). Afin de confirmer le rôle majeur du SRAA dans l'induction et l'aggravation des troubles métaboliques et CV, de nombreux essais cliniques ont testé l'utilisation d'inhibiteurs d'ACE ou d'antagonistes de AT1R chez des patients DT2 mais aussi chez des patients avec IC, avec HTA, avec des pathologies coronariennes ou des insuffisances rénales chroniques (Flammer et al., 2007; Yavuz et al., 2003). L'inhibition du SRAA a certes amélioré la tolérance au glucose, la réponse à l'insuline et les complications CV chez les patients DT2 mais également chez les patients à risque CV

ou à antécédents CV non DT2 (Luther et Brown, 2011; Perlstein et al., 2012; Rizos et al., 2013; Steinberger et Daniels, 2003). De plus, des données issues de larges études cliniques, suggèrent que l'inhibition du SRAA réduisent l'incidence de nouveaux cas de DT2 chez des patients à risque CV (Barzilay et al., 2006; Currie et al., 2017; Devereux et al., 2004; Hansson et al., 1999; Julius et al., 2004; Pfeffer et al., 2003; Shindler et al., 1996).

Ainsi, le lien indubitable entre l'effet bénéfique de l'inhibition du SRAA et les complications CV et métaboliques a été clairement mis en évidence mais les mécanismes proposés à l'origine de cette protection ne sont pas encore entièrement compris. Parmi les mécanismes proposés on peut retenir une stimulation de la signalisation intracellulaire de l'insuline au sein des tissus insulino-sensibles mais également au sein du système CV, une amélioration de la fonction pancréatique résultant en une meilleure réponse insulinique en réponse au glucose, une modulation des signaux hormonaux du tissu adipeux, ainsi qu'une amélioration de la fonction endothéliale des micro-vaisseaux essentiellement comme nous le verrons dans la partie 2.4. (Kim et al., 2006; Lee et al., 2008; Shiuchi et al., 2004; Tikellis et al., 2004; Zhou et Schulman, 2009) (**Figure 18**).

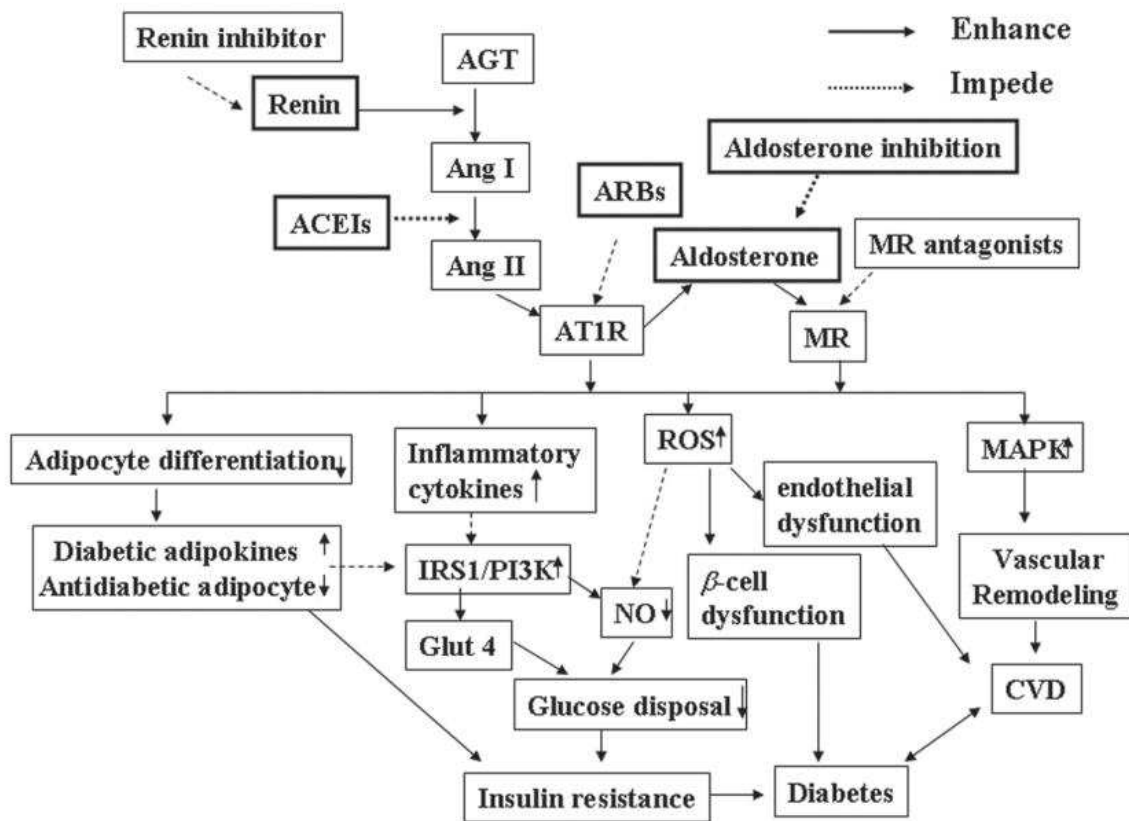


Figure 18. Représentation des mécanismes potentiels de protection de l'inhibition du SRAA sur les fonctions métaboliques telles que la résistance à l'insuline ou le développement du DT2 (Zhou et al., 2012).

2.4 Physiopathologie cardiovasculaire de la voie de l'angiotensine II

Des altérations conduisant à la rigidité vasculaire, à la fibrose CV et à la dysfonction diastolique sont d'importants facteurs prédictifs des pathologies CV telles que l'HTA, l'IC, les maladies coronariennes et les pathologies rénales (Jia et al., 2018). La rigidité vasculaire, mise en évidence cliniquement par une augmentation de la vitesse d'onde de pouls (PWV), est associée à un accroissement de la PAS menant à une hausse de la postcharge cardiaque, à l'hypertrophie cardiaque et à la dysfonction diastolique (Jia et al., 2018). D'ailleurs, la dysfonction diastolique consiste en des modifications cardiaques structurelles et fonctionnelles précoces rencontrées dans des processus pathologiques divers comme le DT2, l'obésité, le vieillissement et se manifeste cliniquement par une HFpEF. De nombreux mécanismes ont incriminé la voie de signalisation de l'Ang II dans l'induction et le développement de phénomènes pathologiques du système CV tels que la vasoconstriction, la dysfonction endothéliale, l'inflammation, l'hypertrophie et l'hyperplasie vasculaire, la fibrose et la rigidité vasculaire, l'athérosclérose, ainsi que l'hypertrophie et la fibrose cardiaque (**Figure 19**).

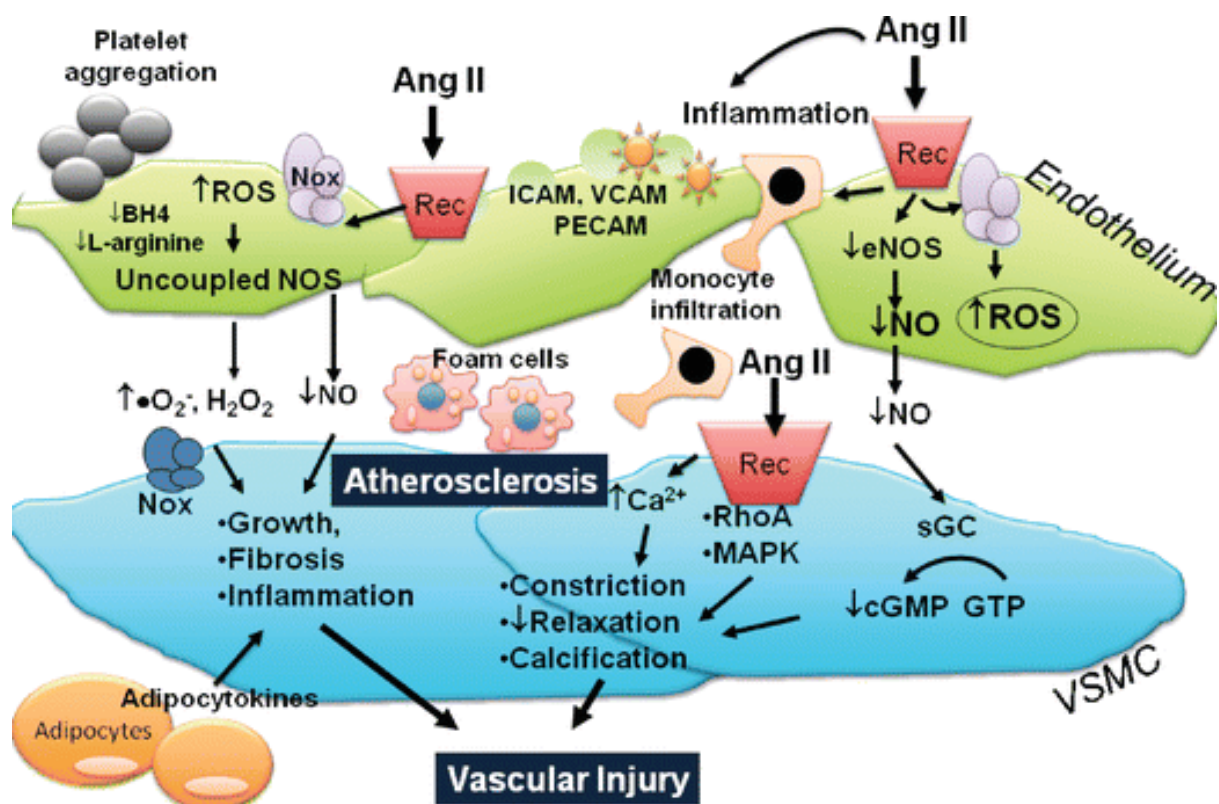


Figure 19. Rôles physiopathologiques de l'Ang II sur le système vasculaire (Montezano et al., 2014).

2.4.1 Dysfonction endothéliale

L'endothélium constitue la surface interne de l'ensemble des vaisseaux. Depuis plusieurs décennies, de nombreux travaux ont montré que cette monocouche cellulaire ne joue pas simplement un rôle de barrière entre le sang et les tissus, mais est au contraire une interface extrêmement sensible au flux sanguin, à de nombreuses hormones et facteurs de croissance. Ainsi, il est admis qu'une altération de la structure ou de la fonction de l'endothélium est un facteur précoce de pathologies CV et constitue même un facteur de risque de maladies CV telles que l'HTA ou les pathologies coronariennes. La dysfonction

endothéliale est caractérisée chez l'homme, comme une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium due majoritairement à une diminution de la biodisponibilité du NO (Lerman et Burnett, 1992). L'inflammation et le Sox sont des phénomènes inducteurs bien connus de la dysfonction endothéliale.

Le lien entre le SRAA et la dysfonction endothéliale a été largement démontré et s'effectue principalement par l'activation de la NADPHox entraînant un Sox cytoplasmique et mitochondrial qui réduit la biodisponibilité du NO. En effet, le NO produit va être rapidement dégradé par les anions superoxydes pour être converti en peroxy-nitrite. Ces EROs interagissent avec de nombreuses protéines et lipides, modifiant ainsi leur structure et fonction, ce qui mène à la dysfonction endothéliale (Brown et Griendling, 2015). L'Ang II active également la cascade de NF- κ B, qui conduit à la surexpression de molécules d'adhésion comme VCAM-1 et ICAM-1 ce qui facilite ainsi l'interaction des leucocytes avec la surface endothéliale (Scalia et al., 2011; Stegbauer et al., 2009). La neutralisation du gaz NO, entraîne ainsi des effets délétères multiples sur le vaisseau qui vont de l'altération de la vasorelaxation des CMLs, à l'induction de l'inflammation, en passant par un endothélium pro-agrégant et pro-thrombotique.

2.4.2 Athérosclérose

L'inhibition du SRAA constitue une approche classique de prévention primaire et secondaire de la pathologie athérosclérotique. Plusieurs éléments de démonstration indiquent que les effets protecteurs des traitements inhibiteurs du SRAA ne repose pas seulement sur la réduction de la PA, mais aussi sur d'autres actions de l'Ang II telles que l'inflammation (Montecucco et al., 2009). Des données cliniques ont montré que l'Ang II contribue à l'initiation et à la progression des plaques d'athérosclérose en induisant la dysfonction

endothéliale, le Sox, l'inflammation, des effets pro-coagulants, et des phénomènes de rupture de plaque (Vaccari et al., 2008). En effet, la délétion de AT1R dans des modèles murins a montré une protection très importante face au phénomène d'athérosclérose (Meyrelles et al., 2011).

2.4.3 Fibrose et rigidité vasculaire

En 2015, le conseil de lutte contre l'HTA de l'Association Américaine du Cœur, a approuvé l'utilisation de la vitesse d'onde de pouls comme méthode de mesure de la rigidité vasculaire (RV) et a défini conjointement avec la Société Européenne de Cardiologie, la valeur seuil de 12m/s comme témoin de rigidité vasculaire pathologique (Mancia et al., 2007; Townsend et al., 2015). Une méta-analyse regroupant dix-sept études incluant au total 15 877 patients a montré qu'au-delà de ce seuil, chaque accroissement de 1 m/s augmente le risque de survenue d'un événement CV de 14 %, la mortalité CV de 15 %, et la mortalité toute cause de 15 % (Vlachopoulos et al., 2010b). Au surplus, l'étude Framingham Heart Study incluant 2232 patients, a décrit la RV comme un facteur prédictif de la morbi-mortalité CV au sein de la population générale, des personnes âgées et des patients hypertendus (Mitchell et al., 2010). L'activation excessive et chronique du SRAA contribue à la RV, à l'HTA et aux troubles CV en général puisque l'inhibition de l'Ang II ou des récepteurs à l'aldostérone a pour effet de réduire la vitesse d'onde de pouls, la RV et les pathologies CV (Meune et al., 2011; Peng et al., 2015). En effet, les résultats de l'étude SILVHIA ont montré l'effet protecteur de l'irbésartan sur la compliance artérielle sans pour autant modifier les marqueurs endothéliaux et inflammatoires (Jekell et al., 2013). De même, une étude portant sur 566 patients avec une HTA non contrôlée, a montré une réduction de la RV par traitement avec la spironolactone (Liu et al., 2018). Il est intéressant de noter qu'une RV excessive est, par elle-même, une cause majeure d'augmentation de la PAS et donc un facteur causal de l'HTA. Cette

affirmation est corroborée par le fait que de récentes études montrent que l'accroissement de la RV précède très souvent l'HTA et l'ensemble des phénomènes de remodelage et de dysfonction endothéliale (DeMarco et al., 2015; Weisbrod et al., 2013).

D'un point de vue fonctionnel, la RV consiste en une activité fibrotique accrue et à une réduction de l'élasticité de la média, qui est associée à une stimulation de la synthèse de collagène (I et III notamment) et à son agrégation *via* des protéines de pontage, à une dégénérescence des fibres d'élastine, et à de la calcification (Harvey et al., 2016). Du point de vue mécanistique, l'implication des MMPs, des TIMPs, du TGF- β , de PAI1 et du CTGF a été mise en évidence. De plus, le rôle de l'Ang II apparait central parmi d'autres facteurs (l'ET-1 et l'aldostérone par exemple) dans l'induction de la fibrose vasculaire et dans sa capacité à activer l'ensemble des facteurs précités. L'Ang II promeut la dégradation de la MEC entraînant ainsi la migration et la prolifération des CMLs et l'infiltration de cellules inflammatoires dans la paroi vasculaire ce qui contribue également à son remodelage (Wang et al., 2015). Il a été montré que l'Ang II stimule l'activité de la MMP-2 vasculaire par activation de ADAM17 et que l'utilisation d'un siRNA dirigé contre MMP-2 réduit l'hypertension induite par l'Ang II (Odenbach et al., 2011). De plus, une suractivation des inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMPs) conduit à une moindre dégradation de collagène I et d'élastine concourant ainsi à la RV et à la fibrose (Raffetto et Khalil, 2008).

En conclusion, la RV et la fibrose vasculaire induites par l'Ang II impliquent de nombreux acteurs tels que les fibroblastes, les CMLs, les cellules inflammatoires et la MEC qui eux-mêmes interagissent avec une considérable complexité de signaux.

2.4.4 Dysfonction diastolique et fibrose cardiaque

La dysfonction diastolique est associée avec le remodelage du tissu cardiaque et de la circulation coronaire ce qui conduit à des altérations structurelles et fonctionnelles (Jia et al.,

2018). Elle est caractérisée par une rigidité du VG, une augmentation de l'IVRT et un remplissage plus lent du VG en diastole (Jia et al., 2018). On retrouve, de façon très fréquente, un accroissement de la masse cardiaque et de l'hypertrophie cardiaque qui conduisent à des pressions de remplissage plus élevées, et à une altération de l'élasticité cardiaque jouant un rôle majeur dans l'apparition de la dysfonction diastolique et de l'HFpEF (Jia et al., 2018). En effet, l'étude I-PRESERVE incluant 4128 patients souffrant de HFpEF et testant l'irbésartan, a montré que la majorité des malades présentait une hypertrophie du VG et une dysfonction diastolique (Massie et al., 2008).

L'implication du SRAA dans le développement de la dysfonction diastolique et de l'IC a été démontrée par de nombreuses études cliniques ayant testé des inhibiteurs d'ACE, des antagonistes de AT1R ou des antagonistes des récepteurs des minéralocorticoïdes (RM). Une méta-analyse détaillant le blocage du SRAA par des inhibiteurs d'ACE ou par des antagonistes de AT1R chez 8152 patients avec HFpEF, a montré une réduction significative des hospitalisations pour IC et une réduction de la mortalité CV (Meune et al., 2011). L'étude randomisée PEP-CHF testant le périndopril chez des patients atteints d'IC chronique, a montré qu'un an de traitement a amélioré la fonction cardiaque, a réduit les accidents CV et a diminué les hospitalisations pour IC (Cleland et al., 2006). D'autres essais de grande ampleur comme RALES, EMPHASIS ou EPHEBUS, ont mis en évidence que le blocage des RM réduit la mortalité CV chez les patients avec IC, vraisemblablement par inhibition de l'activation des macrophages, des lymphocytes T et des cellules dendritiques (Shen et Young, 2012).

Le remodelage cardiaque consiste en une sévère altération de la structure cardiaque où coexistent deux phénomènes majeurs : l'hypertrophie et la fibrose cardiaque, qui rendent le cœur plus vulnérable aux agressions (Shimizu et Minamino, 2016). Le processus

d'hypertrophie cardiaque est de mieux en mieux compris mais demeure extrêmement complexe car l'Ang II agit sur plusieurs types cellulaires comme les cardiomyocytes mais aussi les CEs et les fibroblastes, et implique de nombreuses voies que sont la voie canonique, la voie non canonique, la transactivation du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et l'inflammation (Forrester et al., 2018) (**Figure 20**). Concernant la fibrose cardiaque, le facteur majeur est le TGF- β , qui déclenche l'activation de la voie des Smad. Ce facteur est stimulé en amont par le Sox, dont la suractivation est initiée par Nox2 et Nox4, elles-mêmes activées par la liaison de l'Ang II avec AT1R. Le Sox va également induire la voie de NF- κ B, ERK1/2 et Akt/mTOR dont l'ensemble va conduire à la prolifération et la migration des fibroblastes cardiaques et à la synthèse de collagène. Le rôle de l'inflammation dans le phénomène de remodelage est également clairement démontré.

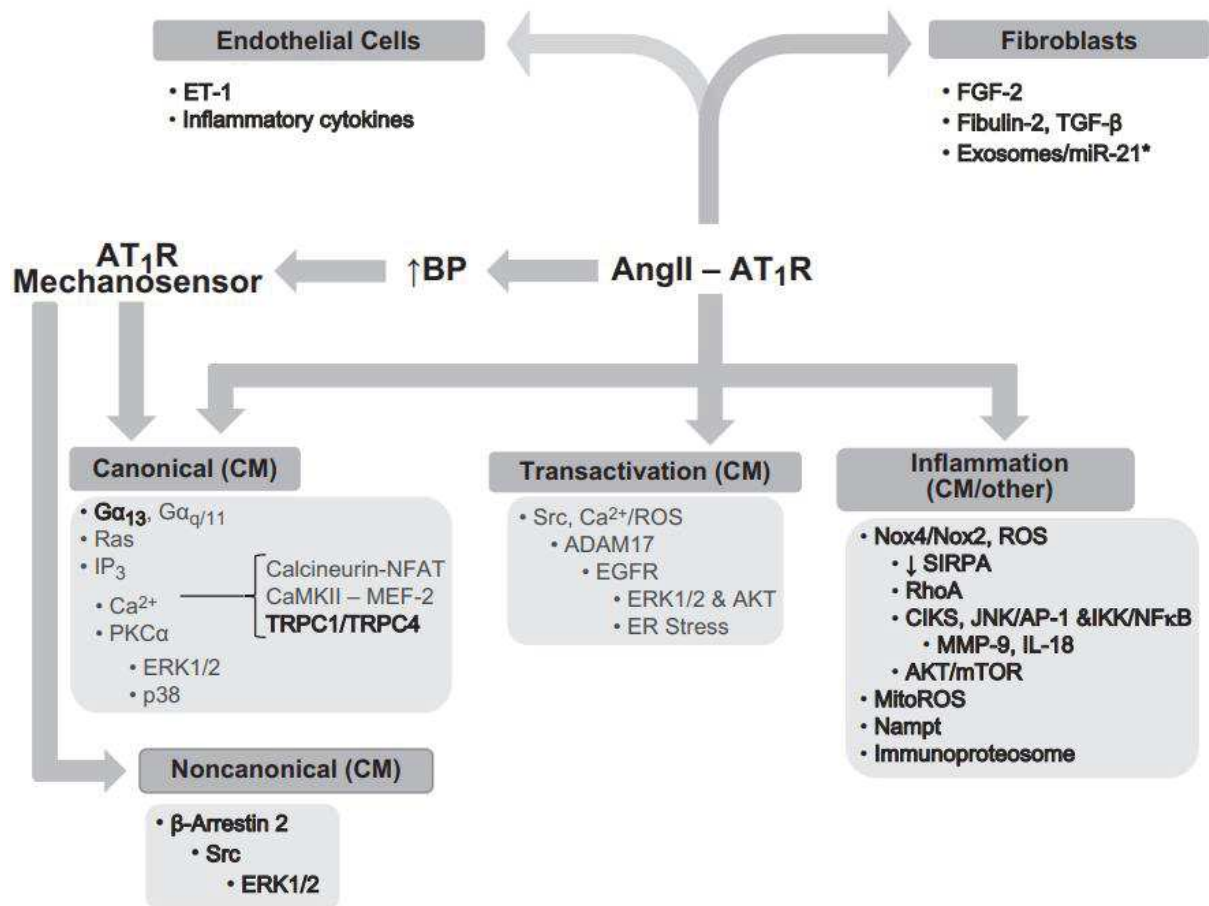


Figure 20. Rôles de l'Ang II dans la stimulation du processus d'hypertrophie cardiaque (Forrester et al., 2018).

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les co-transporteurs sodium-glucose (SGLT)1 et 2 sont situés dans le rein, respectivement au niveau du segment S3 du tube contourné proximal rénal et au niveau du segment S1 du tube contourné proximal. Leur rôle est d'assurer la réabsorption urinaire complète du glucose empêchant une glycosurie chez le sujet sain. SGLT2 assure un transport actif secondaire couplé au sodium et est responsable de la réabsorption de la très grande majorité du glucose filtré au niveau rénal (90 %). Les 10 % restants du glucose filtré sont réabsorbés par le transporteur SGLT1 de haute affinité mais de faible capacité.

A partir de 2012, des inhibiteurs de ces co-transporteurs ont été développés dont les principaux sont, par ordre décroissant de sélectivité de SGLT2, l'empagliflozine, la dapagliflozine et la canagliflozine. Ces inhibiteurs ont été par la suite mis sur leur marché pour leurs propriétés antidiabétiques. La première étude clinique de grande ampleur évaluant la sécurité CV des gliflozines a été l'étude EMPA-REG OUTCOME, qui a comparé l'effet d'une prise en charge standard du diabète *versus* la thérapie standard à laquelle on a adjoint l'empagliflozine sur 7034 patients diabétiques à haut risque CV. Une amélioration du contrôle glycémique a été observée, associée à des bénéfices cardiovasculaires majeurs. Cette étude a montré une réduction de plus de 38% de la mortalité CV et de 35 % des hospitalisations pour insuffisance cardiaque. Par la suite, deux autres études – CANVAS et DECLARE-TMI 58 – évaluant l'effet de la canagliflozine et de la dapagliflozine – ont montré une réduction des infarctus du myocarde non fatals ou des accidents vasculaires cérébraux (AVC) non fatals de 14% ainsi qu'une diminution de 34 % des hospitalisations pour IC.

Depuis quelques années, notre laboratoire a émis l'hypothèse qu'une protection si importante du système CV pouvait être le reflet d'une protection des cellules clés du lit vasculaire : les CEs. Benkhiat et collègues, ont montré que des cellules endothéliales traitées par une forte concentration de glucose surexprimaient SGLT1 et 2 et que le traitement par

l'empagliflozine prévenait leur surexpression. De plus, le blocage de l'Ang II – un puissant facteur pro-oxydant impliqué dans le développement des pathologies cardiovasculaires majeures y compris le diabète de type 2 – réduisait l'expression de SGLT1 et 2 ainsi que la dysfonction endothéliale suggérant que les inhibiteurs des co-transporteurs SGLT1 et 2 étaient non seulement des anti-diabétiques efficaces mais vraisemblablement aussi des traitements potentiels des complications CV hors du champ diabétique.

En effet, des analyses très récentes de l'étude clinique EMPA-REG OUTCOME – qui testait l'efficacité de l'empagliflozine sur 7034 patients diabétiques de type 2 – mais aussi des études DECLARE-TIMI et CANVAS, ont montré que l'ensemble des bénéfices cardiovasculaires observés (diminution du risque relatif de mortalité CV diminué de 38 %, réduction de 35% des hospitalisations pour insuffisance cardiaque) sont indépendants du contrôle glycémique (Inzucchi et al., 2018).

Dans un premier temps, nous avons testé l'effet de l'empagliflozine (un inhibiteur sélectif des transporteurs SGLT2) sur la fonction endothéliale ainsi que sur la structure et la fonction cardiaque à l'aide d'un modèle animal de syndrome métabolique : le rat hybride F1 obèse Zucker diabetic fatty/spontaneously hypertensive heart failure (ZSF1)-HFpEF *versus* le rat ZSF1 lean, contrôle. L'étude nous a permis de montrer que l'empagliflozine, inhibiteur sélectif des transporteurs SGLT2, a amélioré la fonction endothéliale en améliorant la relaxation vasculaire dépendante de l'endothélium et en réduisant les réponses contractiles vraisemblablement par l'inhibition de la voie des cyclo-oxygénases (COX) impliquée dans la génération de dérivés prostanoidiques vasoconstricteurs. La réduction de l'hypertrophie des structures cardiaques a également été observée.

Plusieurs études *in vitro* ont montré que les EROs, produites par l'excès de glucose ou par l'H₂O₂ sont capables de stimuler l'expression des transporteurs SGLTs dans les cellules

épithéliales rénales et dans les cellules vasculaires (Battistoni et al., 2021). Or, dans la majorité des pathologies vasculaires, le principal facteur pro-oxydant est l'Ang II.

C'est pourquoi, dans un second temps, Park et collègues – de notre groupe – ont testé l'effet pro-oxydant de l'Ang II et sa capacité à activer le système angiotensine local, sur la modulation des transporteurs SGLT1 et 2 au sein des CEs. L'objectif était ainsi de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'Ang II induit l'expression de SGLT1 et 2 dans les CEs menant ainsi à la dysfonction endothéliale. Nous avons pu conclure que l'Ang II mène à la surexpression des protéines SGLT1 et 2 dans les CEs vraisemblablement en affectant les voies redox-sensibles de la NADPH oxydase, des cyclo-oxygénases et de la chaîne respiratoire mitochondriale.

À la suite de récentes études cliniques (DAPA-HF et EMPEROR) ayant montré un bénéfice important des gliflozines chez des patients non DT2 avec une IC à fraction d'éjection réduite (HF_rEF), ainsi que des travaux réalisés au sein de notre équipe présentés ci-dessus, il est possible d'émettre l'hypothèse de protection de la fonction diastolique du VG des inhibiteurs de SGLT2 dans un modèle non DT2 et hypertendu.

Ainsi, dans ce travail de recherche, objet majeur de ce mémoire, nous avons testé le rôle protecteur CV de l'inhibition des co-transporteurs SGLT2 à l'aide de l'empagliflozine dans un modèle expérimental normo glycémique de rat hypertendu avec une dysfonction diastolique. Notre objectif a été de tester l'effet de l'empagliflozine sur 1) la pression artérielle, 2) la fonction endothéliale des gros vaisseaux et des micro-vaisseaux, 3) les fonctions systolique et diastolique cardiaque, 4) le remodelage CV (fibrose, expression des métalloprotéinases) et 5) l'expression et l'activité des co-transporteurs SGLT1 et 2.

RESULTATS

Article principal

Empagliflozin prevents angiotensin II-induced hypertension related micro and macrovascular endothelial dysfunction and diastolic dysfunction in rats despite persistent hypertension: Role of endothelial SGLT1 and 2

Christophe Bruckert^{a,b,1}, Kensuke Matsushita^{a,b,c,1}, Said Amissi^{a,b}, Cyril Auger^{a,b}, Ursula Houngue^{a,b}, Lamia Remila^{a,b}, Ahmed Chaker^{a,b}, Sin-Hee Park^{a,b}, Paola Algara-Suarez^{a,b}, Eugenia Belcastro^{a,b}, Laurence Jesel^{a,c}, Patrick Ohlmann^c, Olivier Morel^{a,c}, Valérie B. Schini-Kerth^{a,b*}

^aINSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR 1260, Regenerative Nanomedicine, FMTS, Strasbourg, France; ^bUniversité de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, Strasbourg, France; ^cHôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS), Service de Cardiologie, Strasbourg, France

**Corresponding author:* Valérie B. Schini-Kerth, PhD, UMR1260 INSERM, University of Strasbourg, CRBS, 1 rue Eugène Boeckel, 67084 Strasbourg, France

Phone: (+33) 68 85 41 27; Fax: (+33) 68 85 43 13

Email addresses: bruckert.prof@hotmail.fr (C. Bruckert), matsuken_22@yahoo.co.jp (K. Matsushita), s.amissi@unistra.fr (S. Amissi), cyril.auger@unistra.fr (C. Auger), uhoungue@gmail.com (U. Houngue) remilapharm16@yahoo.com (L. Remila), ahmed.chaker@unistra.fr (A. Chaker), akqmf02@gmail.com (S.-H. Park), paola.algara@uaslp.mx (P. Algara-Suarez), eugenia.belcastro@gmail.com (E. Belcastro),

Laurence.JESEL-MOREL@chru-strasbourg.fr (L. Jesel), Patrick.Ohlmann@chru-strasbourg.fr (P. Ohlmann), olivier.morel@chru-strasbourg.fr (O. Morel), valerie.schini-kerth@unistra.fr (V.B. Schini-Kerth).

¹ These authors contributed equally.

Declarations of interest: This work was supported by an unrestricted research grant from Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach, Germany, and by the Groupe pour l'Enseignement de la Recherche Cardio-vasculaire en Alsace, France.

Abstract

SGLT2 inhibitors (SGLT2i) showed pronounced beneficial effects in patients with heart failure but the underlying mechanisms remain unclear. We evaluated the effect of empagliflozin, a selective SGLT2i, on the deleterious effects of Ang II-induced hypertension on the heart and blood vessels in rats. Male Wistar rats received control diet or diet with empagliflozin (30 mg/kg/day). After 1 week, a hypertensive dose of Ang II (0.4 mg/kg/day) was administered using osmotic mini-pumps for 4 weeks. Systolic blood pressure was determined by plethysmography, the cardiac function *in vivo* by echocardiography, and *in vitro* (coronary microvascular function, left ventricle remodeling and fibrosis responses), and the systemic micro and macrovascular function *in vitro*. Empagliflozin prevented Ang II-induced diastolic dysfunction, and macro and microvascular endothelial dysfunction despite persistent hypertension. The beneficial effects were associated with an improved vascular eNOS/ROS balance, SGLT2-dependent ROS formation, local angiotensin system, pro-atherosclerotic responses and of endothelial SGLT1 and 2 expression and activity. Thus, the SGLT2i effectively attenuated the deleterious impact of Ang II-induced hypertension on target organs including cardiac diastolic dysfunction and remodeling, and endothelial dysfunction and pro-atherosclerotic, pro-fibrotic and pro-remodeling responses in macro and microvessels despite persistent hypertension.

Keywords: Angiotensin II - Empagliflozin - Diastolic dysfunction - Endothelial dysfunction - SGLT1 - SGLT2

Abbreviations: SGLT2i, sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor; HF, heart failure; HFrEF, HF with reduced ejection fraction; LV, left ventricle; AT1R, angiotensin type 1 receptor; ROS, reactive oxygen species; Ang II, angiotensin II; eNOS, endothelial NO synthase; LVEF, LV ejection fraction; CO, cardiac output; SV, stroke volume; IVRT, isovolumic relaxation time; IVSTd, interventricular septum thickness in diastole; NO, nitric oxide; ACE, angiotensin-converting enzyme; MMP, matrix metalloproteinase; ANP, atrial natriuretic peptide.

Introduction

The gliflozin family was originally developed as antidiabetic drugs for treatment of patients with type 2 diabetes that selectively inhibit the sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) in the kidney.¹ The meta-analysis of large cardiovascular outcome trials with SGLT2 inhibitors (SGLT2i) in type 2 diabetes indicated consistent benefits with a ~30% reduction in the risk of heart failure (HF) hospitalization and with a ~40-50% reduction in the risk of serious adverse kidney events, and a moderate reduction on cardiovascular death by ~15%.² Recent meta-analysis of two large-scale trials with SGLT2i that enrolled patients with HF with reduced ejection fraction (HFrEF) showed a ~25% reduction of the combined risk of cardiovascular death or hospitalization for HF, and improved renal outcomes.³ These benefits are observed regardless of the diabetic status and across all ages.³

SGLT2i showed also cardiovascular protective effects in several diabetic and non-diabetic experimental models of cardiovascular diseases. SGLT2i attenuated doxorubicin-induced HF and reduced fibrosis in mice,⁴ improved cardiac function and remodeling in rats after myocardial infarction in both diabetic and nondiabetic rats,^{5, 6} and ameliorated systolic and diastolic functions, LV fibrosis and stiffness in a nondiabetic porcine model of HFrEF after myocardial infarction,^{7, 8} In addition, in a rat model of metabolic syndrome with HF with preserved ejection fraction (ZSF1 rat, HFpEF), empagliflozin (a selective SGLT2 inhibitor) prevented hypertrophy and remodeling of the heart as well as endothelial dysfunction.⁹ Despite the remarkable cardiovascular protective effect of SGLT2i, the underlying mechanisms at the heart and vasculature still remain to be clarified.

Both clinical and experimental studies have highlighted that angiotensin II (Ang II) contributes to the development of major types of cardiovascular diseases including hypertension and HF. Many of the pathophysiological actions of Ang II are mediated via

activation of the angiotensin type 1 receptor (AT1R) to stimulate reactive oxygen species (ROS) generation through activation of vascular NADPH oxidase, and, as a consequence, to induce endothelial dysfunction, vascular fibrosis, inflammation and calcification, cardiac dysfunction and remodeling, and also the progression of atherosclerotic lesions.¹⁰ Recently, this group has shown that Ang II is also a strong inducer of SGLT1 and SGLT2 expression in endothelial cells through a redox-sensitive mechanism to promote premature endothelial senescence and dysfunction.¹¹ The fact that empagliflozin and sotagliflozin, a dual SGLT1 and 2 inhibitor, prevented the Ang II-induced pro-oxidant response, up-regulation of SGLT1 and 2 expression and induction of endothelial dysfunction implies a determinant role of SGLT1 and 2.¹¹ Moreover, experiments performed using rat arteries showed that SGLT1 and SGLT2 are overexpressed at arterial sites of risk (aortic arch versus thoracic aorta) where the local angiotensin system is particularly activated and characterized by high levels of oxidative stress and endothelial dysfunction, and also in aorta segments following their *ex vivo* exposure to Ang II.¹¹ Therefore, the aim of the present study is to evaluate the potential effect of empagliflozin on Ang II-induced hypertension and its deleterious impact on both the vascular and cardiac function in normoglycemic rats, and to characterize the underlying mechanisms.

Material and Methods

An expanded Material and Methods section is available in online supplementary Appendix S1. Rats were divided into four groups: control, empagliflozin (Empa, 30 mg/kg/day), Ang II (0.4 mg/kg/day) and Ang II (0.4 mg/kg/day) + empagliflozin (30 mg/kg/day). Empagliflozin treatment was provided in the diet for five weeks, and Ang II was infused using osmotic mini pumps during the last four weeks. Urine samples as well as echocardiography were performed the day before euthanasia, and blood samples were collected by terminal cardiac puncture. Non-invasive blood pressure was determined during the five-week period. After 5 weeks organ morphometry, the generation of ROS, protein expression, SGLT1 and 2-mediated anthocyanin uptake, fibrosis, hypertrophy, and macrophages infiltration were quantified in the aorta, mesenteric and coronary microcirculation and the left ventricle. To characterize the vascular formation of ROS, cryosections were exposed to N^G-Nitro-L-arginine (300 μM, endothelial NO synthase (eNOS) inhibitor) to determine the role of uncoupled eNOS, to losartan (1 μM, AT1R antagonist) and VAS-2871 (1 μM, NADPH oxidase inhibitor) for the local AT1R/NADPH oxidase pathway, and to sotagliflozin (100 nM) and empagliflozin (100 nM) for SGLT1 and 2 for 30 min before the determination of the level of ROS. The localization and activity of SGLT1 and 2 in the arterial wall was assessed indirectly based on the preferential uptake of anthocyanin like delphinidin-3-*O*-glucoside in endothelial cells through SGLTs.¹² For this purpose, cryosections were either untreated or exposed either to sotagliflozin (100 nM) or empagliflozin (100 nM) before the determination of anthocyanin uptake using an anthocyanin-rich blackcurrant extract. Data are expressed as mean ± SEM. Analysis was done using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison.

Introduction

Gliflozins family represented by empagliflozin, dapagliflozin and canagliflozin was developed as anti-T2DM drug and selectively inhibits the sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2). Consequently, the glucose reabsorption in renal proximal tubule is blocked which leads to a loss of 50 to 80 g of glucose per day in human. In large cardiovascular outcome trials in patients with diabetes, SGLT2 inhibitors improve cardiovascular outcomes, including hospitalization for heart failure, with this benefit extending to patients without diabetes who have heart failure with reduced ejection fraction.^{1,2} 7,020 T2DM patients with high cardiovascular risk were included in the first clinical trial (EMPA-REG OUTCOME, 2015) that compared the effect of empagliflozin *versus* standard therapy. This study showed a 38% reduction of the cardiovascular death and a 35% reduction in hospitalizations for heart failure (HF).^{2,3} Later, in 2017, the CANVAS clinical trial showed that the treatment of T2D patients with canagliflozin lowered the nonfatal myocardial infarction on nonfatal stroke by 14% and HF hospitalizations by 33%.⁴ In 2019, the dapagliflozin treatment of patients decreased by 27% hospitalizations for HF in the DECLARE-TIMI 58 clinical trial.⁵ All these cardiovascular benefits are unlikely to be related to the improvement in glycaemic control.⁶ Experimental studies have shown that chronic empagliflozin treatment attenuated myocardial ischemia/reperfusion injury in both diabetic and non-diabetic rats and improved cardiac function and remodeling in non-diabetic rats with left ventricular (LV) dysfunction after myocardial infarction and associated with substantial improvements in cardiac metabolism.^{7,8} In a recent study performed by our team in a rat model of metabolic syndrome with HFpEF (ZSF1 rat), 6 weeks empagliflozin treatment prevented hypertrophy and remodeling of the heart as well as the endothelial dysfunction.⁹

Hypertension is one of the foremost causes of premature mortality worldwide by affecting 1,39 billion people.¹⁰ Angiotensin II plays a key role in most of the cardiovascular diseases, including hypertension, heart failure and diabetes by the activation of the angiotensin 1 receptor (AT1R) which leads to oxidative stress generation, endothelial dysfunction, vascular remodeling, atherosclerosis, and cardiac remodeling. Recently, data from our laboratory showed that Ang II-treated endothelial cells for 24h overexpressed SGLT1 and SGLT2 cotransporters in a redox-sensitive manner which, ultimately leads to endothelial senescence and endothelial dysfunction. SGLTs inhibitors treatment normalized the Ang II-induced up-regulation of SGLT1 and 2 protein levels, suggesting that SGLT1 and 2 play a pivotal role on the Ang II deleterious effects. In addition, the pro-oxidant response mediated by the local angiotensin system (i.e. AT1 receptor, ACE) is strongly inhibited by the SGLTs inhibitors sotagliflozin and empagliflozin in ECs.¹¹ Moreover, experiments performed on rat arteries, showed that SGLT1 and SGLT2 are overexpressed at arterial sites of risk where the local angiotensin system is particularly activated, which leads to oxidative stress generation and endothelial dysfunction. Several studies has already demonstrated that SGLT2 transporter is detectable in aorta, endothelial cells and also in macrophages.¹²⁻¹⁴ In addition, SGLT2 inhibition was shown to reduce Ang II-induced dissecting abdominal aortic aneurysm in ApoE knock-out mice by the improvement of the oxidative stress level and by decreasing the immune response induced by Ang II infusion. Furthermore, Oelze et al. have studied in a preclinical streptozotocin diabetic rat model, the effect of SGLT2 inhibition on the vascular function and they have shown an important reduction of the oxidative stress and inflammation in the aorta wall.¹⁵

Ang II pathway overactivation is also associated with impaired cardiac function, cardiac fibrosis, and vascular remodeling. In rats treated with Ang II, the inhibition of SGLT2

transporters resulted in a renal anti-fibrotic effect and a decrease of renal inflammatory cell infiltration without any changes regarding the systolic blood pressure and the glucose level. Interestingly, empagliflozin ameliorated the left ventricular fibrosis and stiffness in a nondiabetic heart failure model of pigs.¹⁶ Despite of the remarkable cardiovascular benefits, the effect and the mechanism of SGLT2 inhibition in nondiabetic hypertensive or heart failure models remains poorly studied.

These findings taken altogether suggest that AT1 receptor and SGLT1 and 2 pathways are implicated in endothelial and cardiac dysfunction, that's why SGLT1 and 2 targeting can constitute an interesting and innovative approach to protect the endothelial function.

Therefore, the aim of the following study is to examine the protective effect of empagliflozin in a normoglycemic experimental model of hypertension in the rat. This study will particularly focus on the effect of empagliflozin treatment on 1) the level of systolic blood pressure, 2) the vascular level of the local angiotensin system, 3) the vascular level of oxidative stress, 4) the vascular expression of pro-atherothrombotic markers, 5) the vascular fibrosis and remodeling, 6) the cardiac function and 7) the cardiac fibrosis and remodeling.

Results

Empagliflozin does not affect the hypertensive response to Ang II in rats

Ang II treatment increased the level of systolic blood pressure by about 40 mmHg compared to the control group (*Figure 1*). The empagliflozin treatment affected neither the systolic blood pressure level under control conditions nor the hypertensive response to Ang II (*Figure 1*).

Effect of empagliflozin on body weight and the weight of different organs

The morphometric evaluation of rats has indicated that the control group, the empagliflozin group and the Ang II group had similar body weights whereas a significantly reduced body weight was observed in the Ang II + empagliflozin group (*Table 1*). In the empagliflozin group, the weight of both the left and right kidneys was significantly increased compared to the control group whereas no such effect was observed in the Ang II group and the Ang II + empagliflozin group (*Table 1*). The weight of the liver was similar in all 4 groups (*Table 1*). The Ang II treatment increased the whole heart weight and the right ventricle weight which were not observed in the Ang II + empagliflozin group (*Table 1*). An increased LV + septum weight was also observed in the Ang II group, which however did not reach statistical significance (*Table 1*).

Empagliflozin attenuates the Ang II-induced diastolic dysfunction

Assessment by echocardiography of the LV ejection fraction (LVEF), the fraction shortening (FS), the cardiac output (CO) and the stroke volume (SV) has indicated that neither the Ang II treatment nor the empagliflozin treatment affected the heart systolic function (*Table 2*). In contrast, the diastolic function determined by e' velocity, E/e' ratio and isovolumic relaxation time (IVRT) were significantly affected by the Ang II treatment

compared to the control group and the empagliflozin group (*Table 2*). The empagliflozin treatment significantly prevented the Ang II-induced increased E/e' ratio and normalized the e' velocity and the IVRT (*Table 2*). As a consequence, the IVSTd and the LV mass were significantly increased in the Ang II group but not in the Ang II + empagliflozin group compared to the control group (*Table 2*). The empagliflozin treatment alone had minimal effects (*Table 2*).

Empagliflozin improves the eNOS/ROS balance in both macro and microvessels of Ang II-treated rats

The formation of ROS as assessed using dihydroethidium was markedly increased throughout the arterial wall in both the aorta and mesenteric microvessels of the Ang II group compared to the control group whereas only a small but significant increase was observed in the Ang II + empagliflozin group (*Figure 2A, B*). As expected, the antioxidant N-acetylcysteine reduced the ROS formation in all groups (*Figure 2A*). The characterization of the pro-oxidant response in the Ang II group indicated a significant inhibitory effect of the eNOS inhibitor N^G-nitro L-arginine, the AT1R antagonist losartan and the NADPH oxidase inhibitor VAS-2871 indicating the involvement of uncoupled eNOS and the AT1R/NADPH oxidase pathway (*Figure 2C*). In addition, the vascular pro-oxidant response was also significantly reduced by sotagliflozin and abolished by empagliflozin suggesting that SGLT2, and, possibly also SGLT1, have a pivotal role (*Figure 2C*).

To evaluate the consequence of the pro-oxidant level in the arterial wall, the expression level of eNOS and nitrotyrosine was assessed by immunofluorescence. The Ang II treatment was associated with an increased eNOS signal by about 1.6-fold in the aorta compared to that of the control group possibly as part of a compensatory mechanism subsequent to the degradation of NO by superoxide anions (*Figure 2D*). In contrast in

mesenteric microvessels, the eNOS signal was decreased by about 2.5-fold suggesting that microvessels are impacted to a greater extent (*Figure 2E*). These effects of Ang II on the eNOS signal were not observed in the Ang II + empagliflozin group indicating that the endothelial function has been preserved (*Figure 2D,E*). An unbalanced eNOS/ROS is also indicated by the enhanced nitrotyrosine signal observed throughout the aorta wall in the Ang II group compared to the control group whereas no such effect was observed in Ang II + empagliflozin group (*Figure 2F*). The empagliflozin treatment alone affected minimally all these signals (*Figure 2*). Thus, the empagliflozin treatment effectively attenuated the Ang II-induced vascular oxidative stress and the impact on the endothelial dysfunction.

Empagliflozin prevents the activation of the local angiotensin system in both macro and microvessels of Ang II-treated rats

Consistent with previous observations,¹³ the Ang II-induced hypertension is associated with an increased AT1R immunofluorescence signal throughout the arterial wall, and ACE immunofluorescence signal predominantly in the endothelium in both the aorta (by about 3- and 3-fold, respectively) and mesenteric microvessels (by about 5- and 2-fold, respectively) compared to the control group (*Figure 3*). The empagliflozin treatment markedly prevented the Ang II-induced increased AT1R and ACE signals in the aorta and normalized those in mesenteric microvessels (*Figure 3*). The empagliflozin treatment alone had little effect (*Figure 3*).

Empagliflozin prevents the expression of pro-arteriosclerotic, pro-fibrotic and pro-remodeling markers in microvessels of Ang II-treated rats

In the Ang II group, increased VCAM-1 and MCP-1 immunofluorescence signals are observed predominantly in the endothelium of mesenteric microvessels compared to those of the control group (*Figure 4A, B*). In addition, the Ang II treatment significantly increased the collagen I signal by about 4-fold in the microvessel wall, and those of the matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 by about 5- and 4-fold, respectively predominantly in the endothelium (*Figure 4C-E*). The empagliflozin treatment prevented the stimulatory effect of Ang II on all these markers (*Figure 4*). Thus, these findings indicate that the empagliflozin treatment attenuated pro-arteriothrombotic, pro-fibrotic and pro-remodeling responses in the Ang II group.

Empagliflozin prevents the expression of SGLT1 and the SGLT1- and 2-mediated uptake of anthocyanin in the endothelium of Ang II-treated rats

Ang II has been shown to be a strong inducer of SGLT1 and 2 expression in coronary endothelial cells and isolated rat aorta.¹¹ An increased SGLT1 immunofluorescence signal was observed predominantly in the endothelium of the aorta, and also of both mesenteric and coronary microvessels in the Ang II group compared to the control group (*Figure 5A-C*). The empagliflozin treatment markedly prevented the Ang II-induced increased SGLT1 signal (*Figure 5A-C*). The empagliflozin treatment alone significantly increased the SGLT1 signal in the aorta but neither in the mesenteric nor in the coronary microvessels (*Figure 5A-C*). In contrast to SGLT1, no SGLT2 signal was detected possibly due to an expression level below the detection limit (data not shown). Therefore, the role of SGLT1 and 2 was assessed indirectly by determining the uptake of anthocyanin revealed using the Naturstoff Reagent A, which generates a fluorescent signal following its interaction with anthocyanin.¹² Exposure of sections of the aorta to a blackcurrant anthocyanin purified extract resulted in a fluorescent signal localized mostly in the endothelium (*Figure 5D*). Sotagliflozin and, to a lesser extent,

empagliflozin prevented the anthocyanin signal in the endothelium suggesting a predominant role of SGLT1 (*Figure 5D*). In the Ang II group, the anthocyanin signal was significantly increased by about 2.5-fold compared to that of the control group, and this effect was markedly blunted by sotagliflozin and empagliflozin indicating a major role of SGLT2 and possibly also SGLT1, most likely subsequent to an upregulation of their expression level (*Figure 5*). No such increased endothelial anthocyanin signal was observed in the Ang II + empagliflozin group suggesting that the empagliflozin treatment prevented the stimulatory effect of Ang II on SGLT1 and 2-mediated responses (*Figure 5D*).

Empagliflozin prevents fibrotic and remodeling responses, cardiomyocyte hypertrophy and macrophages infiltration in the left ventricle of Ang II-treated rats

Since the empagliflozin treatment prevented the increased heart weight and left ventricle mass in the Ang II group (*Tables 1 and 2*), the effect of SGLT2i on LV fibrosis and remodeling was evaluated. In the control group and the empagliflozin group no significant fibrosis was observed whereas in the Ang II group the fibrotic area amounted to about 28 % (*Figure 6A*). The stimulatory effect of Ang II was markedly reduced by the empagliflozin treatment (*Figure 6A*). Increased signals of collagen I and atrial natriuretic peptide (ANP, a marker of cardiac stress) were observed in the LV of the Ang II group, which were not observed in the Ang II + empagliflozin treatment (*Figure 6B and C*). The cardiomyocyte area was increased in the Ang II group compared to the control group, and this effect was prevented by the empagliflozin indicating effective prevention of cardiomyocyte hypertrophy (*Figure 6D*). In addition, the empagliflozin treatment prevented the increased LV infiltration of macrophages observed in the Ang II group without affecting the low level in the control group (*Figure 6E*).

Discussion

The major findings of the present study indicate that the empagliflozin treatment effectively prevented the deleterious impact of Ang II-induced hypertension on both the macro and microvascular endothelial function and the cardiac function despite persistent hypertension in rats. The beneficial effects involve at the level of blood vessels an improved balance between the eNOS pathway and the AT1R/SGLT1/2 pro-oxidant pathway, a blunted local angiotensin system and an attenuation of pro-atherosclerotic and pro-remodeling responses, and at the level of the LV improved diastolic function, reduced pro-fibrotic and pro-remodeling responses, and also less macrophages infiltration. Recently, Ang II has been shown to be a strong inducer of SGLT1 and 2 expression in endothelial cells to perpetuate the formation of ROS, which in turn, leads to endothelial dysfunction and the subsequent development of the pro-atherosclerotic responses.¹¹ Thus, the ability of the empagliflozin treatment to blunt the stimulatory effect of Ang II-induced hypertension on SGLT1 and 2 pathways in the endothelium of both large arteries and microvessels including the coronary microcirculation contributes to explain the beneficial effects on the cardiovascular system.

Several large-scale trials have in a consistent manner shown that SGLT2i exert a favorable effect on the heart and the kidney that cannot be explained by their moderate glucose-lowering effect.^{2, 3} These benefits include a lower risk of cardiovascular death or hospitalization for HF, and a reduced progression of chronic kidney disease in patients with type 2 diabetes, and in patients with HF and a reduced ejection fraction regardless of the presence or absence of diabetes.^{2, 3} Besides improved heart and kidney function, and of importance, SGLT2i resulted also in an improvement in quality-of-life and showed excellent tolerability in patients with HFrEF.^{14, 15} However, the mechanisms of the cardiac benefits remain unclear.

Recent experimental studies have indicated that empagliflozin improves LV systolic function, ameliorates adverse cardiac remodeling, and enhances myocardial energetics in a nondiabetic porcine model of HF.^{7, 8} Besides the systolic function, SGLT2i also improved the LV diastolic function in genetic models of type 2 diabetes including the ob/ob mice and the db/db mice, and this effect is associated with reduced LV hypertrophy and interstitial fibrosis.^{16, 17} An improved LV diastolic function is also observed in a nondiabetic HFrEF porcine model after myocardial infarction and is associated with reduced LV and cardiomyocyte stiffness,⁸ and in a nondiabetic deoxycorticosterone acetate hypertensive salt model of HFpEF in rats associated with reduced LV mass, improved wall stress and hemodynamics.¹⁸ Moreover, a study with myocardial fibers from patients and rats with diastolic HF indicated that empagliflozin causes direct beneficial effects on the myocardium by improving of LV diastolic stiffness and hence diastolic function.¹⁹

Left ventricle diastolic dysfunction is highly prevalent in T2D patients, and is a major causative factor that is associated with adverse outcomes in HFpEF, and also predicts adverse prognosis in HFrEF.^{20, 21} Thus, an improvement of diastolic function with SGLT2i is of major clinical importance. The development of diastolic dysfunction involves several pathophysiological mechanisms including an increased myocardial collagen deposition that promotes interstitial myocardial fibrosis and increased LV stiffness, inflammation and a pro-oxidant state that causes coronary microvascular endothelial dysfunction leading to a reduced NO and cyclic GMP-protein kinase G signalling in adjacent cardiomyocytes. As a consequence, the phosphorylation level of titin, the major molecular spring within the cardiomyocyte, is decreased thereby promoting stiffening of cardiomyocytes.^{20, 22}

Both clinical and experimental studies have evidenced that the angiotensin system has a central role in the development of HF and LV diastolic dysfunction, endothelial dysfunction

in response to cardiovascular risk factors such as hypertension, inflammation and also in cardiovascular remodeling, fibrosis and stiffness.^{10, 23} The role of the Ang II system in HF and LV diastolic dysfunction is underlined by the clinical benefit provided by therapeutic classes targeting the angiotensin system such as ACE inhibitors, AT1R blockers, as well as mineralocorticoid receptor antagonists.²⁴ The deleterious impact of Ang II on the CV system involves the activation of AT1R and the subsequent stimulation of NADPH oxidase to promote an increased formation of ROS, which, in turn, induces pro-atherosclerotic, pro-inflammatory and pro-remodeling responses.¹⁰ The pro-oxidant response will also induce endothelial dysfunction by reducing the bioavailability of NO and by promoting uncoupling of eNOS, and as a consequence eNOS will no longer generate NO but instead superoxide anions thereby further exaggerating oxidative stress.²⁵

This group has recently highlighted that SGLT1 and 2 are part of a feed-forward loop enhancing the deleterious impact of Ang II of the endothelial function.^{11, 26} Indeed, inhibition of the local Ang II system prevented the high glucose-induced redox-sensitive expression of SGLT1 and 2 expression in coronary endothelial cells that leads to the subsequent induction of endothelial senescence and dysfunction.²⁶ Moreover, exposure of coronary endothelial cells and isolated aorta of rats to Ang II caused an up-regulation of SGLT1 and 2 expression that is mediated by the AT1R/NADPH oxidase/ROS pathway.¹¹ Furthermore, since inhibition of SGLT2 effectively prevented the Ang II-induced sustained pro-oxidant response, the up-regulation of the local angiotensin system and the induction of endothelial dysfunction, the AT1R/NADPH oxidase/SGLT1 and 2 pathway perpetuates the deleterious activator signal. It is also consistent with the fact that SGLT2i prevented the Ang II-induced upregulation of SGLT1 and 2 expression in endothelial cells demonstrating a feed-forward loop.¹¹

The present findings indicate that the Ang II-mediated hypertension in the rat has a deleterious impact on the vasculature as indicated by an endothelial dysfunction, an excessive activation of the local Ang II system, a pro-oxidant response, and expression of pro-atherosclerotic, pro-remodeling and pro-fibrotic markers, and also on the heart with diastolic dysfunction and pro-remodeling and pro-fibrotic responses as well as macrophages infiltration. All these effects were effectively prevented by the empagliflozin treatment despite persistent hypertension. The characterization of the underlying mechanism has indicated that the empagliflozin treatment markedly reduced the Ang II-induced generation of ROS in both the macro and microvessels and normalized the eNOS expression and activity as indicated by nitrotyrosine levels similar to those in the control group. It also resulted in the normalization of levels of Ang II-stimulated vascular targets that are controlled by oxidative stress including pro-atherosclerotic, pro-fibrotic and pro-remodeling makers and LV targets including pro-fibrotic and pro-remodeling responses and cardiomyocytes hypertrophy. The beneficial effect of the empagliflozin treatment resulted also with the normalization of the SGLT1 expression level, and of the SGLT-1 and -2 responses in the endothelium of both the macro and microcirculation that were upregulated in the Ang II-induced hypertensive group. Since increased SGLT1 and 2 levels mediate the sustained Ang II-induced formation of ROS in endothelial cells that is dependent on extracellular glucose and Na⁺,¹¹ it implies that the Ang II/NADPH oxidase/SGLT1 and SGLT2 pro-oxidant pathway contributes to perpetuate the pathological activation of the cardiovascular system.

In good agreement with the present findings, the empagliflozin treatment normalized the endothelial function and reduced oxidative stress in aortic vessels of a streptozotocin rat model of type 1 diabetes,²⁷ and improved the NO-mediated endothelium-dependent relaxations and prevented endothelium-dependent contractile responses to acetylcholine a rat

model of metabolic syndrome, the ZSF1 rat.⁹ In addition, SGLT2i improved markers of oxidative stress and fibrosis in the heart of a genetic model of type 2 diabetes, the KK-Ay mice, through inhibition of the transforming growth factor β /Smad pathway and activation of the Nrf2/ARE signaling.²⁸

The ability of SGLT2i to maintain a protective endothelial eNOS/ROS balance might also involve blockage of inflammatory macrophages infiltration as observed in the renal tissue associated with reduced renal fibrosis,²⁹ and, as shown in the present study, in the LV of Ang II-treated hypertensive rats. Indeed, pro-inflammatory factors such as TNF α caused oxidative stress in cardiac microvascular endothelial cells leading to reduced bioavailability of NO and, as a consequence, resulted in impaired contractility and relaxation of cardiomyocytes.³⁰

Conclusions

The present findings indicate that the empagliflozin treatment prevented diastolic dysfunction, cardiac remodeling, fibrosis, infiltration of macrophages, and endothelial dysfunction in Ang II-induced hypertension despite elevated systolic blood pressure. They further suggest that the cardiovascular benefit results from the preservation of the eNOS/ROS balance by preventing the activation of the deleterious Ang II/NADPH oxidase/SGLT1- and 2 pro-oxidant pathway in endothelial cells, thereby allowing endothelial cells to perpetuate their pivotal role in the control of vascular and cardiac homeostasis. Altogether, the findings support the concept that SGLT2 inhibition appears as a promising approach to preserve the diastolic function by preventing endothelial dysfunction in both the macro and coronary microcirculation despite persistent hypertension and regardless of the presence or absence of diabetes.

Supplementary information

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

Appendix S1. Supplementary methods.

Acknowledgements

None

Funding

The study was supported by an unrestricted research grant from Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach, Germany, and by the *Groupe pour l'Enseignement de la Recherche Cardio-vasculaire en Alsace*, France. C. Bruckert was supported by a fellowship from the French Ministry of Education and Research.

References

1. Zelniker TA, Braunwald E. Mechanisms of cardiorenal effects of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Feb 4;75(4):422-34.
2. Zelniker TA, Wiviott SD, Raz I, Im K, Goodrich EL, Bonaca MP, Mosenzon O, Kato ET, Cahn A, Furtado RHM, Bhatt DL, Leiter LA, McGuire DK, Wilding JPH, Sabatine MS. SGLT2 inhibitors for primary and secondary prevention of cardiovascular and renal outcomes in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cardiovascular outcome trials. *Lancet*. 2019 Jan 5;393(10166):31-9.
3. Zannad F, Ferreira JP, Pocock SJ, Anker SD, Butler J, Filippatos G, Brueckmann M, Ofstad AP, Pfarr E, Jamal W, Packer M. SGLT2 inhibitors in patients with heart failure with reduced ejection fraction: a meta-analysis of the EMPEROR-Reduced and DAPA-HF trials. *Lancet*. 2020 Sep 19;396(10254):819-29.
4. Oh CM, Cho S, Jang JY, Kim H, Chun S, Choi M, Park S, Ko YG. Cardioprotective potential of an SGLT2 inhibitor against doxorubicin-induced heart failure. *Korean Cir J*. 2019 Dec;49(12):1183-95.
5. Yurista SR, Silljé HHW, Oberdorf-Maass SU, Schouten EM, Pavez Giani MG, Hillebrands JL, van Goor H, van Veldhuisen DJ, de Boer RA, Westenbrink BD. Sodium-glucose co-transporter 2 inhibition with empagliflozin improves cardiac function in non-diabetic rats with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Eur J Heart Fail*. 2019 Jul;21(7):862-73.
6. Lim VG, Bell RM, Arjun S, Kolatsi-Joannou M, Long DA, Yellon DM. SGLT2 inhibitor, canagliflozin, attenuates myocardial infarction in the diabetic and nondiabetic heart. *JACC Basic Transl Sci*. 2019 Feb;4(1):15-26.

7. Santos-Gallego CG, Requena-Ibanez JA, San Antonio R, Ishikawa K, Watanabe S, Picatoste B, Flores E, Garcia-Ropero A, Sanz J, Hajjar RJ, Fuster V, Badimon JJ. Empagliflozin ameliorates adverse left ventricular remodeling in nondiabetic heart failure by enhancing myocardial energetics. *J Am Coll Cardiol*. 2019 Apr 23;73(15):1931-44.
8. Santos-Gallego CG, Requena-Ibanez JA, San Antonio R, Garcia-Ropero A, Ishikawa K, Watanabe S, Picatoste B, Vargas-Delgado AP, Flores-Umanzor EJ, Sanz J, Fuster V, Badimon JJ. Empagliflozin ameliorates diastolic dysfunction and left ventricular fibrosis/stiffness in nondiabetic heart failure: A multimodality study. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2021 Feb;14(2):393-407.
9. Park SH, Farooq MA, Gaertner S, Bruckert C, Qureshi AW, Lee HH, Benrahla D, Pollet B, Stephan D, Ohlmann P, Lessinger JM, Mayoux E, Auger C, Morel O, Schini-Kerth VB. Empagliflozin improved systolic blood pressure, endothelial dysfunction and heart remodeling in the metabolic syndrome ZSF1 rat. *Cardiovasc Diabetol*. 2020 Feb 18;19(1):19.
10. Montezano AC, Nguyen Dinh Cat A, Rios FJ, Touyz RM. Angiotensin II and vascular injury. *Curr Hypertension Rep*. 2014 Jun;16(6):431.
11. Park SH, Belcastro E, Hasan H, Matsushita K, Marchandot B, Abbas M, Toti F, Auger C, Jesel L, Ohlmann P, Morel O, Schini-Kerth VB. Angiotensin II-induced upregulation of SGLT1 and 2 contributes to human microparticle-stimulated endothelial senescence and dysfunction: protective effect of gliflozins. *Cardiovasc Diabetol*. 2021 Mar 16;20(1):65.
12. Jin X, Yi L, Chen ML, Chen CY, Chang H, Zhang T, Wang L, Zhu JD, Zhang QY, Mi MT. Delphinidin-3-glucoside protects against oxidized low-density lipoprotein-induced mitochondrial dysfunction in vascular endothelial cells via the sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *PLoS One*. 2013;8(7):e68617.

13. Sarr M, Chataigneau M, Martins S, Schott C, El Bedoui J, Oak MH, Muller B, Chataigneau T, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res*. 2006 Sep 1;71(4):794-802.
14. McMurray JJV, DeMets DL, Inzucchi SE, Køber L, Kosiborod MN, Langkilde AM, Martinez FA, Bengtsson O, Ponikowski P, Sabatine MS, Sjöstrand M, Solomon SD. The dapagliflozin and prevention of adverse-outcomes in heart failure (DAPA-HF) trial: baseline characteristics. *Eur J Heart Fail*. 2019 Nov;21(11):1402-11.
15. Packer M, Anker SD, Butler J, Filippatos G, Pocock SJ, Carson P, Januzzi J, Verma S, Tsutsui H, Brueckmann M, Jamal W, Kimura K, Schnee J, Zeller C, Cotton D, Bocchi E, Böhm M, Choi DJ, Chopra V, Chuquiure E, Giannetti N, Janssens S, Zhang J, Gonzalez Juanatey JR, Kaul S, Brunner-La Rocca HP, Merkely B, Nicholls SJ, Perrone S, Pina I, Ponikowski P, Sattar N, Senni M, Seronde MF, Spinar J, Squire I, Taddei S, Wanner C, Zannad F. Cardiovascular and renal outcomes with empagliflozin in heart failure. *N Engl J Med*. 2020 Oct 8;383(15):1413-24.
16. Hammoudi N, Jeong D, Singh R, Farhat A, Komajda M, Mayoux E, Hajjar R, Lebeche D. Empagliflozin improves left ventricular diastolic dysfunction in a genetic model of type 2 diabetes. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2017 Jun;31(3):233-46.
17. Habibi J, Aroor AR, Sowers JR, Jia G, Hayden MR, Garro M, Barron B, Mayoux E, Rector RS, Whaley-Connell A, DeMarco VG. Sodium glucose transporter 2 (SGLT2) inhibition with empagliflozin improves cardiac diastolic function in a female rodent model of diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2017 Jan 13;16(1):9.

18. Connelly KA, Zhang Y, Visram A, Advani A, Batchu SN, Desjardins JF, Thai K, Gilbert RE. Empagliflozin improves diastolic function in a nondiabetic rodent model of heart failure with preserved ejection fraction. *JACC Basic Transl Sci*. 2019 Feb;4(1):27-37.
19. Pabel S, Wagner S, Bollenberg H, Bengel P, Kovács Á, Schach C, Tirilomis P, Mustroph J, Renner A, Gummert J, Fischer T, Van Linthout S, Tschöpe C, Streckfuss-Bömeke K, Hasenfuss G, Maier LS, Hamdani N, Sossalla S. Empagliflozin directly improves diastolic function in human heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2018 Dec;20(12):1690-700.
20. Nagueh SF. Left ventricular diastolic function: Understanding pathophysiology, diagnosis, and prognosis with echocardiography. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2020 Jan;13(1 Pt 2):228-44.
21. Hansen S, Brainin P, Sengeløv M, Jørgensen PG, Bruun NE, Olsen FJ, Fritz-Hansen T, Schou M, Gislason G, Biering-Sørensen T. Prognostic utility of diastolic dysfunction and speckle tracking echocardiography in heart failure with reduced ejection fraction. *ESC Heart Fail*. 2020 Feb;7(1):147-57.
22. Mishra S, Kass DA. Cellular and molecular pathobiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol*. 2021 Jun;18(6):400-23.
23. Pugliese NR, Masi S, Taddei S. The renin-angiotensin-aldosterone system: a crossroad from arterial hypertension to heart failure. *Heart Fail Rev*. 2020 Jan;25(1):31-42.
24. Kjeldsen SE, von Lueder TG, Smiseth OA, Wachtell K, Mistry N, Westheim AS, Hopper I, Julius S, Pitt B, Reid CM, Devereux RB, Zannad F. Medical therapies for heart failure with preserved ejection fraction. *Hypertension*. 2020 Jan;75(1):23-32.
25. Siragusa M, Fleming I. The eNOS signalosome and its link to endothelial dysfunction. *Pflugers Arch*. 2016 Jul;468(7):1125-37.

26. Khemais-Benkhiat S, Belcastro E, Idris-Khodja N, Park SH, Amoura L, Abbas M, Auger C, Kessler L, Mayoux E, Toti F, Schini-Kerth VB. Angiotensin II-induced redox-sensitive SGLT1 and 2 expression promotes high glucose-induced endothelial cell senescence. *J Cell Mol Med.* 2020 Feb;24(3):2109-22.
27. Oelze M, Kröller-Schön S, Welschhof P, Jansen T, Hausding M, Mikhed Y, Stamm P, Mader M, Zinßius E, Agdauletova S, Gottschlich A, Steven S, Schulz E, Bottari SP, Mayoux E, Münzel T, Daiber A. The sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor empagliflozin improves diabetes-induced vascular dysfunction in the streptozotocin diabetes rat model by interfering with oxidative stress and glucotoxicity. *PLoS One.* 2014;9(11):e112394.
28. Li C, Zhang J, Xue M, Li X, Han F, Liu X, Xu L, Lu Y, Cheng Y, Li T, Yu X, Sun B, Chen L. SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart. *Cardiovasc Diabetol.* 2019 Feb 2;18(1):15.
29. Castoldi G, Carletti R, Ippolito S, Colzani M, Barzagli F, Stella A, Zerbini G, Perseghin G, di Gioia CRT. Renal anti-fibrotic effect of sodium glucose cotransporter 2 inhibition in angiotensin II-dependent hypertension. *Am J Nephrol.* 2020;51(2):119-29.
30. Juni RP, Kuster DWD, Goebel M, Helmes M, Musters RJP, van der Velden J, Koolwijk P, Paulus WJ, van Hinsbergh VWM. Cardiac microvascular endothelial enhancement of cardiomyocyte function is impaired by inflammation and restored by empagliflozin. *JACC Basic Transl Sci.* 2019 Sep;4(5):575-91.

Figure legends

Figure 1. Intake of empagliflozin (Empa, 30 mg/kg/day) does not affect the Ang II-induced increase in systolic blood pressure in male rats. Systolic blood pressure is assessed by the tail cuff method. Values are expressed as mean \pm SEM of n = 12 per group. * P < 0.05 vs control group. Statistical analysis is performed by 1-way ANOVA (Bonferroni's *post hoc* test).

Figure 2. The empagliflozin treatment improves the eNOS/ROS balance in both macro and microvessels of Ang II-treated rats. The level of oxidative stress is assessed in aorta (A) and secondary branch of mesenteric artery (B) cryosections from the control, empagliflozin (Empa), Ang II and Ang II + Empa group. In some experiments, sections are incubated with N-acetyl cysteine (NAC, an antioxidant) at 3 mM for 2 h before exposure to dihydroethidium. (C) Aorta cryosections from Ang II rats are treated with either N^o-nitro-L-arginine (L-NA, an inhibitor of NO synthase, 300 μ M), Losartan (Los, an AT1R antagonist, 1 μ M), VAS-2871 (VAS, a NADPH oxidase inhibitor, 1 μ M), sotagliflozin (Sota, a dual SGLT1 and SGLT2 inhibitor, 100 nM) or Empa (a selective SGLT2 inhibitor, 100 nM) for 30 min before dihydroethidium staining. (D to F) Protein immunofluorescence signals are determined in fixed cryosections of the aorta (D, F) and the secondary branch of the mesenteric artery (E). Ethidium fluorescence (A to C), eNOS (D and E) and nitrotyrosine (F) immunofluorescence signals are assessed by confocal microscopy. Results are shown as representative staining (upper panels) and corresponding cumulative data (lower panels). Values are expressed as mean \pm SEM of n = 4 per group. * P < 0.05 vs control group; # P < 0.05 vs Ang II group and § P < 0.05 vs respective control. Statistical analysis is performed by 1-way ANOVA (Bonferroni's *post hoc* test).

Figure 3. The empagliflozin treatment prevents the activation of the local angiotensin system in both macro and microvessels of Ang II-treated rats. (A) to (D) Protein immunofluorescence signals are determined in fixed cryosections of the thoracic aorta (A, C) and the secondary branch of the mesenteric artery (C, D) and assessed by confocal microscopy. Results are shown as representative staining (upper panels) and corresponding cumulative data (lower panels). Values are expressed as mean \pm SEM of n = 4 per group. * $P < 0.05$ vs control group and # $P < 0.05$ vs Ang II group. Statistical analysis is performed by 1-way ANOVA (Bonferroni's *post hoc* test).

Figure 4. The empagliflozin treatment prevents pro-atherosclerotic and pro-remodeling responses in mesenteric microvessels of Ang II-treated rats. (A) to (E) Protein immunofluorescence signals are determined in fixed cryosections of the secondary branch of the mesenteric artery, and assessed by confocal microscopy. Results are shown as representative staining (upper panels) and corresponding cumulative data (lower panels). Values are expressed as mean \pm SEM of n = 4 per group. * $P < 0.05$ vs control group and # $P < 0.05$ vs Ang II group. Statistical analysis is performed by 1-way ANOVA (Bonferroni's *post hoc* test).

Figure 5. The empagliflozin treatment prevents the increased endothelial SGLT1 immunofluorescence signal in the aorta, and the heart and peripheral microvessels, and the SGLT1- and SGLT2-mediated endothelial uptake of anthocyanin in the aorta of Ang II-treated rats. (A to C) Protein immunofluorescence signals are determined in fixed cryosections of the aorta (A), secondary branch of the mesenteric artery (B) and coronary microcirculation of the LV (C). (D) Anthocyanin uptake in aorta cryosections is revealed by Naturstoff Reagent A and quantified by confocal microscopy at 620 nm. Fluorescence signals are assessed by confocal microscopy. Results are shown as representative staining (upper

panels) and corresponding cumulative data (lower panels). Values are expressed as mean \pm SEM of n = 4 per group. * P < 0.05 vs respective control, # P < 0.05 vs Ang II group, ** P < 0.05 vs BCE of the control group, and *** P < 0.05 vs BCE of the Ang II group. Statistical analysis is performed by 1-way ANOVA or by 2-way ANOVA (Bonferroni's *post hoc* test).

Figure 6. The empagliflozin treatment reduces pro-fibrotic and pro-remodeling responses, and cardiac stress in the LV of Ang II-treated rats. (A) Extent of fibrosis determined using Sirius red; (B, C), Protein immunofluorescence signals; (D), Cardiomyocytes cell area determined using wheat germ agglutinin, and (E), infiltration of macrophages as assessed by CD68. All samples are observed by confocal microscopy. Results are shown as representative staining (upper panels) and corresponding cumulative data (lower panels). Values are expressed as mean \pm SEM of n = 3-4 per group. * P < 0.05 vs control group and # P < 0.05 vs Ang II group. Statistical analysis is performed by 1-way ANOVA (Bonferroni's *post hoc* test).

Material and Methods

Materials

Empa was provided by Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG (Biberach and der Riss, Germany). Ang II was from Enzo Life Sciences. Other chemicals were from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie SARL, St Quentin Fallavier, France).

Ethics statement

All animal care and experimental procedures complied with the rules of the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and the French Legislation. The study was approved by the local animal Ethic Committee (Comité Régional d’Ethique en Matière d’Expérimentation Animale de Strasbourg and authorized by the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation (authorization ##15155-201805181704700).

Animals and study design

Forty-eight male Wistar rats (11-weeks old) from Janvier labs (Le Genest-Saint-Isle, France) were randomly divided into four groups: control, Empa (30 mg/kg/day), Ang II (0.4 mg/kg/day) and Ang II (0.4 mg/kg/day) + Empa (30 mg/kg/day). Empa treatment was provided in the diet for five weeks. Rats were housed in a temperature and light controlled room with free access to tap water and fed *ad libitum* with standard diet +/- Empa. After one week, rats underwent sham surgery (sham rats) or surgery with subcutaneous implantation in the interscapular region of an osmotic mini-pump (Azlet 2004, Azlet, Charles River, Saint-Germain-sur-l’Arbresle, France) infusing Ang II (0.4 mg/kg/day) for four weeks. After five weeks of treatment, rats were euthanized by intraperitoneal injection of an overdose of

ketamine (120 mg/kg, i.p.) and xylazine (20 mg/kg, i.p.) followed by heart puncture for blood collection and collections of organs.

Systolic blood pressure measurement

Systolic blood pressure was measured in awoken rats by the non-invasive tail-cuff sphygmomanometry method weekly for 4 weeks using the blood pressure analysis system (BP-2000, Serie II, Visitech Systems, Bioseb, Vitrolles, France). Blood pressure was recorded by one cycle of twenty measurements. Prior to start blood pressure monitoring, rats were trained daily for one week to get used to the system and experimental procedures.

Biochemical analysis on blood and urine samples

One day before sacrifice, rats were placed in metabolic cages for 24 h in order to collect urine samples. Blood glucose and ketone levels were assessed in a blood drop from the tail from overnight fasted rats using the blood glucose and β -ketone meter (GLUCOFIX[®] Premium, A. Menarini diagnostics). Blood samples were collected by terminal cardiac puncture in heparin containing tubes and plasma was prepared by a centrifugation at 7,000 rpm for 10 min at room temperature. The aliquots were then frozen at -80 °C until use. Plasma dosages were performed using an Advia 20400 automatic analyzer (Siemens Healthineers).

Echocardiography

Transthoracic echocardiography was performed after four weeks of treatment one day before euthanasia. Rats were anaesthetized by inhalation of isoflurane (5 % for the induction and 1.5 % for maintenance, 1 L/min of air and 1 L/min of O₂). Images were acquired using the Phillips 5500 machine with a 12 MHz transducer probe. Two dimensional long-axis images of the left ventricle in parasternal long- and short-axis views with M-mode tracings were recorded through anterior and posterior left ventricle walls at mid-papillary muscle level.

Morphological aspects of the cardiac LV were determined: LV end-diastolic diameter (LVEDD), LV end-systolic diameter (LVESD), interventricular septal thickness (IVSTd) and LV posterior wall thickness in diastole (LVPWT). LV mass was derived by cubic method. Fractional shortening (FS), cardiac output (CO), and left ventricle mass (LVEF) were calculated to investigate the LV systolic function. In addition, mitral early diastolic velocity (E) was measured at the mitral leaflet tips on pulse wave Doppler and early annular tissue Doppler velocity (e') was measured by tissue Doppler. In order to assess the diastolic function, E/e' ratio and isovolumic relaxation time (IVRT) were obtained.

Vascular level of reactive oxygen species determination

The level of reactive oxygen species was assessed in both thoracic aorta and secondary branch mesenteric artery. Briefly, thoracic aorta rings and secondary mesenteric artery segments of all four groups of rats were embedded in Frozen Section Compound (FSC 22, Leica Biosystems, Nanterre, France), then frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C until use. The unfixed frozen tissues were cut into cryosections (25 µm) and treated with the redox-sensitive fluorescent dihydroethidium dye (2.5 µM) for 30 min at 37 °C in a light-protected humid chamber. Some sections were treated with N-acetylcysteine (2 mM) for 2 h or with

either N^o-nitro-L-arginine (L-NA, an inhibitor of NO synthase, 300 μM), Losartan (Los, an AT1R antagonist, 1 μM), VAS-2871 (VAS, a NADPH oxidase inhibitor, 1 μM), Sota (100 nM) or Empa (100 nM) for 30 min at 37 °C before dihydroethidium staining. Cryosections were then washed three times in PBS and then mounted in Dako fluorescence mounting medium (fluorescence editing medium, Dako, Agilent Technologies France, Les Ulis, France) and cover-slipped before being examined by confocal microscopy (Leica TCS SPE). Quantification of the reactive oxygen species signal was performed by using ImageJ software (Version 7) and mean intensities were expressed as arbitrary densitometry units.

Immunofluorescence determination of target proteins

Segments of the aorta, the secondary branch of mesenteric artery and LV were removed, embedded in OCT compound (FSC 22, Leica Biosystems, Nanterre, France) and snap-frozen in liquid nitrogen. Frozen arteries were cut into cryosections of 14 μm. Sections were air-dried for 20 min and stored at -80 °C until use. Sections were first fixed with paraformaldehyde at 4% for 30 min, washed and treated with 1% BSA in PBS containing 0.1% Triton x100 for 30 min at room temperature to block non-specific binding. Sections were then incubated overnight at 4 °C with an antibody directed against either eNOS (1:100 Transduction Laboratories; BD610297), AT1 receptor (AT1R; 1:100; Abcam; ab124505), angiotensin-converting enzyme (ACE; 1:100; LS-bio; LS353970), Nitrotyrosine (1:300; Millipore; 05-233), VCAM-1 (1:200; Abcam; ab215380), MCP-1 (1:100; Abcam; ab9669), Collagen I (1:100; Abcam; ab34710), MMP-2 (1:100 ; Abcam; ab86607), MMP-9 (1:100; Abcam; ab38898), SGLT1 (1:100; Abcam; ab14685), ANP (1:100; Santa-Cruz; sc). Sections were then washed with PBS, incubated with the secondary antibody (Alexa 637-conjugated goat anti-rabbit IgG or Alexa 637-conjugated goat anti-mouse IgG, Invitrogen) diluted

(1:400) in the same buffer for 1 h at room temperature in the dark, and washed before being mounted in Dako fluorescence mounting medium (fluorescence editing medium, Dako, Agilent Technologies France, Les Ulis, France) and cover-slipped. For negative controls, primary antibodies were omitted. The samples were observed using a confocal laser-scanning microscope (Leica TCS SPE) with x20 magnification lens. Quantification of proteins levels was performed by using ImageJ software.

Anthocyanin uptake

The localization and activity of SGLT1 and 2 in the arterial wall was assessed indirectly based on the preferential uptake of anthocyanin like delphinidin-3-*O*-glucoside in endothelial cells, which is mediated by SGLTs.¹⁸ For this purpose, cryosections of 14 μm of the thoracic aorta were incubated with Sota (100 nM) or Empa (100 nM) for 5 min before being exposed to blackcurrant anthocyanins (blackcurrant extract, BCE, 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$; composition: delphinidin-3-*O*-glucoside 17.5 ± 0.7 , delphinidin-3-*O*-rutinoside 76.3 ± 1.8 , cyanidin-3-*O*-glucoside 6.1 ± 0.1 , cyanidin-3-*O*-rutinoside 38.8 ± 0.2 , peonidin-3-*O*-glucoside 0.05 ± 0.00 , peonidin-3-*O*-rutinoside 0.3 ± 0.1 , peonidin 7.2 ± 0.1 mg/g) for 3 min at 37 °C. Thereafter, the slides were washed two times with PBS before the incubation with the reagent diphenylborinic acid 2-aminoethyl ester (2-ABP or Naturstoff Reagent A) solution at 0.4% for 5 min at 37 °C, which interacts with anthocyanins to give a fluorescent signal. Slides were then washed two times with PBS, protected from light and dried. The cryosections were mounted in Dako fluorescence mounting medium (fluorescence editing medium, Dako, Agilent Technologies France, Les Ulis, France) and cover slipped. The samples were observed using a confocal laser-scanning microscope (Leica TCS SPE) with

x20 magnification lens. Quantification of anthocyanin uptake levels was performed by using ImageJ software.

Cardiomyocytes area measurement

Frozen LV were cut into cryosections at 10 μm and air-dried for 20 min. Sections were first fixed with paraformaldehyde at 4% for 15 min at room temperature and washed 3x5 min in PBS. The membranes were then dissolved in a permeabilization buffer (0.2% Triton x100 in PBS) for 1 h and the sections were washed 3x2 min with PBS-Triton-Buffer (0.05% Triton x100 in PBS). Nonspecific fluorophore binding sites were blocked with a blocking buffer for 1 h (1% BSA in PBS containing 0.05% Triton x100). Sections were then stained with a wheat germ agglutinin (WGA, 5 mg, Eurobio Scientific) solution (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 1 h at 37 °C in the dark. Sections were washed 3x2 min in PBS-Triton-Buffer, counterstained with DAPI (1:1,000) for 1 min, washed 3x2 min with PBS and coverslipped with DAKO mounting medium (fluorescence editing medium, Dako, Agilent Technologies France, Les Ulis, France). The samples were observed using a confocal laser-scanning microscope (Leica TCS SPE) with x20 magnification lens. Cardiomyocytes area quantification was performed by using ImageJ software.

Histological analyses

To evaluate fibrosis, frozen LV were cut into cryosections at 10 μm and air-dried for 20 min. They were incubated with 0.1% solution of Sirius red F3BA in saturated aqueous solution of picric acid for one h at room temperature. Sections were observed using an inverted microscope with transmitted light (AMG, EVOS XL CORE).

To assess macrophage infiltration, hearts were fixed in paraformaldehyde (4%) and then embedded in paraffin. Sections (4 μ m) were stained with primary antibody directed against rat CD68 (clone ED1, 1:500, Bio-Rad, MCA341GA). An appropriate biotinylated secondary antibody was used according to the manufacturer's instructions, using a VECTASTAIN ABC kit (Vector) and the DAB reagent (peroxidase substrate kit, vector) as substrate, and counterstained with hematoxylin.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Between group differences were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferoni's multiple comparison. All statistics were performed using GraphPad Prism software (Version 7 for Windows, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A *P* value inferior to 0.05 was regarded as statistically significant.

Table 1: Effect of empagliflozin treatment on body weight and on the weight of different organs in control and Ang II-treated rats.

	Control	Empa	Ang II	Ang II + Empa
Body weight (g)	367.00 ± 12.00	360.00 ± 12.00	379.00 ± 12.00	340.00 ± 13.00 [#]
Tibia length (mm)	46.61 ± 0.57	45.60 ± 1.19	47.36 ± 1.07	48.27 ± 0.75
Heart/tibia (mg/mm)	25.92 ± 0.88	24.69 ± 0.17	29.66 ± 1.26*	26.66 ± 0.30
LV + septum/tibia (mg/mm)	12.56 ± 1.01	11.88 ± 0.76	14.05 ± 0.90	12.82 ± 0.60
Right ventricle/tibia (mg/mm)	7.30 ± 0.41	6.09 ± 0.60	9.26 ± 0.60*	7.98 ± 0.53
Liver/tibia (mg/mm)	208.90 ± 5.28	242.31 ± 17.48	209.81 ± 6.84	199.00 ± 7.12
Left kidney/tibia (mg/mm)	27.82 ± 0.86	31.29 ± 1.30*	26.53 ± 1.10	28.46 ± 1.46
Right kidney/tibia (mg/mm)	28.88 ± 0.05	32.66 ± 1.32*	26.62 ± 1.11	29.19 ± 0.92

Organs are weighted and indexed to the respective tibial length. Values are expressed as mean ± SEM of n = 9 - 11 per group. **P* < 0.05 vs control group and [#]*P* < 0.05 vs Ang II group. Statistical analysis is performed by 1-way ANOVA (Bonferroni's *post hoc* test). LV, left ventricle.

Table 2: The empagliflozin treatment prevents the Ang II-induced hypertension related diastolic dysfunction.

	Control	Empa	Ang II	Ang II + Empa
LV diastolic function				
e' velocity (cm/s)	8.49 ± 0.37	7.79 ± 0.40	6.48 ± 0.41*	7.73 ± 0.44
E/e' (ratio)	11.98 ± 0.44	12.93 ± 0.59	17.54 ± 0.99*	14.11 ± 0.94 [#]
IVRT (s)	0.019 ± 0.001	0.019 ± 0.001	0.015 ± 0.001*	0.020 ± 0.001 [#]
LV systolic function				
LVEF (%)	80.04 ± 1.91	80.20 ± 1.96	80.58 ± 2.04	78.45 ± 2.14
FS (%)	50.94 ± 2.02	50.66 ± 2.19	51.18 ± 2.23	49.07 ± 2.25
CO (mL/min)	178.50 ± 22.70	170.30 ± 17.66	192.90 ± 13.72	194.70 ± 33.83
SV (mL)	0.49 ± 0.06	0.47 ± 0.04	0.54 ± 0.04	0.53 ± 0.09
Cardiac structure				
IVSTd (mm)	1.55 ± 0.07	1.63 ± 0.06	2.10 ± 0.11*	1.82 ± 0.07
LV mass (mg)	624.50 ± 32.42	602.30 ± 32.76	824.00 ± 48.85*	767.40 ± 39.35

All the cardiac parameters are measured by echocardiography. Values are expressed as mean ± SEM of n = 10 - 12 per group. **P* < 0.05 vs control group and [#]*P* < 0.05 vs Ang II group. Statistical analysis is performed by 1-way ANOVA (Bonferroni's *post hoc* test). LV, left ventricle; IVRT, isovolumic relaxation time; LVEF, left ventricular ejection fraction; FS, fractional shortening; CO, cardiac output; SV, stroke volume; IVSTd, interventricular septum thickness in diastole.

Figure 1

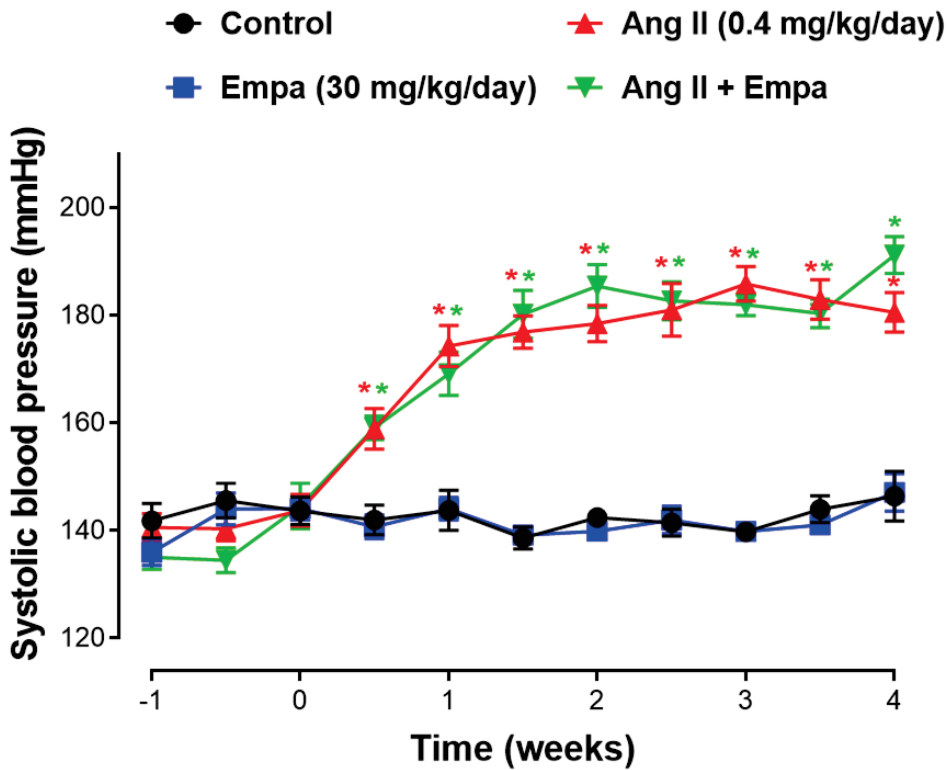


Figure 2

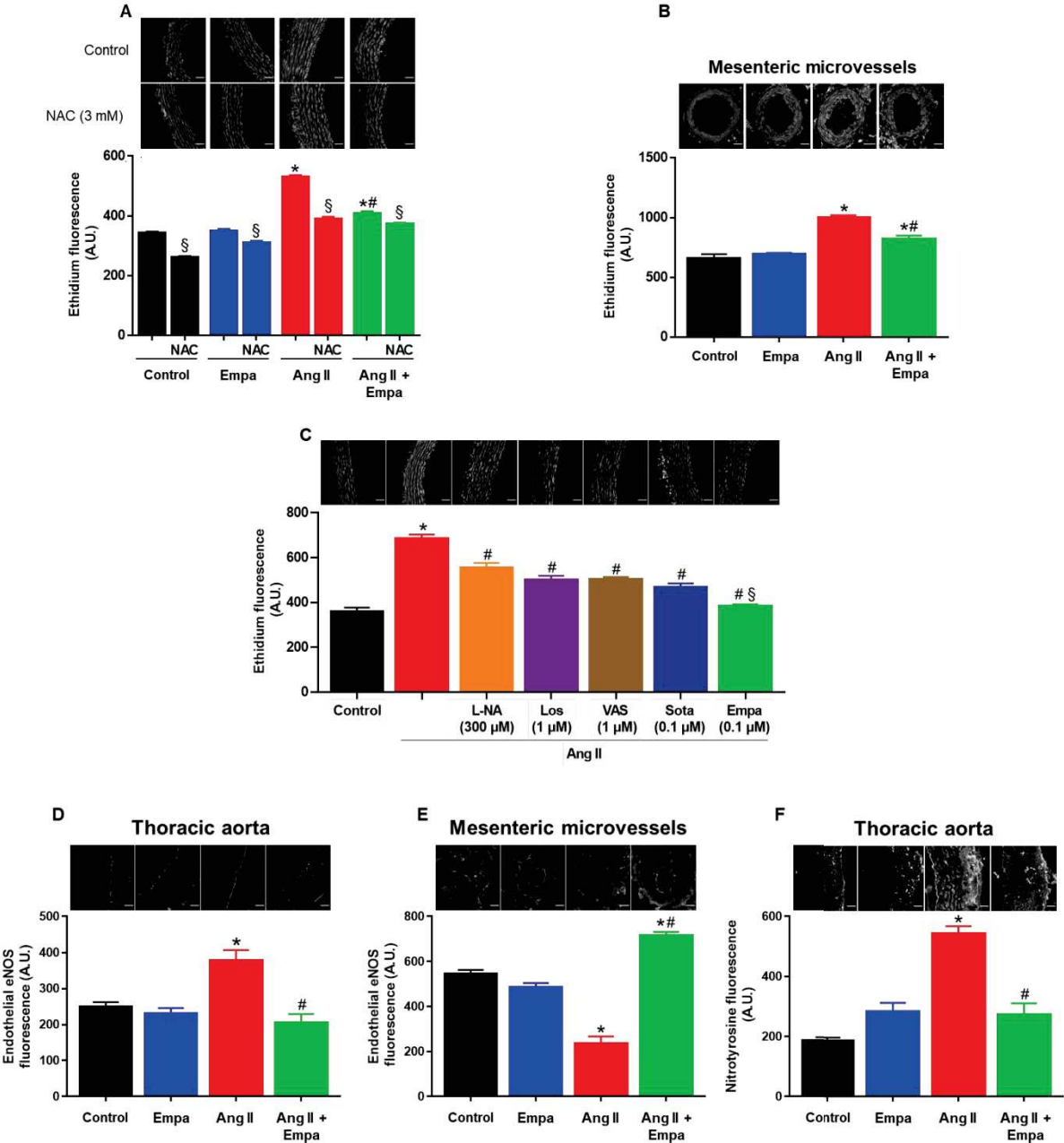


Figure 3

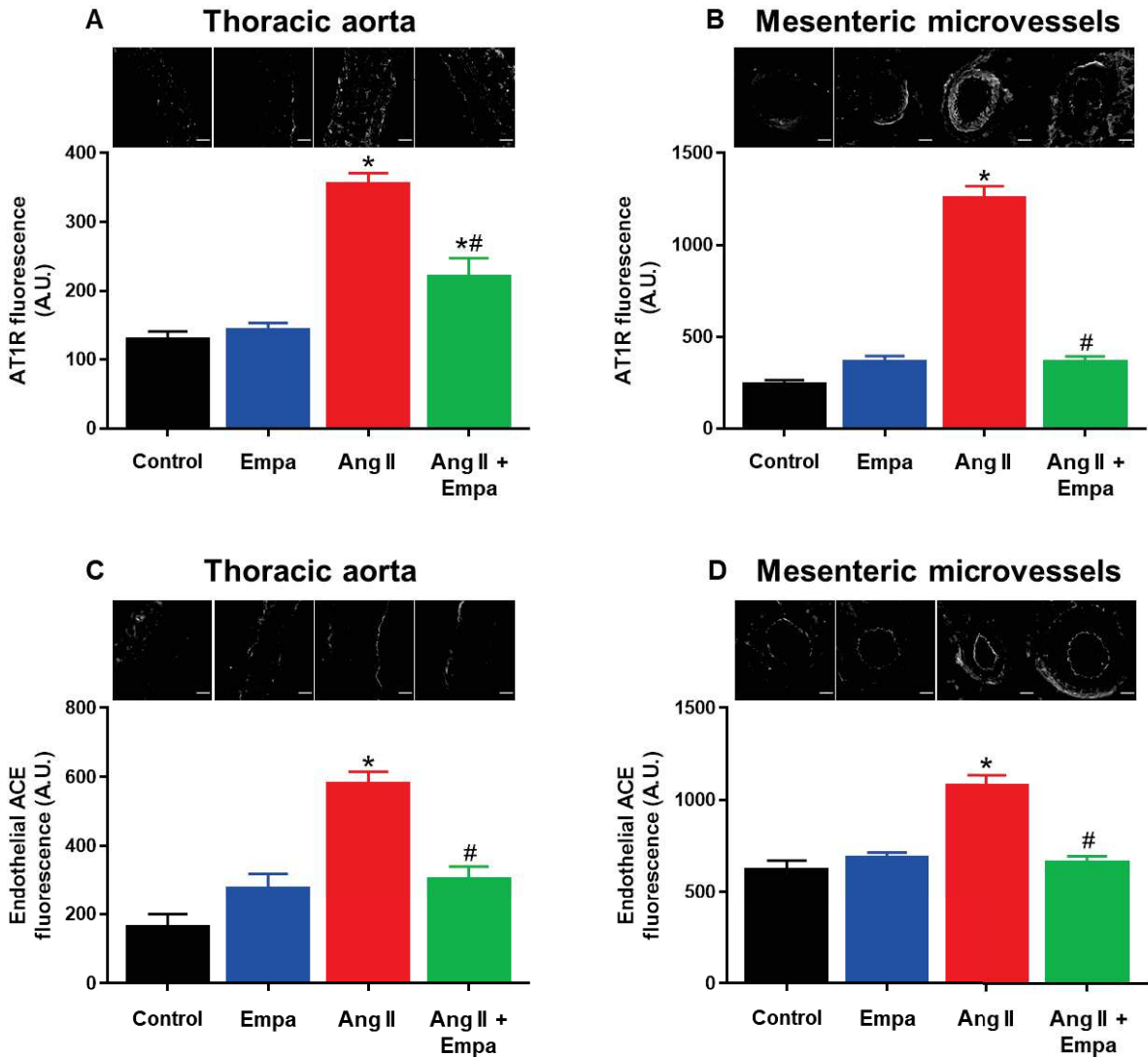


Figure 4

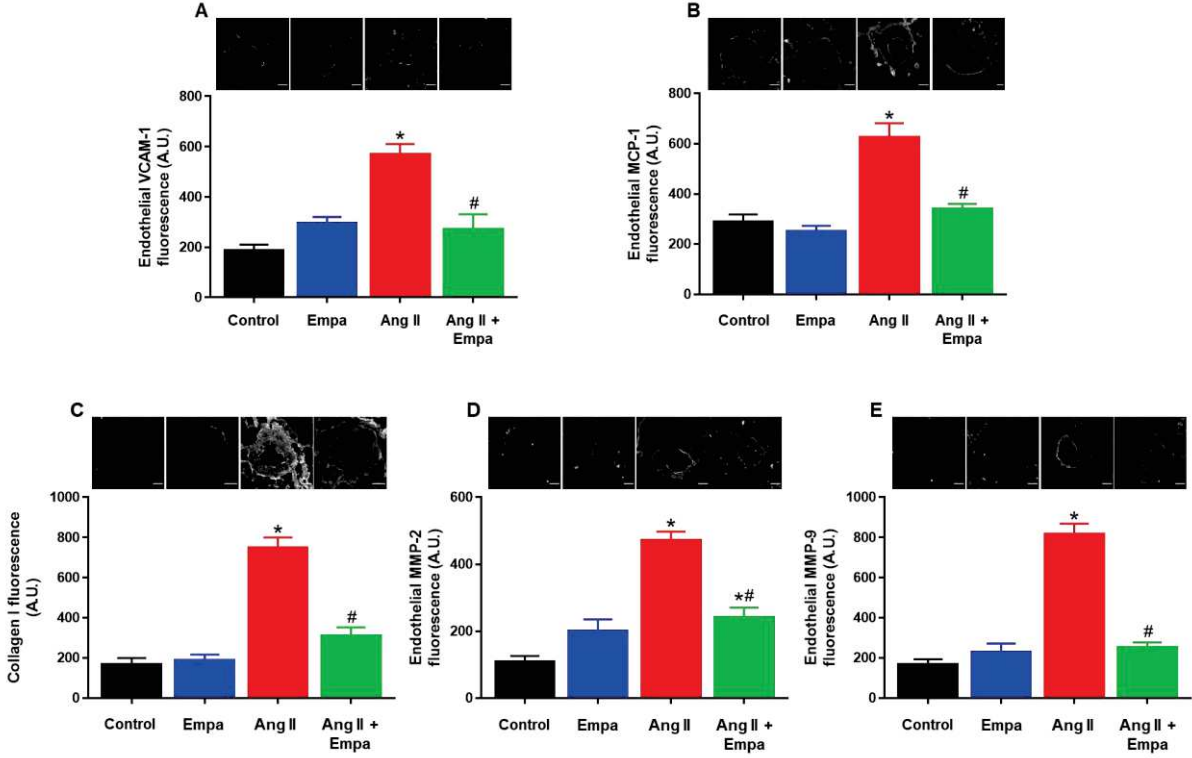


Figure 5

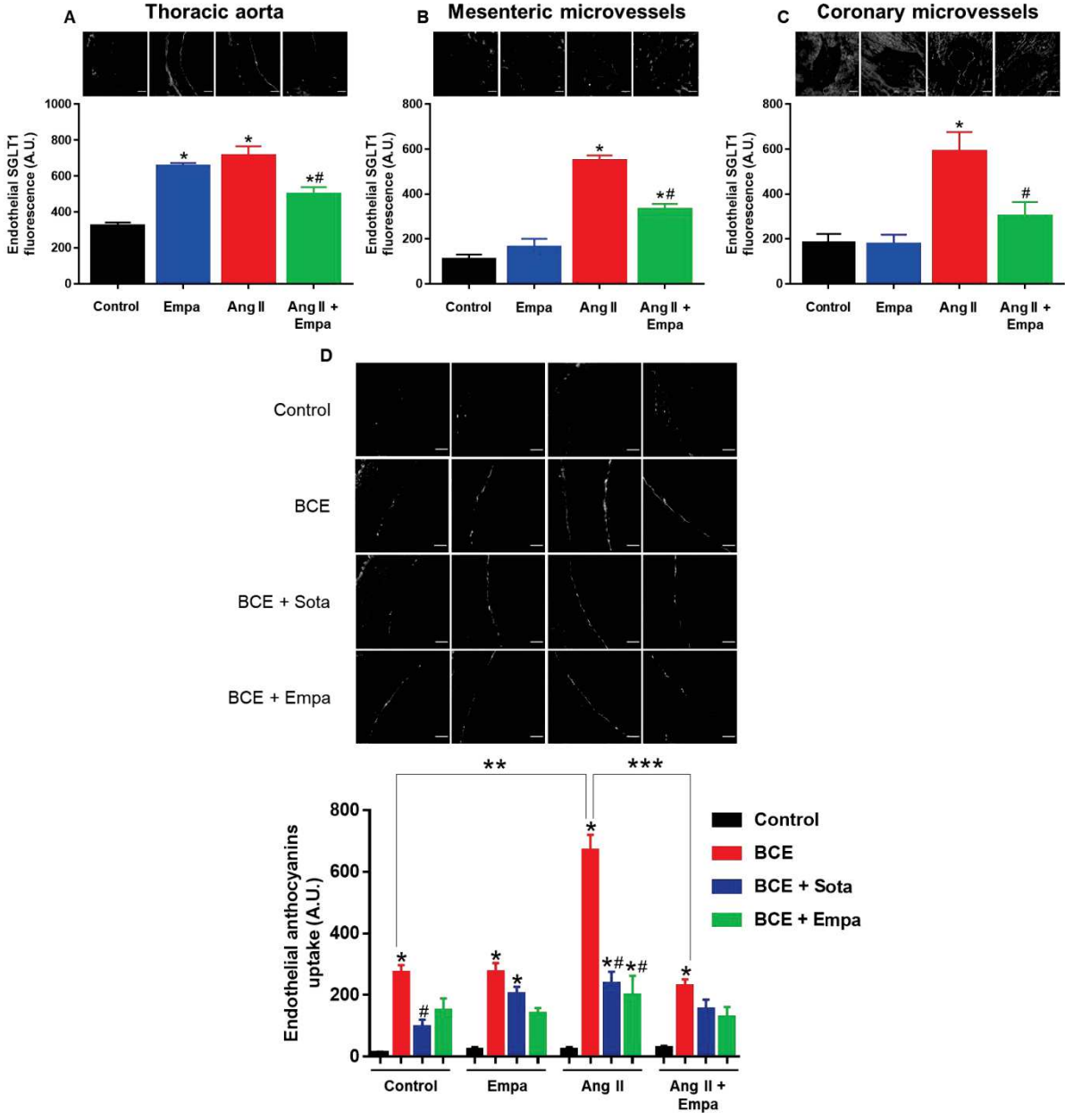
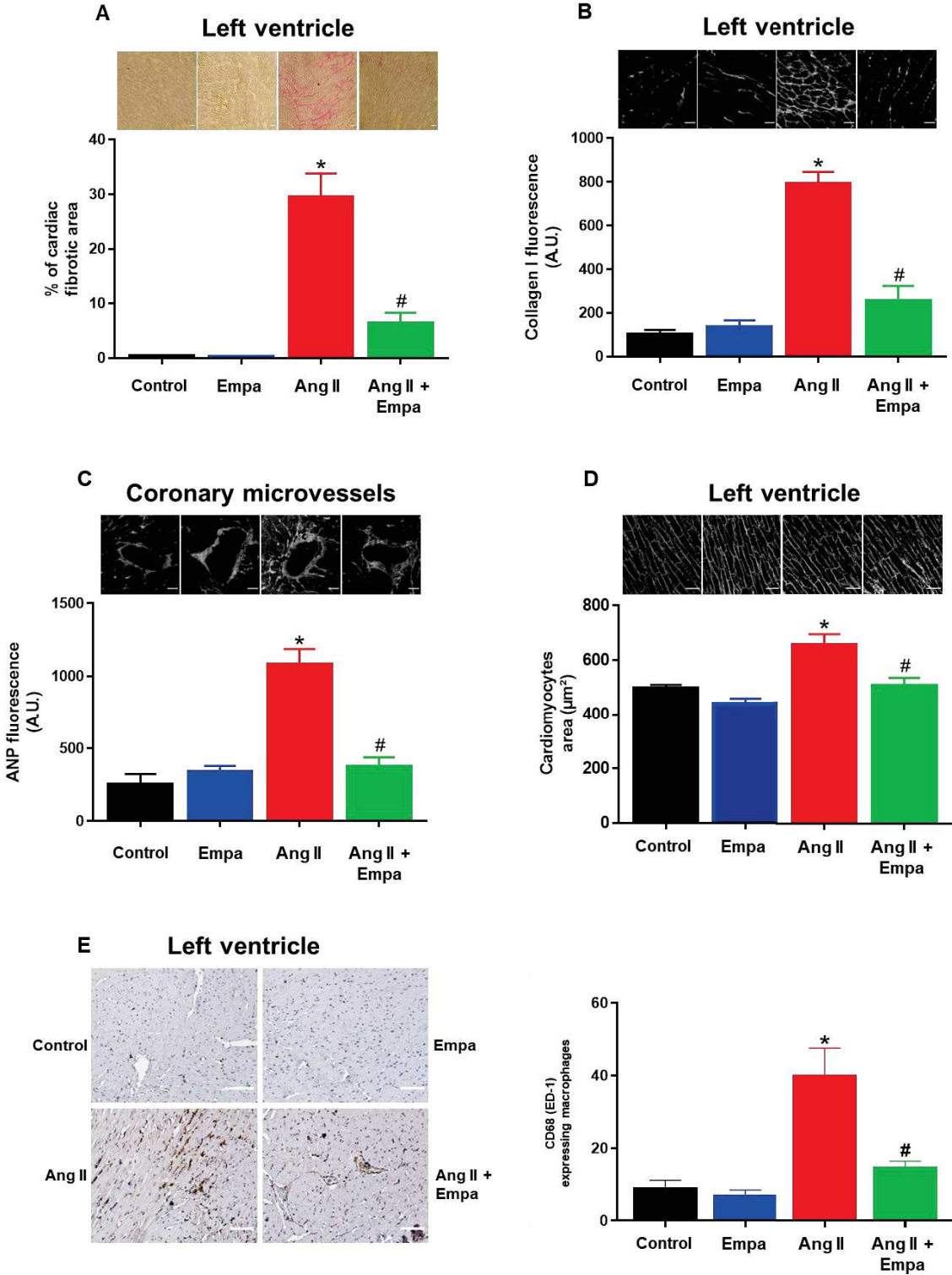


Figure 6



Article annexe

ORIGINAL INVESTIGATION

Open Access



Empagliflozin improved systolic blood pressure, endothelial dysfunction and heart remodeling in the metabolic syndrome ZSF1 rat

Sin-Hee Park¹, Muhammad Akmal Farooq¹, Sébastien Gaertner^{1,2}, Christophe Bruckert¹, Abdul Wahid Qureshi¹, Hyun-Ho Lee¹, Djamel Benrahla¹, Brigitte Pollet³, Dominique Stephan^{1,2}, Patrick Ohlmann⁴, Jean-Marc Lessinger⁵, Eric Mayoux⁶, Cyril Auger¹, Olivier Morel^{1,4} and Valérie B. Schini-Kerth^{1*}

Abstract

Background: Empagliflozin (empa), a selective sodium–glucose cotransporter (SGLT)2 inhibitor, reduced cardiovascular mortality and hospitalization for heart failure in patients with type 2 diabetes at high cardiovascular risk independent of glycemic control. The cardiovascular protective effect of empa was evaluated in an experimental model of metabolic syndrome, the obese ZSF1 rat, and its lean control.

Methods: Lean and obese ZSF1 rats were either non-treated or treated with empa (30 mg/kg/day) for 6 weeks. Vascular reactivity was assessed using mesenteric artery rings, systolic blood pressure by tail-cuff sphygmomanometry, heart function and structural changes by echocardiography, and protein expression levels by Western blot analysis.

Results: Empa treatment reduced blood glucose levels from 275 to 196 mg/dl in obese ZSF1 rats whereas normoglycemia (134 mg/dl) was present in control lean ZSF1 rats and was unaffected by empa. Obese ZSF1 rats showed increased systolic blood pressure, and blunted endothelium-dependent relaxations associated with the appearance of endothelium-dependent contractile responses (EDCFs) compared to control lean rats. These effects were prevented by the empa treatment. Obese ZSF1 rats showed increased weight of the heart and of the left ventricle volume without the presence of diastolic or systolic dysfunction, which were improved by the empa treatment. An increased expression level of senescence markers (p53, p21, p16), tissue factor, VCAM-1, SGLT1 and SGLT2 and a down-regulation of eNOS were observed in the aortic inner curvature compared to the outer one in the control lean rats, which were prevented by the empa treatment. In the obese ZSF1 rats, no such effects were observed. The empa treatment reduced the increased body weight and weight of lungs, spleen, liver and perirenal fat, hyperglycemia and the increased levels of total cholesterol and triglycerides in obese ZSF1 rats, and increased blood ketone levels and urinary glucose excretion in control lean and obese ZSF1 rats.

Conclusion: Empa reduced glucose levels by 28% and improved both endothelial function and cardiac remodeling in the obese ZSF1 rat. Empa also reduced the increased expression level of senescence, and atherothrombotic markers at arterial sites at risk in the control lean, but not obese, ZSF1 rat.

Keywords: Empagliflozin, SGLT2, Endothelial function, Heart function, Heart structure, Senescence, ZSF1, Metabolic syndrome

*Correspondence: valerie.schini-kerth@unistra.fr

¹ INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR 1260, Regenerative Nanomedicine, FMTS, Strasbourg, France
Full list of author information is available at the end of the article

Background

Metabolic syndrome is a critical health state comprising central obesity, dyslipidemia, hypertension, and glucose intolerance that carries increased risk for both type 2



© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

diabetes (T2D) and cardiovascular disease (CVD) [1–4]. Over the past three decades, the prevalence rate of metabolic syndrome has increased rapidly with age worldwide and its prevalence ranges from <10% up to 84% [5, 6]. The direct and indirect effects of hyperglycemia in T2D on the vascular tree promote both macrovascular complications including stroke, coronary artery diseases, and peripheral vascular diseases, and microvascular complications including diabetic retinopathy, nephropathy, and neuropathy [7]. One of the earliest impact of hyperglycemia on the cardiovascular system leads to the induction of an endothelial dysfunction characterized by a reduced nitric oxide (NO) component and often also endothelium-dependent hyperpolarization (EDH) component, and the induction of endothelium-dependent contractile responses (EDCFs) [8–14]. Even though the entire vascular tree is subjected to cardiovascular risk factors, phenotypic alterations leading to a dysfunctional endothelium are revealed initially at specific regions of arteries such as curvatures and bifurcations, where disturbed flow and low shear stress take place and which are prone to early atherogenesis. Senescent endothelial cells (ECs), which are characterized by endothelial nitric oxide synthase (eNOS) down-regulation and a reduced formation of NO, are observed in the human aortic arch [15] and coronary artery at sites overlying atherosclerotic plaques [16]. The fact that the selective expression of the senescence marker p53 in the endothelium leads to diminished endothelium-dependent relaxations and NO formation in aortic rings of rats [17] suggests that the induction of cellular senescence acts as a critical upstream signaling pathway to promote endothelial dysfunction.

Gliflozins including empagliflozin, dapagliflozin, and canagliflozin are a novel class of antidiabetic agents used for the treatment of T2D that selectively inhibit the sodium–glucose cotransporter (SGLT)2 to prevent glucose reabsorption in the renal proximal tubule. In the cardiovascular EMPA-REG OUTCOME trial including 7020 T2D patients with established CVD, empagliflozin reduced cardiovascular death by 38% and heart failure (HF) hospitalization by 35% [18]. In T2D patients with established CVD, canagliflozin reduced the composite of cardiovascular cause of death including nonfatal myocardial infarction or nonfatal stroke by 14% and HF hospitalization by 33% [19], and dapagliflozin lowered the rate of cardiovascular death or HF hospitalization, with a 27% lower rate of HF hospitalization [20]. Subsequent analysis of the EMPA-REG OUTCOME data indicated that the cardioprotective effect of empagliflozin appears to be independent of glycemic control [21], suggesting that mechanisms, in addition to glycemic control, are involved. Such a concept is also supported by experimental studies indicating that empagliflozin

improved endothelium-dependent relaxations in streptozotocin-induced diabetic rats [22], and hemodynamics in a hypertensive heart failure rat model [23], decreased left ventricular weight, cardiomyocytes size, and cardiac interstitial fibrosis and macrophage infiltration in genetic prediabetic rats with metabolic syndrome [24]. Empagliflozin also significantly reduced left ventricle (LV) mass and LV systolic dilatation [25], decreased glucotoxicity thereby preventing the development of endothelial dysfunction, and reduced oxidative stress, cardiac fibrosis and exhibited anti-inflammatory effects in ZDF rats and mice [26, 27]. Moreover, empagliflozin reduced the levels of CD36 and cardiotoxic lipids improving autophagy in the hearts of ZDF rats [28], and decreased aortic stiffness, renal resistivity index and kidney injury in T2D female mice [29]. Finally, empagliflozin ameliorated kidney injury in T2D female mice by promoting glycosuria, and possibly by reducing systemic and renal artery stiffness [29]. In addition, a redox-sensitive up-regulation of SGLT1 and 2 has been observed in coronary artery ECs in response to high glucose and H₂O₂ leading to enhanced glucose uptake and induction of atherothrombotic responses [30]. Altogether, these findings support the concept that gliflozins protect the cardiovascular system, besides the improvement of the glycemic control, possibly also by targeting the cardiovascular and, in particular, the pivotal protective endothelial function.

Therefore, the aim of the present study was to investigate the effect of a 6-week oral intake of empagliflozin on the cardiovascular system in the obese ZSF1 rat, an established experimental model of metabolic syndrome with preserved ejection fraction (HFpEF) and systolic hypertension, and its' lean control. In particular, the effect of the empagliflozin treatment was evaluated on: (1) the metabolic status, (2) the level of systolic blood pressure, (3) the endothelial function in the isolated mesenteric artery, and (4) the structure and function of the heart.

Materials and methods

Materials

Empagliflozin was provided by Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG (Biberach an der Riss, Germany). All other chemicals were from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie SARL, St Quentin Fallavier, France) unless otherwise specified.

Animals and in vivo treatment

The experimental model of metabolic syndrome studied was the obese Zucker diabetic fatty/Spontaneously hypertensive heart failure F1 hybrid (ZSF1)-HFpEF rats and its' lean control. A total number of 20 obese ZSF1 rats and respective 20 lean control rats were

obtained from Charles River Laboratories. At an age of 12 weeks, rats were divided into four groups of $n=10$ per group: lean control rats, lean control rats + empagliflozin (30 mg/kg/day), obese ZSF1 rats and obese ZSF1 rats + empagliflozin (30 mg/kg/day) provided in the feed. After a 6-week treatment period, rats were euthanized by IP injection of an overdose of ketamine and xylazine (120 and 20 mg/kg, i.p.).

Biochemical analysis

Urine samples were collected from rats for 24 h in metabolic cages on the day before sacrifice and blood glucose and ketone levels were assessed in tail bleed from overnight (15 h) fasted rats using the blood glucose and β -ketone meter (GLUCOFIX[®] Premium, A. Menarini diagnostics) shortly after being euthanized. Blood samples were collected by terminal cardiac puncture in heparin containing tubes and plasma was prepared after centrifugation at 7000 rpm for 10 min at room temperature. Thereafter aliquots were stored at -80°C until use. Plasma parameters were determined using an Advia 20400 automatic analyzer (Siemens Healthineers) and plasma lipid levels using an AU480 chemistry analyzer (Beckman Coulter). Total cholesterol was assessed using OSR6116 (Enzymatic Color Test CHOD-PAP Method), HDL using cholesterol OSR6187 (Immuno-inhibition/enzymatic color test), LDL cholesterol using OSR6183 (enzymatic color test CHOD-PAP method) and triglycerides using OSR61118 (enzymatic color test GPO-PAP method).

Blood pressure measurements

Systolic blood pressure was determined by tail-cuff sphygmomanometry twice weekly during 5 weeks using the blood pressure analysis system (BP-2000 Serie II, Visitech Systems). Prior to start of blood pressure monitoring, rats were trained daily for 1 week to get used to the system.

Echocardiography

After 5 weeks of treatment, rats were anaesthetized by inhalation of isoflurane (5% induction and 2% for maintenance, 5 l/min of air plus 2 l/min of O_2). Cardiac structure and function were determined by transthoracic echocardiography using the Phillips Sonos 5500 machine equipped with a probe 12 MHz transducer. Two-dimensional short axis views of the left ventricle and M-mode tracings were recorded through anterior and posterior left ventricular walls at the papillary muscle level.

Morphological characterization of the cardiac left ventricle was performed following the determination of the parameters: left ventricular end-diastolic diameter, left ventricular end-systolic diameter, and posterior diastolic

wall thickness (PWT). Left ventricular volume, E/E' ratio, cardiac output and left ventricular ejection fraction were subsequently obtained from these parameters.

Western blot analysis

Inner and outer segments of the aortic arch were homogenized in extraction buffer [composition in mM: Tris/HCl 20 (pH 7.5), NaCl 150, Na_3VO_4 1, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10, NaF 20, okadaic acid 0.01, 1% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail (Complete Mini, Roche)]. Total proteins (15 μg) were separated on 8 or 12% SDS polyacrylamide gels and transferred electrophoretically onto nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Sciences). After blocking with 5% bovine serum albumin in Tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% Tween 20 for 1 h at room temperature, membranes were incubated with primary antibodies against rabbit polyclonal anti-p53 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology; sc-6243), mouse monoclonal anti-p21 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology; sc-817), rabbit polyclonal anti-p16-INK4 (1:500; Abbtotec; 250804), murine monoclonal anti-tissue factor (TF; 1:1000; Sekisui Diagnostics; 4509), mouse monoclonal anti-eNOS/NOS (1:5000; BD Transduction Laboratories; 610297), rabbit monoclonal anti-VCAM-1 (1:10,000; Abcam; ab134047), rabbit polyclonal anti-SGLT1 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology; sc-98974), rabbit polyclonal anti-SGLT2 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology; sc-98975) or mouse monoclonal anti- β -tubulin (1:20,000; Sigma-Aldrich; T7816) overnight at 4°C . After washing, membranes were incubated with the secondary antibody (peroxidase-labeled anti-rabbit or anti-mouse immunoglobulin G; 1:10,000; Cell Signaling Technology; #7074, #7076, respectively) for 1 h at room temperature. The immunoreactive bands were developed by enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham) using ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

Vascular reactivity study

Vascular reactivity study was performed using the main mesenteric artery as described previously [31]. Briefly, the main superior mesenteric arteries were cleaned of connective tissue, and cut into rings (2–3 mm in length). Then, rings were suspended in organ baths containing oxygenated (95% O_2 , 5% CO_2) Krebs bicarbonate solution (mM: NaCl 119, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.18, MgSO_4 1.18, CaCl_2 1.25, NaHCO_3 25, and D-glucose 11, pH 7.4) at 37°C for the assessment of changes in isometric tension. Following equilibration for at least 60 min at a stable resting tension of 1 g, rings were exposed to 80 mM of KCl-containing Krebs solution. Thereafter, rings were contracted with phenylephrine (1 μM) before the induction of a relaxation to acetylcholine (1 μM), to clarify the presence of a functional

endothelium. After washout and a 30-min resting time, rings were contracted with phenylephrine (1 μ M) prior to the construction of a concentration-relaxation curve in response to acetylcholine (1 nM–10 μ M) or sodium nitroprusside (0.1 nM–10 μ M). In some experiments, rings were exposed to an inhibitor for 20 min before the addition of phenylephrine. To evaluate NO-mediated relaxation, rings were incubated in the presence of indomethacin (10 μ M), and TRAM-34 (1 μ M) plus UCL-1648 (1 μ M) to exclude the formation of vasoactive prostanoids and EDH-mediated relaxation, respectively. The EDH-mediated relaxation was evaluated in rings incubated with indomethacin and N^ω-nitro-L-arginine (L-NA; 300 μ M) to exclude the formation of vasoactive prostanoids and NO, respectively. To evaluate EDCFs, rings were exposed to L-NA and TRAM-34 plus UCL-1648 for 20 min to prevent the formation of NO and EDH, respectively before the induction of about a 20–30% pre-contraction with phenylephrine followed by the construction of a concentration-contraction curve to acetylcholine.

Statistical analysis

Values are expressed as mean \pm SEM of different rats. Statistical analysis was assessed by one-way analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison post hoc test using GraphPad Prism (Version 7). The differences between groups were considered statistically significant at $P < 0.05$.

Results

Effect of empagliflozin treatment on metabolic parameters in ZSF1 rats

Plasma parameters have indicated an increased level of glycemia, plasma proteins and albumin, AST, ALT and ALP whereas plasma creatinine and bilirubin were decreased in the obese ZSF1 group compared to the lean control group (Table 1). The empagliflozin treatment significantly decreased glycemia and ALP in the obese ZSF1 group but not in the lean control group except creatinine, which was slightly but significantly decreased (Table 1). In addition, the empagliflozin treatment increased urea in both the lean control and obese ZSF1 groups (Table 1). The obese ZSF1 group had an altered plasma

Table 1 Effect of a 6-week oral intake of empagliflozin on plasma, blood and urine parameters in the lean control and ZSF1 groups

	Control	Empa	ZSF1	ZSF1 + Empa
Plasma				
Glycemia (mmol/l)	11.33 \pm 1.11	9.94 \pm 1.30	28.07 \pm 2.13*	20.81 \pm 0.78* [#]
Urea (mmol/l)	5.84 \pm 0.26	8.71 \pm 0.31*	6.86 \pm 0.30	7.56 \pm 0.28*
Plasma creatinine (μ mol/l)	33.18 \pm 0.46	31.23 \pm 0.56*	24.21 \pm 0.80*	25.37 \pm 0.22
Plasma proteins (g/l)	58.89 \pm 0.99	58.88 \pm 0.83	64.88 \pm 0.90*	64.00 \pm 0.69*
Albumin (g/l)	36.49 \pm 0.49	37.16 \pm 0.49	39.46 \pm 0.48*	39.49 \pm 0.43*
Bilirubin (μ mol/l)	0.57 \pm 0.02	0.61 \pm 0.06	0.25 \pm 0.16*	0.01 \pm 0.01*
AST (U/l)	130.90 \pm 12.34	171.00 \pm 7.80	220.60 \pm 35.64*	152.20 \pm 8.94
ALT (U/l)	63.78 \pm 2.74	108.80 \pm 7.56	161.20 \pm 19.02*	131.20 \pm 8.05
ALP (U/l)	62.78 \pm 4.06	72.13 \pm 8.60	136.60 \pm 13.24*	97.11 \pm 10.87 [#]
Total cholesterol (mmol/l)	2.33 \pm 0.06	2.38 \pm 0.11	6.31 \pm 0.34*	4.90 \pm 0.30* [#]
HDL cholesterol (mmol/l)	1.37 \pm 0.02	1.43 \pm 0.05	2.51 \pm 0.09*	2.45 \pm 0.08*
LDL cholesterol (mmol/l)	0.63 \pm 0.03	0.69 \pm 0.02	0.75 \pm 0.04*	0.66 \pm 0.06
Triglycerides (mmol/l)	0.48 \pm 0.05	0.49 \pm 0.03	6.23 \pm 1.06*	2.92 \pm 0.28* [#]
Blood				
Ketone (mmol/l)	0.33 \pm 0.06	0.71 \pm 0.10*	0.32 \pm 0.06	0.56 \pm 0.10 [#]
Glucose (mg/dl)	134.60 \pm 9.07	134.10 \pm 8.69	274.50 \pm 29.41*	196.70 \pm 22.16 [#]
Urine				
Glycosuria (mmol)	0.89 \pm 0.40	12.03 \pm 1.55*	6.09 \pm 0.85*	17.47 \pm 0.98* [#]
Proteinuria (g/l)	1.59 \pm 0.17	0.74 \pm 0.06	11.35 \pm 0.84*	4.62 \pm 0.44* [#]
Volume (ml)	9.33 \pm 0.94	26.22 \pm 1.62*	22.11 \pm 2.31*	39.40 \pm 2.22* [#]

Metabolic parameters were measured in plasma except for ketone and glucose which were determined in whole blood, and glycosuria and proteinuria which were determined in urine collected over a 24-h period. Values are shown as mean \pm SEM of n = 5–10 per group

Empa empagliflozin, AST aspartate aminotransferase, ALT alanine aminotransferase, ALP alkaline phosphatase, HDL high density lipoprotein, LDL low density lipoprotein

* $P < 0.05$ vs control group and [#] $P < 0.05$ vs ZSF1 group

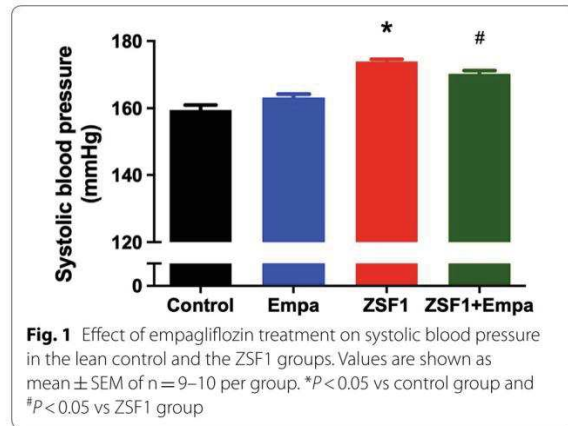
lipid profile with increased levels of total cholesterol, HDL, LDL and triglycerides compared to the lean control group (Table 1). Among them, the level of total cholesterol and triglycerides was significantly decreased by the empagliflozin treatment (Table 1). Blood ketone levels were similar in the lean control and obese ZSF1 groups, and both were significantly increased by the empagliflozin treatment (Table 1). Both glycosuria and proteinuria were significantly increased in the obese ZSF1 group compared to the lean control group (Table 1). The empagliflozin treatment increased glycosuria in both the lean control and obese ZSF1 groups, and markedly reduced proteinuria in the obese ZSF1 group without affecting that in the lean control group (Table 1).

Effect of empagliflozin treatment on morphometric parameters in ZSF1 rats

The morphometric evaluation of rats and organs has indicated that the weight of several organs including spleen, liver, kidney, perirenal fat, lung, heart and body weight were higher in the obese ZSF1 group than the lean control group (Table 2). The empagliflozin treatment significantly decreased the weight of the spleen, liver, perirenal fat, lung, heart and body weight in the obese ZSF1 group (Table 2). In the control group, empagliflozin significantly decreased the weight of the heart and body (Table 2).

Empagliflozin treatment reduces systolic blood pressure in obese ZSF1 rats

Systolic blood pressure was higher by about 14.5 mmHg in the obese ZSF1 group compared to that in the lean control group (Fig. 1). The empagliflozin treatment significantly reduced systolic blood pressure by about 3.6 mmHg (reduction from 173.9 ± 0.7 to



170.3 ± 0.9 mmHg) in the obese ZSF1 group after 5 weeks without affecting that in the lean control group (Fig. 1).

Empagliflozin prevents alteration of heart structure and function in obese ZSF1 rats

Evaluation of the structure of the different parts of the heart by weight and echocardiography has indicated that the left ventricle plus septum, right ventricle, left auricle plus septum and right auricle weights, the left ventricular and auricular volume and the left ventricular posterior diastolic wall thickness (PWT) were increased in the obese ZSF1 group compared to those of the lean control group (Fig. 2). The empagliflozin treatment significantly reduced the left ventricle plus septum, right ventricle and right auricle weights, and also the left ventricular and auricular volumes in the obese ZSF1 group (Fig. 2). The empagliflozin treatment also reduced the left ventricle

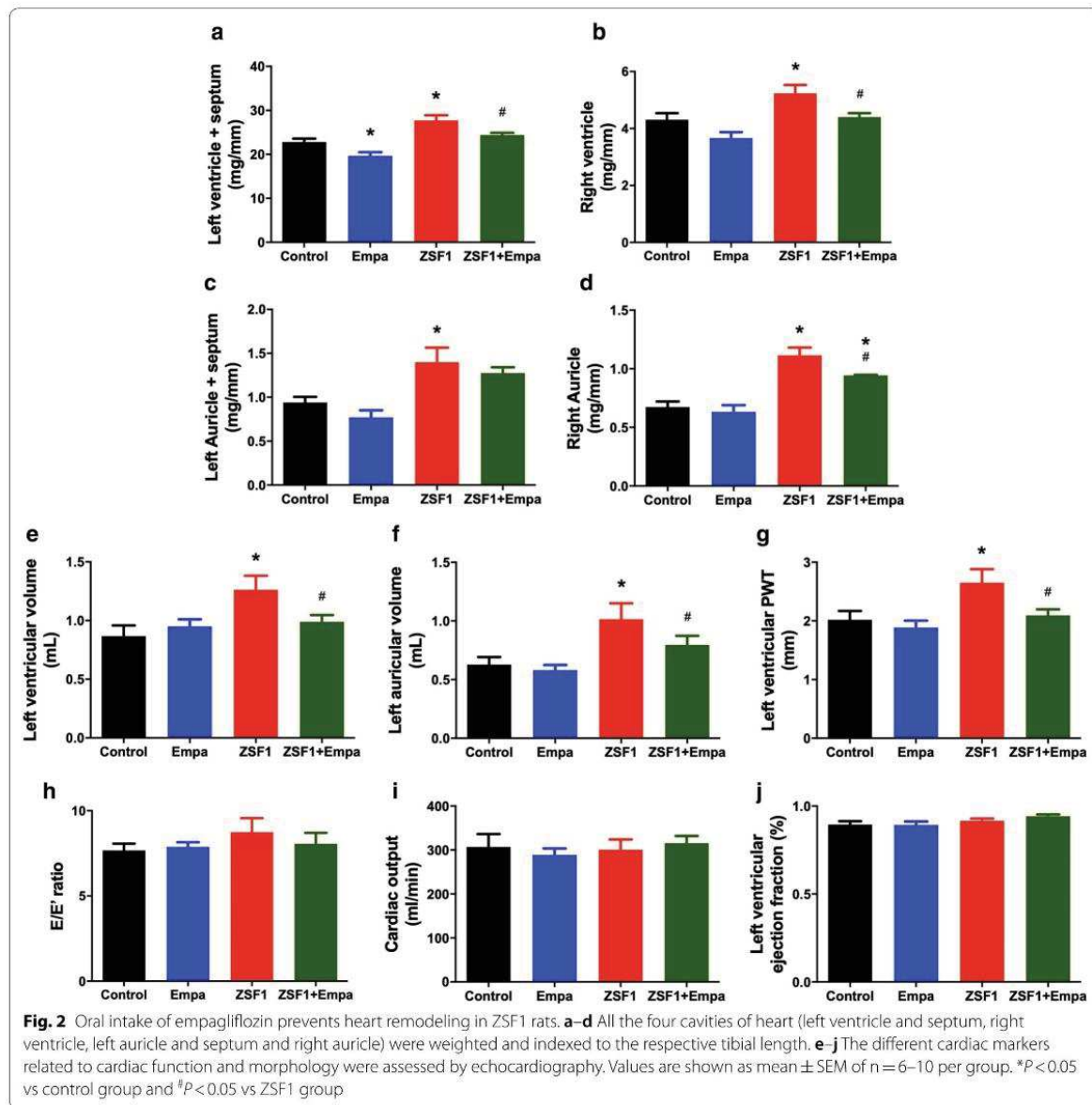
Table 2 Effect of empagliflozin on morphometric parameters of different organs and body weight in the lean control and ZSF1 groups

	Control	Empa	ZSF1	ZSF1 + Empa
Spleen (mg mm ⁻¹)	17.45 ± 0.38	16.55 ± 0.62	20.90 ± 0.32*	18.53 ± 0.81 [#]
Liver (mg mm ⁻¹)	286.40 ± 12.58	264.80 ± 7.80	771.40 ± 34.64*	547.90 ± 21.37* [#]
Kidney (mg mm ⁻¹)	40.52 ± 1.33	41.58 ± 1.34	55.22 ± 1.46*	54.92 ± 1.60*
Perirenal fat (mg mm ⁻¹)	11.32 ± 1.85	8.47 ± 1.63	183.70 ± 36.89*	100.60 ± 27.25* [#]
Left lung (mg mm ⁻¹)	11.06 ± 0.20	10.65 ± 0.65	12.92 ± 0.69*	11.02 ± 0.25 [#]
Dry weight of left lung (mg mm ⁻¹)	2.30 ± 0.03	2.16 ± 0.06	2.70 ± 0.08*	2.42 ± 0.06 [#]
3 lobes of lung (mg mm ⁻¹)	17.94 ± 0.41	16.40 ± 0.41	21.48 ± 1.64*	17.23 ± 0.37 [#]
Heart (mg mm ⁻¹)	31.93 ± 0.66	28.74 ± 0.75*	38.98 ± 0.95*	35.40 ± 0.63* [#]
Tibial length (mm)	41.76 ± 0.35	42.54 ± 0.53	40.22 ± 0.42	39.89 ± 0.43
Weight (g)	407.70 ± 9.07	366.00 ± 7.67*	523.80 ± 19.93*	478.90 ± 8.73* [#]

Organs were weighted and indexed to the respective tibial length. Values are shown as mean ± SEM of n = 7–10 per group

Empa empagliflozin

*P < 0.05 vs control group and [#]P < 0.05 vs ZSF1 group



plus septum weight in the control lean group, whereas the other parameters were not affected (Fig. 2).

The cardiac output and left ventricular ejection fraction were similar in the lean control and the obese ZSF1 groups, and not affected by the empagliflozin treatment (Fig. 2). The E/E' ratio, an indicator of the function of left ventricle filling, was slightly increased in the obese ZSF1 group compared to that of the lean control group, however, this effect did not reach statistical significance (Fig. 2).

Empagliflozin treatment improves endothelium-dependent relaxations and reduces endothelium-dependent contractile responses in ZSF1 rats: role of cyclooxygenases

The endothelial and vascular function were assessed by vascular reactivity studies of the main mesenteric artery. The concentration-dependent relaxation curve to acetylcholine was slightly but significantly shifted to the right in mesenteric artery rings with endothelium of the obese ZSF1 compared to that of the lean control group

(Fig. 3a). The blunted endothelium-dependent relaxation in the ZSF1 group was associated with increased endothelium-dependent contractile responses to acetylcholine (Fig. 3b). The empagliflozin treatment restored normal endothelium-dependent relaxations and blunted endothelium-dependent contractile responses to acetylcholine (Fig. 3a, b). The empagliflozin treatment did affect neither relaxations nor the small endothelium-dependent contractile responses to acetylcholine in the control lean group (Fig. 3a, b). In addition, relaxations to the NO donor sodium nitroprusside were similar in all groups (Fig. 3c).

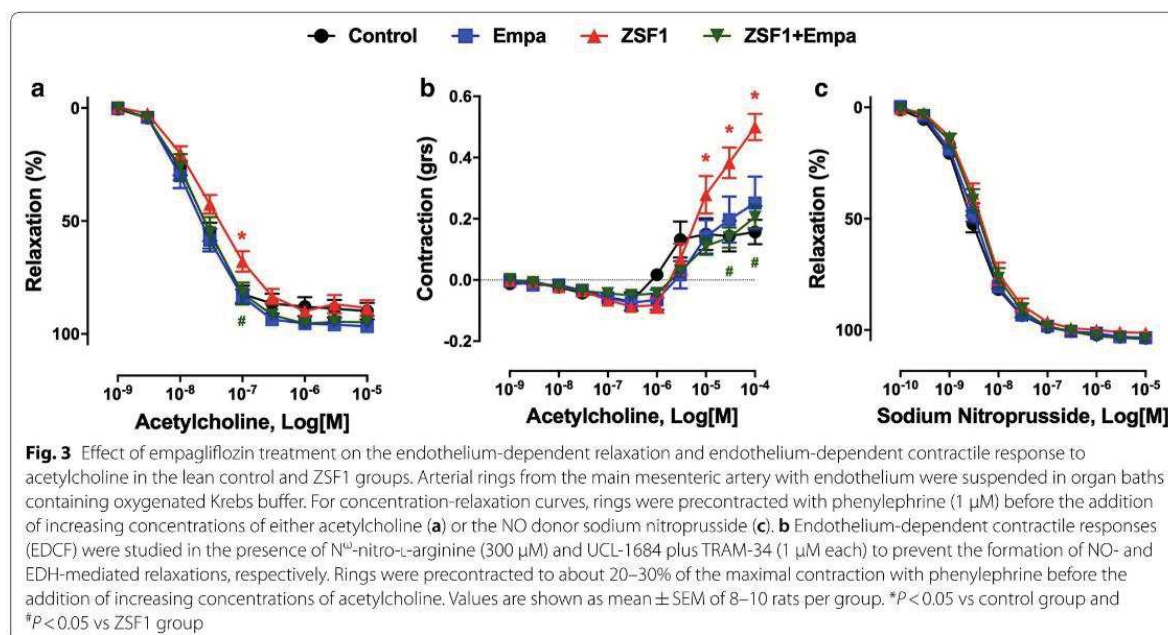
The characterization of the blunted endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in mesenteric artery rings of the ZSF1 group has indicated a slight but significant increased relaxation in the presence of indomethacin, a non-selective inhibitor of cyclooxygenases indicating the involvement, to some extent, of vasoconstrictor prostanoids (Fig. 4a). The role of endothelial NO in the relaxation to acetylcholine was assessed using the NO synthase inhibitor N^{ω} -nitro-L-arginine, and that of EDH by using TRAM-34 and UCL-1684, inhibitors of intermediate and small calcium-dependent K^{+} channels, respectively, involved in EDH. Although the addition of TRAM-34 and UCL-1684 to indomethacin affected only slightly the relaxation to acetylcholine, the response was abolished in the presence of N^{ω} -nitro-L-arginine demonstrating the exclusive involvement of NO (Fig. 4a). In addition, the endothelium-dependent contractile

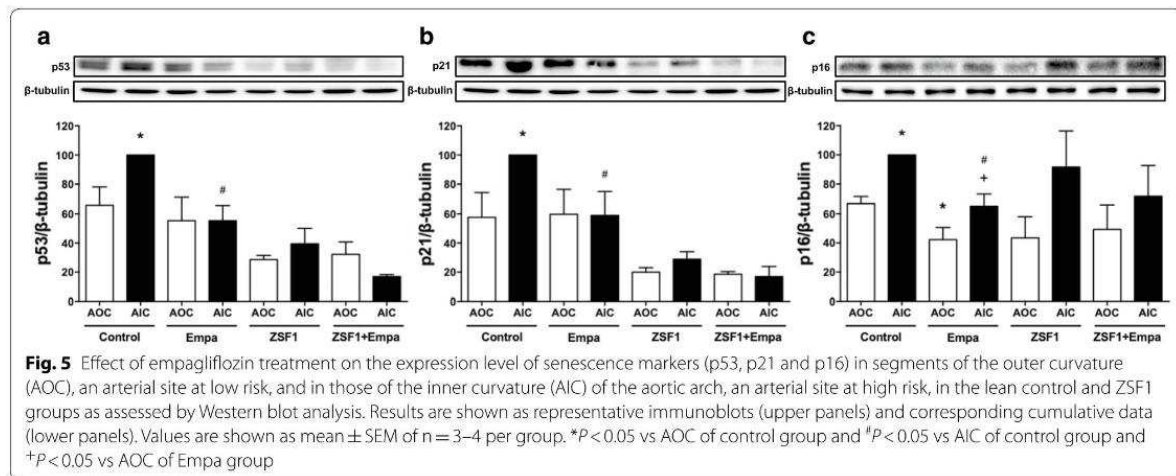
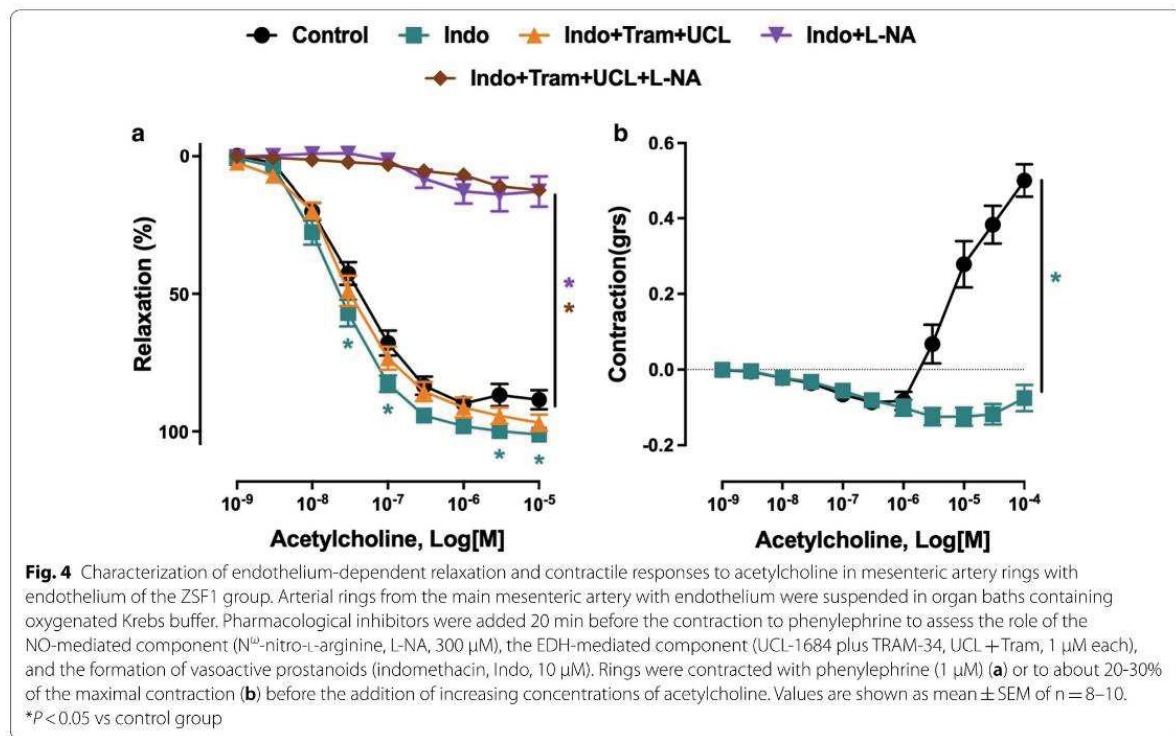
response to acetylcholine in mesenteric artery rings of the obese ZSF1 group was abolished in the presence of indomethacin (Fig. 4b).

Empagliflozin prevents the expression of senescence and pro-atherothrombotic markers, and also SGLT1 and 2 at arterial sites at risk

Since senescence has been identified as an early event promoting endothelial dysfunction [17], the expression level of the senescence markers p53, p21 and p16 was evaluated by Western blot analysis in the outer aortic arch curvature, an arterial site exposed to a high level of shear stress and at low risk, and the inner aortic arch curvature, an arterial site exposed to a low level of shear stress and at high risk [32]. The expression level of p53, p21 and p16 were significantly higher in the inner than outer aortic arch curvatures in the lean control group (Fig. 5). The empagliflozin treatment reduced the expression level of p53, p21 and p16 in the inner curvature to a similar level as those observed in the outer curvature of the aortic arch in the lean control group (Fig. 5). The empagliflozin treatment also reduced significantly the expression level of p16 in the outer aortic arch curvature whereas those of p53 and p21 were not affected in the lean control group (Fig. 5).

In contrast to the lean control group, the obese ZSF1 group showed low levels of p53 and p21 which were similar in the inner and outer aortic arch curvatures and not affected by the empagliflozin treatment (Fig. 5a, b).





Regarding p16 levels, an increased level was observed in the inner compared to the outer curvatures, however, this difference did not reach statistical significance and was not affected by the empagliflozin treatment (Fig. 5c).

To evaluate the endothelial dysfunction at arterial sites at risk, the expression level of pro-atherothrombotic markers including eNOS, VCAM-1 and tissue factor, the

initiator of the coagulation cascade, was assessed in the inner and outer aortic arch curvatures by Western blot analysis. These investigations have indicated that eNOS is down-regulated and VCAM-1 and tissue factor are up-regulated in the inner versus outer aortic arch curvatures in the lean control group, and that these effects are normalized by the empagliflozin treatment (Fig. 6a-c). In

the ZSF1 group, eNOS levels were decreased in the inner versus outer aortic arch curvatures, but this effect did not reach statistical significance (Fig. 6a). The levels of VCAM-1 and tissue factor were similar in the inner and outer aortic arch curvatures of the ZSF1 group, and not affected by the empagliflozin treatment (Fig. 6b, c).

Of interest, an increased expression level of SGLT1 and SGLT2 (immunoreactive bands of about 70 kDa) were observed in the inner compared to the outer aortic arch curvatures in the lean control group (Fig. 6d, e). The empagliflozin treatment normalized the expression level of SGLT1 and SGLT2 in the inner aortic arch curvature to a level similar as that observed in the outer aortic arch curvature (Fig. 6d, e). Similar expression levels of SGLT1 and 2 were observed in the inner and outer aortic arch curvatures in the ZSF1 group and the empagliflozin-treated ZSF1 group (Fig. 6d, e).

Discussion

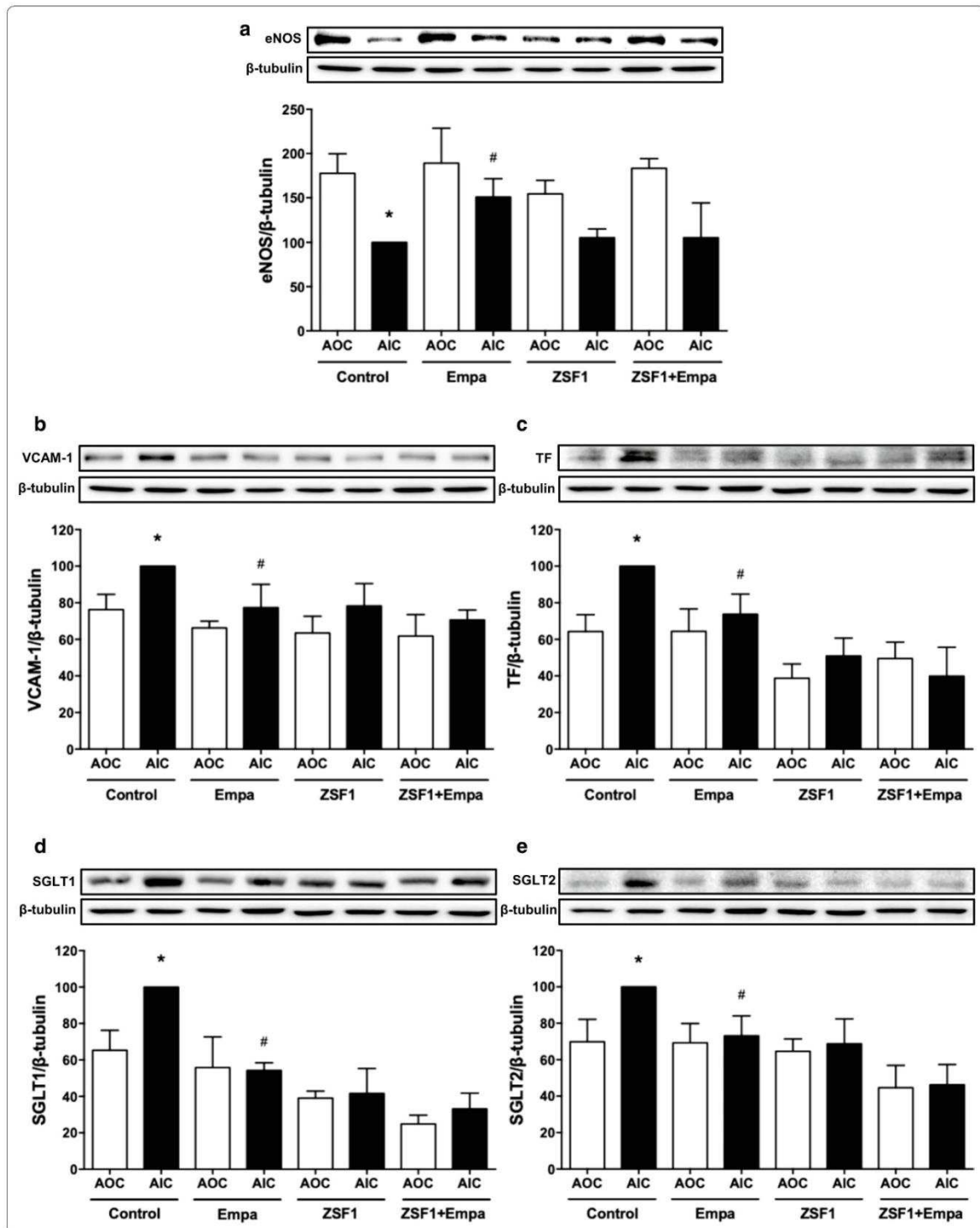
The major findings of the present study indicate that the selective SGLT2 inhibitor empagliflozin improves systolic blood pressure, heart remodeling and endothelial dysfunction in an experimental model of metabolic syndrome with HFpEF, the ZSF1 rat. The protective effect of empagliflozin on the heart of the ZSF1 rat with HFpEF involves normalization of the heart weight with an improvement of the left ventricle weight and volume, and also of the posterior wall thickness. The protective effect of empagliflozin on the endothelial function in the mesenteric artery involves normalization of NO-mediated endothelium-dependent relaxations and prevention of endothelium-dependent contractile responses to acetylcholine most likely by targeting the cyclooxygenase pathway. A protective effect of empagliflozin is also observed at arterial sites at risk (inner versus outer curvatures of the aortic arch) in the lean control group as indicated by the normalization of the expression level of senescence markers (p53, p21, p16), atherothrombotic markers, and SGLT1 and 2. Moreover, the empagliflozin treatment resulted in improved glycemic level, lipid profile and body weight. Altogether, the present findings indicate that the highly selective SGLT2 inhibitor is able to target several major components of the metabolic syndrome in the ZSF1 rat to improve the function of the cardiovascular system.

The EMPA-REG OUTCOME, the CANVAS and the DECLARE-TIMI58 trials showed that SGLT2 inhibitors reduced the risk of cardiovascular death or hospitalization for heart failure in T2D individuals with established CVD [18–20]. The subsequent analysis of the EMPA-REG OUTCOME data indicated that the cardiovascular benefits of empagliflozin is independent of glycemic control [21]. More recently, the DAPA-Heart Failure trial indicated that among patients with heart failure and a reduced ejection fraction, dapagliflozin reduced the risk of worsening heart failure or death from cardiovascular causes regardless of the presence or absence of diabetes [33]. Altogether, these findings suggest that SGLT2 inhibitors act on the cardiovascular system possibly through glucose-independent mechanisms, which however remain to be elucidated. Several potential mechanism, besides glycemic control, have been suggested such as the involvement of visceral adiposity, body weight, hyperinsulinemia, blood pressure, arterial stiffness, lipid profile, and albuminuria [34]. In addition, SGLT1 and 2 expression has been observed in cultured and native ECs under pathological conditions such as hyperglycemic state and oxidative stress, promoting endothelial senescence and dysfunction subsequent to excessive glucose entry [30]. Since all of these effects were inhibited by empagliflozin, SGLT2 inhibitors may possibly also contribute to protect the cardiovascular system by targeting the pivotal endothelial function [30]. Therefore, the present study has evaluated the impact of empagliflozin on the cardiovascular system in an experimental model of metabolic syndrome with HFpEF, the ZSF1 rat, which combines several major cardiovascular risk factors including obesity, hypertension, diabetes and dyslipidemia [35–37].

After 18 weeks, the obese ZSF1 rat showed many characteristics of metabolic risk such as visceral obesity as indicated by increased perirenal fat, elevated body weight, hyperglycemia, and dyslipidemia characterized by high levels of total cholesterol, LDL and triglycerides. In addition, an increased level of systolic blood pressure was observed in the obese ZSF1 rat compared to the lean rat. The present findings indicate a beneficial effect of the empagliflozin treatment promoting a reduction of the body weight and the weight of perirenal fat, and hyperglycemia, and an improvement of the lipid profile as well as of systolic blood pressure in the obese ZSF1 rat. Previous studies have also shown that empagliflozin reduced

(See figure on next page.)

Fig. 6 Effect of empagliflozin treatment on the expression level of eNOS (a), VCAM-1 (b), TF (c), SGLT1 (d) and SGLT2 (e) in segments of the AOC and in those of the AIC of the lean control and ZSF1 groups as assessed by Western blot analysis. Results are shown as representative immunoblots (upper panels) and corresponding cumulative data (lower panels). Values are shown as mean \pm SEM of $n = 3-4$ per group. * $P < 0.05$ vs AOC of control group and # $P < 0.05$ vs AIC of control group



body weight and fat associated with an increased urinary glucose excretion in an animal model of diet-induced obesity [38], lowered plasma cholesterol and liver triglyceride levels in pre-diabetic *ob/ob*^{-/-} mice [39], and decreased blood pressure by about 15 mmHg in the Cohen-Rosenthal diabetic hypertensive rat [25].

Consistent with previous studies, the obese ZSF1 rat, an experimental model of HFpEF, is characterized by pronounced heart remodeling affecting the left and right heart with a preserved heart function as indicated by normal cardiac output and ejection fraction. The present findings indicate that the empagliflozin treatment was able to prevent the hypertrophy of both the left and right heart as indicated by the normalization of the weight of the left and right ventricles and the right auricle, and also of the heart remodeling as indicated by the normalization of the volume of the left ventricle and auricle, and the posterior wall thickness of the left ventricle. A beneficial effect of empagliflozin on the heart has also been observed previously since empagliflozin reduced left ventricle weight, cardiomyocyte size, cardiac interstitial fibrosis and macrophage infiltration in genetic pre-diabetic rats with metabolic syndrome [24], improved cardiac function and ATP production in *db/db* mice associated with preserved cardiac glucose and lipid metabolism [40] and improved diastolic function, mitochondrial expansion, and myocardial fibrosis in female *db/db* mice [41]. In addition, Connelly et al. observed that empagliflozin preserved lung weight, ameliorated diastolic dysfunction, and attenuated cardiac hypertrophy using a rat model of uninephrectomy treated with deoxycorticosterone acetate and 1% NaCl water to induce HFpEF [42].

Chronic inhibition of SGLT2 decreases extracellular fluid and plasma volumes as was obvious in the EMPAREG OUTCOME trial with a 5.2% rise in hematocrit level at the end of the study [18]. The diuretic effect subsequent to inhibition of the SGLT2-mediated glucose uptake in the kidney proximal tube will further reduce central aortic pressure and afterload, resulting in improved left ventricular function, and decreased cardiac workload and myocardial oxygen demand [43, 44]. Preload reduction by lower plasma volume most likely acts synergistically with afterload reduction to promote a reduction of cardiac events, especially in individuals with diabetes and impaired left ventricular function, ischemic heart disease, or congestive HF [43, 44].

Endothelial dysfunction caused by hyperglycemia is a critical initiator of the development of macro- and micro-vascular complications in T2D with high metabolic risk [7, 45]. Previous studies have indicated that hyperglycemia-related endothelial dysfunction is characterized often by blunted NO and EDH components of the endothelium-dependent relaxation as observed in the rat

arterioles [14], rat aorta [13], and rabbit aorta [12]. In the obese ZSF1 rat, the endothelial dysfunction of the main mesenteric artery is characterized by blunted endothelium-dependent relaxations and the appearance of endothelium-dependent contractile responses to acetylcholine. Moreover, the characterization of the endothelial dysfunction to acetylcholine indicated that the NO component is significantly reduced in the mesenteric artery of the obese ZSF1 rat. Interestingly, empagliflozin treatment restored the protective endothelial function in the mesenteric artery as indicated by normal endothelium-dependent relaxations and blunted endothelium-dependent contractile responses to acetylcholine most likely by preventing the formation of cyclooxygenase-derived contractile prostanoids. Experimental investigations have also shown that empagliflozin improved endothelium-dependent relaxations in streptozotocin-induced diabetic rats and Zucker diabetic fatty rats [22, 27]. Canagliflozin has also been shown to increase SNP-dependent relaxation in coronary arteries from diabetic mice subsequent to vascular smooth muscle hyperpolarization involving potassium channels [46] and Ipragliflozin improved endothelium-dependent vasodilation in streptozotocin-induced diabetic mice, in part, by an improvement of eNOS function as suggested by an increased phosphorylation level of eNOS at the activator site Ser1177 and Akt [47].

Premature endothelial senescence as indicated by senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal), p53 and p16 staining was observed in the aortas obtained from Zucker diabetic rats [48]. SA- β -gal-positive staining was also observed in atherosclerotic lesions of the human thoracic aorta at the intimal side as well as at sites of disturbed blood flow including branches and bifurcations [49, 50]. Since the selective p53 overexpression in ECs resulted in impaired endothelium-dependent relaxation and NO bioavailability [17], premature endothelial senescence most likely acts as an upstream signaling event to promote endothelial dysfunction. Although the lean control ZSF1 rat is characterized by normal heart structure and function, and endothelial function in the mesenteric artery, a more precise analysis of the vascular tree has provided evidence of premature senescence at arterial sites at risk. Indeed, an increased level of senescence markers p53, p21 and p16 was observed in the inner compared to the outer aortic arch curvature, a potential site of early atherogenesis characterized by disturbed flow and low shear stress [32]. Moreover, the premature senescence was associated with the appearance of pro-atherothrombotic signals as indicated by a decreased expression level of eNOS and increased levels of tissue factor, the main activator of the coagulation cascade, and VCAM-1 involved in the recruitment of monocytes

into the arterial wall. Furthermore, an increased expression level of SGLT1 and SGLT2 was observed at the arterial site at risk supporting the concept that possibly an excessive entry of glucose via SGLTs might contribute to promote structural and functional changes favoring the pathologic development of the arterial site at risk. The present findings indicate that the empagliflozin treatment was able to normalize the expression level of senescence markers, eNOS, tissue factor, VCAM-1 and SGLT1 and 2 in the inner aortic arch curvature to levels similar to those in the outer aortic arch curvature, which is protected by the exposure to high levels of shear stress. Thus, these observations suggest that empagliflozin might possibly contribute to protect arterial sites of atherogenesis by blunting the SGLT2-mediated pro-senescent and pro-atherothrombotic responses [30]. The fact that no such differences in the expression level of pro-atherothrombotic markers are observed in the inner and outer curvature of the obese ZSF1 rat suggests that the responsiveness of the arterial wall to local blood flow behavior appears to be altered possibly due to the chronic exposure of metabolic stress.

Conclusions

The study indicates that empagliflozin prevents hypertrophy and remodeling of the heart, and also endothelial dysfunction as indicated by an improved NO-mediated relaxation and the prevention of cyclooxygenases-mediated endothelium-dependent contractile responses in an experimental model of metabolic syndrome with HFpEF. The beneficial effect involves an improvement of systolic blood pressure, glycemia, the lipid profile and body weight, and also of premature vascular senescence at arterial sites at risk.

Abbreviations

AIC: Inner curvature of the aortic arch; ALP: Alkaline phosphatase; ALT: Alanine aminotransferase; AOC: Outer curvature of the aortic arch; AST: Aspartate aminotransferase; CVD: Cardiovascular disease; ECs: Endothelial cells; EDCFs: Endothelium-dependent contractile responses; EDH: Endothelium-dependent hyperpolarization; emp: Empagliflozin; eNOS: Endothelial nitric oxide synthase; HDL: High density lipoprotein; HF: Heart failure; HFpEF: Heart failure with preserved ejection fraction; L-NA: N^G-nitro-L-arginine; LDL: Low density lipoprotein; NO: Nitric oxide; PWT: Posterior diastolic wall thickness; SA- β -gal: Senescence-associated β -galactosidase; SGLT: Selective sodium-glucose cotransporter; T2D: Type 2 diabetes; TBS: Tris-buffered saline; TF: Tissue factor; ZSF1: Obese Zucker diabetic fatty/spontaneously hypertensive heart failure F1 hybrid.

Acknowledgements

Not applicable.

Authors' contributions

S-HP, MAF, SG, CB, AWQ, H-HL, DB, and BP performed the experiments and analyzed the data. S-HP, DS, PO, J-ML, EM, CA, OM, and VS-K designed the study and wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by an unrestricted research grant from Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach, Germany.

Availability of data and materials

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

All animal procedures complied with the Guide of Care and the Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA; NIH publication number 85-23, revised 1996) and authorization was given by the French Ministry of Research (#10073-2017053013335510) after approval by the local Ethics Committee (Comité Régional d'Éthique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg, CE35).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

This work was supported by an unrestricted research grant from Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach, Germany.

Author details

¹INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR 1260, Regenerative Nanomedicine, FMIS, Strasbourg, France. ²Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Service des Maladies Vasculaires - Hypertension Artérielle, Strasbourg, France. ³UMR CNRS 7021 Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies, Strasbourg, France. ⁴Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Service de Cardiologie, Strasbourg, France. ⁵Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France. ⁶Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach, Germany.

Received: 31 October 2019 Accepted: 6 February 2020

Published online: 18 February 2020

References

1. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2001;24(4):683–9.
2. Laaksonen DE, Lakka HM, Niskanen LK, Kaplan GA, Salonen JT, Lakka TA. Metabolic syndrome and development of diabetes mellitus: application and validation of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort study. *Am J Epidemiol*. 2002;156(11):1070–7.
3. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA*. 2002;288(21):2709–16.
4. Lorenzo C, Okoloise M, Williams K, Stern MP, Haffner SM. The metabolic syndrome as predictor of type 2 diabetes: the San Antonio heart study. *Diabetes Care*. 2003;26(11):3153–9.
5. Desroches S, Lamarche B. The evolving definitions and increasing prevalence of the metabolic syndrome. *Appl Physiol Nutr Metab Physiol* appliquee, nutrition et metabolisme. 2007;32(1):23–32.
6. Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Salpea KD, Mikhailidis DP. The prevalence of metabolic syndrome in various populations. *Am J Med Sci*. 2007;333(6):362–71.
7. Fowler MJ. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clin Diabetes*. 2008;26:77–82.
8. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation*. 1993;88(6):2510–6.
9. McVeigh GE, Brennan GM, Johnston GD, McDermott BJ, McGrath LT, Henry WR, Andrews JW, Hayes JR. Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1992;35(8):771–6.
10. Williams SB, Cusco JA, Roddy MA, Johnstone MT, Creager MA. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27(3):567–74.

11. Clarkson P, Celermajer DS, Donald AE, Sampson M, Sorensen KE, Adams M, Yue DK, Betteridge DJ, Deanfield JE. Impaired vascular reactivity in insulin-dependent diabetes mellitus is related to disease duration and low density lipoprotein cholesterol levels. *J Am Coll Cardiol*. 1996;28(3):573–9.
12. Tesfamariam B, Brown ML, Deykin D, Cohen RA. Elevated glucose promotes generation of endothelium-derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. *J Clin Invest*. 1990;85(3):929–32.
13. Pieper GM, Meier DA, Hager SR. Endothelial dysfunction in a model of hyperglycemia and hyperinsulinemia. *Am J Physiol*. 1995;269(3 Pt 2):H845–50.
14. Bohlen HG, Lash JM. Topical hyperglycemia rapidly suppresses EDRF-mediated vasodilation of normal rat arterioles. *Am J Physiol*. 1993;265(1 Pt 2):H219–25.
15. Vasile E, Tomita Y, Brown LF, Köcher O, Dvorak HF. Differential expression of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis. *FASEB J*. 2001;15(2):458–66.
16. Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation*. 2002;105(13):1541–4.
17. Kumar A, Kim CS, Hoffman TA, Naqvi A, Dericco J, Jung SB, Lin Z, Jain MK, Irani K. p53 impairs endothelial function by transcriptionally repressing Kruppel-Like Factor 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(1):133–41.
18. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, Mattheus M, Devins T, Johansen OE, Woerle HJ, et al. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2015;373(22):2117–28.
19. Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, de Zeeuw D, Fulcher G, Erondou N, Shaw W, Law G, Desai M, Matthews DR. Canagliflozin and cardiovascular and renal events in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2017;377(7):644–57.
20. Wiviott SD, Raz I, Bonaca MP, Mosenzón O, Kato ET, Cahn A, Silverman MG, Zelniker TA, Kuder JF, Murphy SA, et al. Dapagliflozin and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2019;380(4):347–57.
21. Inzucchi SE, Kosiborod M, Fitchett D, Wanner C, Hehne U, Kaspers S, George JT, Zinman B. Improvement in cardiovascular outcomes with empagliflozin is independent of glycemic control. *Circulation*. 2018;138(17):1904–7.
22. Oelze M, Kroller-Schon S, Welschop P, Jansen T, Hausding M, Mikhed Y, Stamm P, Mader M, Zinssius E, Agdautlova S, et al. The sodium–glucose co-transporter 2 inhibitor empagliflozin improves diabetes-induced vascular dysfunction in the streptozotocin diabetes rat model by interfering with oxidative stress and glucotoxicity. *PLoS ONE*. 2014;9(11):e112394.
23. Lee H-C, Shiou Y-L, Jhuo S-J, Chang C-Y, Liu P-L, Jhuang W-J, Dai Z-K, Chen W-Y, Chen Y-F, Lee A-S. The sodium–glucose co-transporter 2 inhibitor empagliflozin attenuates cardiac fibrosis and improves ventricular hemodynamics in hypertensive heart failure rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2019;18(1):45.
24. Kusaka H, Koibuchi N, Hasegawa Y, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Empagliflozin lessened cardiac injury and reduced visceral adipocyte hypertrophy in prediabetic rats with metabolic syndrome. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15(1):157.
25. Younis F, Leor J, Abassi Z, Landa N, Rath L, Hollander K, Naftali-Shani N, Rosenthal T. Beneficial effect of the SGLT2 inhibitor empagliflozin on glucose homeostasis and cardiovascular parameters in the cohen rosenthal diabetic hypertensive (CRDH) rat. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2018;23(4):358–71.
26. Li C, Zhang J, Xue M, Li X, Han F, Liu X, Xu L, Lu Y, Cheng Y, Li T, et al. SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart. *Cardiovasc Diabetol*. 2019;18(1):15.
27. Steven S, Oelze M, Hanf A, Kroller-Schon S, Kashani F, Roohani S, Welschop P, Kopp M, Godtel-Armbrust U, Xia N, et al. The SGLT2 inhibitor empagliflozin improves the primary diabetic complications in ZDF rats. *Redox Biol*. 2017;13:370–85.
28. Aragon-Herrera A, Feijoo-Bandin S, Otero Santiago M, Barral L, Campos-Toimil M, Gil-Longo J, Costa Pereira TM, Garcia-Caballero T, Rodriguez-Segade S, Rodriguez J, et al. Empagliflozin reduces the levels of CD36 and cardiotoxic lipids while improving autophagy in the hearts of Zucker diabetic fatty rats. *Biochem Pharmacol*. 2019;170:113677.
29. Aror AR, Das NA, Carpenter AJ, Habibi J, Jia G, Ramirez-Perez FI, Martinez-Lemus L, Manrique-Acevedo CM, Hayden MR, Duta C, et al. Glycemic control by the SGLT2 inhibitor empagliflozin decreases aortic stiffness, renal resistivity index and kidney injury. *Cardiovasc Diabetol*. 2018;17(1):108.
30. Khemais-Benkhiat S, Belcastro E, Idris-Khodja N, Park SH, Amoura L, Abbas M, Auger C, Kessler L, Mayoux E, Toti F, et al. Angiotensin II-induced redox-sensitive SGLT1 and 2 expression promotes high glucose-induced endothelial cell senescence. *J Cell Mol Med*. 2019. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14233>.
31. Dal-Ros S, Bronner C, Schott C, Kane MO, Chataigneau M, Schini-Kerth VB, Chataigneau T. Angiotensin II-induced hypertension is associated with a selective inhibition of endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in the rat mesenteric artery. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;328(2):478–86.
32. Glagov S, Zarins C, Giddens DP, Ku DN. Hemodynamics and atherosclerosis Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med*. 1988;112(10):1018–31.
33. McMurray JJV, Solomon SD, Inzucchi SE, Kober L, Kosiborod MN, Martinez FA, Ponikowski P, Sabatine MS, Anand IS, Belohlavek J, et al. Dapagliflozin in patients with heart failure and reduced ejection fraction. *N Engl J Med*. 2019. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1911303>.
34. Inzucchi SE, Zinman B, Wanner C, Ferrari R, Fitchett D, Hantel S, Espadero RM, Woerle HJ, Broedl UC, Johansen OE. SGLT-2 inhibitors and cardiovascular risk: proposed pathways and review of ongoing outcome trials. *Diabetes Vasc Dis Res*. 2015;12(2):90–100.
35. Hamdani N, Franssen C, Lourenço A, Falcão-Pires I, Fontoura D, Leite S, Plettig L, López B, Ottenheijm CA, Becher PM, et al. Myocardial titin hypophosphorylation importantly contributes to heart failure with preserved ejection fraction in a rat metabolic risk model. *Circ Heart Fail*. 2013;6(6):1239–49.
36. Leite S, Oliveira-Pinto J, Tavares-Silva M, Abdellatif M, Fontoura D, Falcão-Pires I, Leite-Moreira AF, Lourenço AP. Echocardiography and invasive hemodynamics during stress testing for diagnosis of heart failure with preserved ejection fraction: an experimental study. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;308(12):H1556–63.
37. Tofovic SP, Kusaka H, Kost CK Jr, Bastacky S. Renal function and structure in diabetic, hypertensive, obese ZDFxSHHF-hybrid rats. *Ren Fail*. 2000;22(4):387–406.
38. Vickers SP, Cheatham SC, Headland KR, Dickinson K, Grempler R, Mayoux E, Mark M, Klein T. Combination of the sodium–glucose cotransporter-2 inhibitor empagliflozin with orlistat or sibutramine further improves the body-weight reduction and glucose homeostasis of obese rats fed a cafeteria diet. *Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther*. 2014;7:265–75.
39. Adingupu DD, Göpel SO, Grönros J, Behrendt M, Sotak M, Miliotis T, Dahlqvist U, Gan L-M, Jönsson-Rylander A-C. SGLT2 inhibition with empagliflozin improves coronary microvascular function and cardiac contractility in prediabetic ob/ob —/— mice. *Cardiovasc Diabetol*. 2019;18(1):16.
40. Verma S, Rawat S, Ho KL, Wagg CS, Zhang L, Teoh H, Dyck JE, Uddin GM, Qudit GY, Mayoux E, et al. Empagliflozin increases cardiac energy production in diabetes: novel translational insights into the heart failure benefits of SGLT2 inhibitors. *JACC Basic Transl Sci*. 2018;3(5):575–87.
41. Habibi J, Aror AR, Sowers JR, Jia G, Hayden MR, Garro M, Barron B, Mayoux E, Rector RS, Whaley-Connell A, et al. Sodium glucose transporter 2 (SGLT2) inhibition with empagliflozin improves cardiac diastolic function in a female rodent model of diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2017;16(1):9.
42. Connelly KA, Zhang Y, Visram A, Advani A, Batchu SN, Desjardins J-F, Thai K, Gilbert RE. Empagliflozin improves diastolic function in a nondiabetic rodent model of heart failure with preserved ejection fraction. *JACC Basic Transl Sci*. 2019;4(1):27–37.
43. Kimura G. Importance of inhibiting sodium–glucose cotransporter and its compelling indication in type 2 diabetes: pathophysiological hypothesis. *J Am Soc Hypertens JASH*. 2016;10(3):271–8.
44. McMurray J. EMPA-REG—the “diuretic hypothesis”. *J Diabetes Complicat*. 2016;30(1):3–4.
45. Tziomalos K, Athyros VG, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Endothelial dysfunction in metabolic syndrome: prevalence, pathogenesis and management. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD*. 2010;20(2):140–6.
46. Han Y, Cho YE, Ayon R, Guo R, Youssef KD, Pan M, Dai A, Yuan JX, Makino A. SGLT inhibitors attenuate NO-dependent vascular relaxation in the pulmonary artery but not in the coronary artery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;309(9):L1027–36.

47. Salim HM, Fukuda D, Yagi S, Soeki T, Shimabukuro M, Sata M. Glycemic control with ipragliflozin, a novel selective SGLT2 inhibitor, ameliorated endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mouse. *Front Cardiovasc Med.* 2016;3:43.
48. Chen J, Brodsky SV, Goligorsky DM, Hampel DJ, Li H, Gross SS, Goligorsky MS. Glycated collagen I induces premature senescence-like phenotypic changes in endothelial cells. *Circ Res.* 2002;90(12):1290–8.
49. Chen J, Park HC, Patschan S, Brodsky SV, Gealikman O, Kuo MC, Li H, Addabbo F, Zhang F, Nasjletti A, et al. Premature vascular senescence in metabolic syndrome: could it be prevented and reversed by a selenorganic antioxidant and peroxynitrite scavenger ebselen? *Drug Discov Today Ther Strateg.* 2007;4(1):93–9.
50. Hayashi T, Matsui-Hirai H, Miyazaki-Akita A, Fukatsu A, Funami J, Ding QF, Kamalanathan S, Hattori Y, Ignarro LJ, Iguchi A. Endothelial cellular senescence is inhibited by nitric oxide: implications in atherosclerosis associated with menopause and diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(45):17018–23.

Publisher's Note

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

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://www.biomedcentral.com/submissions)



DISCUSSION GENERALE

1. Protection cardiovasculaire des gliflozines

Depuis 2015, de nombreuses études ont montré le rôle de protection CV des inhibiteurs de SGLT2. En effet, l'étude EMPA-REG OUTCOME a mis en évidence une réduction de 38% du risque relatif de mortalité d'origine CV ainsi qu'une baisse de 35% des hospitalisations pour IC (Zinman et al., 2015). Les études CANVAS et DECLARE-TIMI 58, testant respectivement la canagliflozine et la dapagliflozine, ont montré des résultats similaires, suggérant un effet de classe des gliflozines. L'ensemble des effets protecteurs observés n'a pas été associé à un meilleur contrôle glycémique impliquant ainsi des mécanismes plus complexes (Inzucchi et al., 2018). Au vu de la robustesse de ces observations, les guides de prise en charge internationaux recommandent que les patients présentant un DT2 ou une pathologie CV ou un haut risque CV ou encore un risque rénal, soient traités avec un inhibiteur sélectif de SGLT2 (Davies et al., 2018, Davies et al., 2019; Grant et Cosentino, 2019).

En revanche, les mécanismes à l'origine de cette protection CV nécessitent d'être plus profondément étudiés.

2. Mécanismes suggérés dans la protection cardiovasculaire des inhibiteurs sélectifs de SGLT2

De nombreux effets bénéfiques des inhibiteurs sélectifs de SGLT2 ont été mis en évidence et incluent par exemple, une amélioration de la PA, une réduction du poids corporel, une diminution de la concentration sanguine d'acide urique, une amélioration de la stéatose hépatique, une réduction du Sox et de l'inflammation (**Tableau 3**). Cependant, l'ensemble des effets présentés sont certes significatifs, mais ne sont pas majeurs dans leur intensité chez l'Homme suggérant ainsi que ces mécanismes contribuent ensemble à la protection CV globale des gliflozines. Les mécanismes moléculaires mettant en jeu les cotransporteurs SGLT1 et 2 demeurent très mal connus.

3. La dysfonction endothéliale, phénomène-clé de la pathologie cardiovasculaire

La dysfonction endothéliale est un événement précoce qui contribue à l'initiation ainsi qu'au développement de nombreuses pathologies CV (Versari et al., 2009; Widmer et Lerman, 2014). En effet, une moindre vasodilatation dépendante de l'endothélium et induite par le NO, est observée dans de nombreuses pathologies CV ainsi que chez les patients diabétiques de type 1 ou 2 (Johnstone et al., 1993; Williams et al., 1996). *In vitro*, l'exposition d'artères coronaires et de CEs en culture à une forte concentration de glucose réduit la formation de NO démontrant un impact prépondérant de la toxicité induite par le glucose sur l'endothélium (Bohlen et Lash, 1993; Pieper et al., 1997; Tesfamariam et al., 1990). La dysfonction endothéliale induite par l'hyperglycémie implique l'activation de la NADPHox, le Sox d'origine mitochondriale, une eNOS découplée ainsi que la voie AGE/RAGE (Hink et al., 2001; Nishikawa et al., 2000; Schmidt et al., 1999).

Plus récemment, le phénomène de sénescence endothéliale a été mis en évidence comme un contributeur précoce à l'altération de la fonction endothéliale en particulier dans le DT2 et l'HTA. La sénescence endothéliale correspond à un arrêt irréversible du cycle cellulaire et est associée à des modifications structurelles et fonctionnelles ainsi qu'à une altération de l'expression génique comme une réduction de la synthèse de NO par l'eNOS conduisant ainsi à un endothélium pro-adhésif et pro-thrombotique. Dans l'aorte de rats diabétiques, de nombreuses CEs sénescents ont été détectées par le marquage de sénescence associé à la bêta-galactosidase (SA- β -gal). De plus, l'exposition *in vitro* de CEs à de fortes concentrations de glucose accroît fortement le phénomène de sénescence prématurée (Matsui-Hirai et al., 2011).

4. Effets des gliflozines sur l'expression et l'activité des co-transporteurs SGLT1 et 2 induits par l'Ang II

Trois études réalisées au sein de notre laboratoire, ont montré le rôle important joué par l'Ang II dans l'activation des cotransporteurs SGLT1 et 2 menant ensuite à la dysfonction et à la sénescence endothéliale (Khemais-Benkhiat et al., 2020; Park et al., 2020; Park et al., 2021).

La première étude a étudié le rôle de SGLT2 dans la sénescence et la dysfonction endothéliale induites par de fortes concentrations en glucose. Pour ce faire, des CEs issues de cœur de porc ont été mises en culture puis traitées avec 25 mM de glucose. Les résultats ont montré que l'empagliflozine a prévenu la sénescence endothéliale prématurée ainsi que la dysfonction endothéliale induites par la haute concentration en glucose. Plus particulièrement, l'empagliflozine a contrecarré la baisse de synthèse de NO par l'eNOS, a diminué l'expression de marqueurs athéromatose tels que le FT et VCAM-1 et a stimulé l'effet d'inhibition de l'agrégation plaquettaire par les CEs. L'empagliflozine a prévenu l'activation de la NADPHox et des COXs induite par la forte concentration de glucose. Cet effet s'explique en partie par la surexpression du co-transporteur SGLT2 qui contribue à l'entrée accrue de glucose dans les CEs (Khemais-Benkhiat et al., 2020).

La seconde étude a étudié l'effet sur le système CV de six semaines de traitement avec l'empagliflozine chez le rat obèse ZSF1, un modèle expérimental de syndrome métabolique associé à une HFpEF et à une HTA modérée. Plus précisément, le travail a consisté à évaluer l'effet de l'empagliflozine sur le profil lipidique, sur l'HTA, sur la fonction endothéliale de l'artère mésentérique principale isolée ainsi que sur la structure et la fonction cardiaque. Les principaux résultats ont montré que l'empagliflozine a amélioré la régulation de la glycémie, le profil lipidique et a réduit le poids corporel de manière significative. L'empagliflozine a

également réduit la PAS, le remodelage cardiaque et la dysfonction endothéliale dans ce modèle de syndrome métabolique. L'amélioration de la structure et de la fonction cardiaque s'explique par une réduction de la masse du cœur avec un effet particulièrement notable sur la masse et le volume du VG ainsi que par une diminution de l'épaisseur de la paroi postérieure du VG. L'effet de protection vasculaire a pour cause une amélioration de la vasorelaxation dépendante de l'endothélium et qui implique la voie du NO, et une inhibition des réponses contractiles dépendantes de l'endothélium en réponse à l'acétylcholine vraisemblablement par interaction avec la voie des COXs. Il a également été mis en évidence un effet protecteur du traitement au niveau des sites artériels à risque d'athérosclérose chez les rats contrôle (courbure interne *versus* courbure externe de la crosse aortique) visualisé par une réduction de l'expression des marqueurs de sénescence p53, p21, p16, par une moindre expression des marqueurs pro-athérotrombotiques VCAM-1 et FT, ainsi que par une diminution de l'expression de SGLT1 et 2 (Park et al., 2020).

Dans un troisième temps, Park et collègues ont étudié si l'Ang II et les microparticules circulantes prélevées chez des patients présentant des pathologies des artères coronaires, connues pour activer le système angiotensine local, peuvent induire l'expression de SGLT1 et 2 au niveau des CEs contribuant ainsi à la sénescence prématurée et à la dysfonction endothéliale. De plus, cette étude a évalué la contribution de SGLT1 et 2 à l'exacerbation de la réponse pro-oxydante induite par l'Ang II et les microparticules dans les CEs. L'expression des co-transporteurs SGLT1 et 2 a été déterminée à la fois au niveau des sites artériels à faible risque d'athérosclérose exposés à un flux laminaire exerçant de fortes contraintes de cisaillement, mais aussi au niveau des zones à fort risque d'athérosclérose exposés à un flux turbulent exerçant de faibles forces de cisaillement. Cette étude a montré que l'Ang II ainsi que les microparticules, conduisent à la surexpression au sein des CEs de SGLT1 et 2, qui est

dépendante du Sox, causée par l'activation de AT1R et de la NADPHox (**Figure 21**). L'activation de ces voies résulte en une dysfonction endothéliale et une sénescence endothéliale prématurée. De plus, les protéines SGLT1 et 2 sont surexprimées *ex vivo* au sein d'artères pathologiques de rats (crosse aortique, aorte thoracique traitée avec de l'Ang II ou un inhibiteur de eNOS) ce qui contribue à la synthèse d'EROs dans la paroi vasculaire ainsi qu'à la dysfonction endothéliale. Les mécanismes vraisemblablement impliqués dans les effets précédents mettent probablement en jeu une altération de la voie du NO (Park et al., 2021) (**Figure 21**).

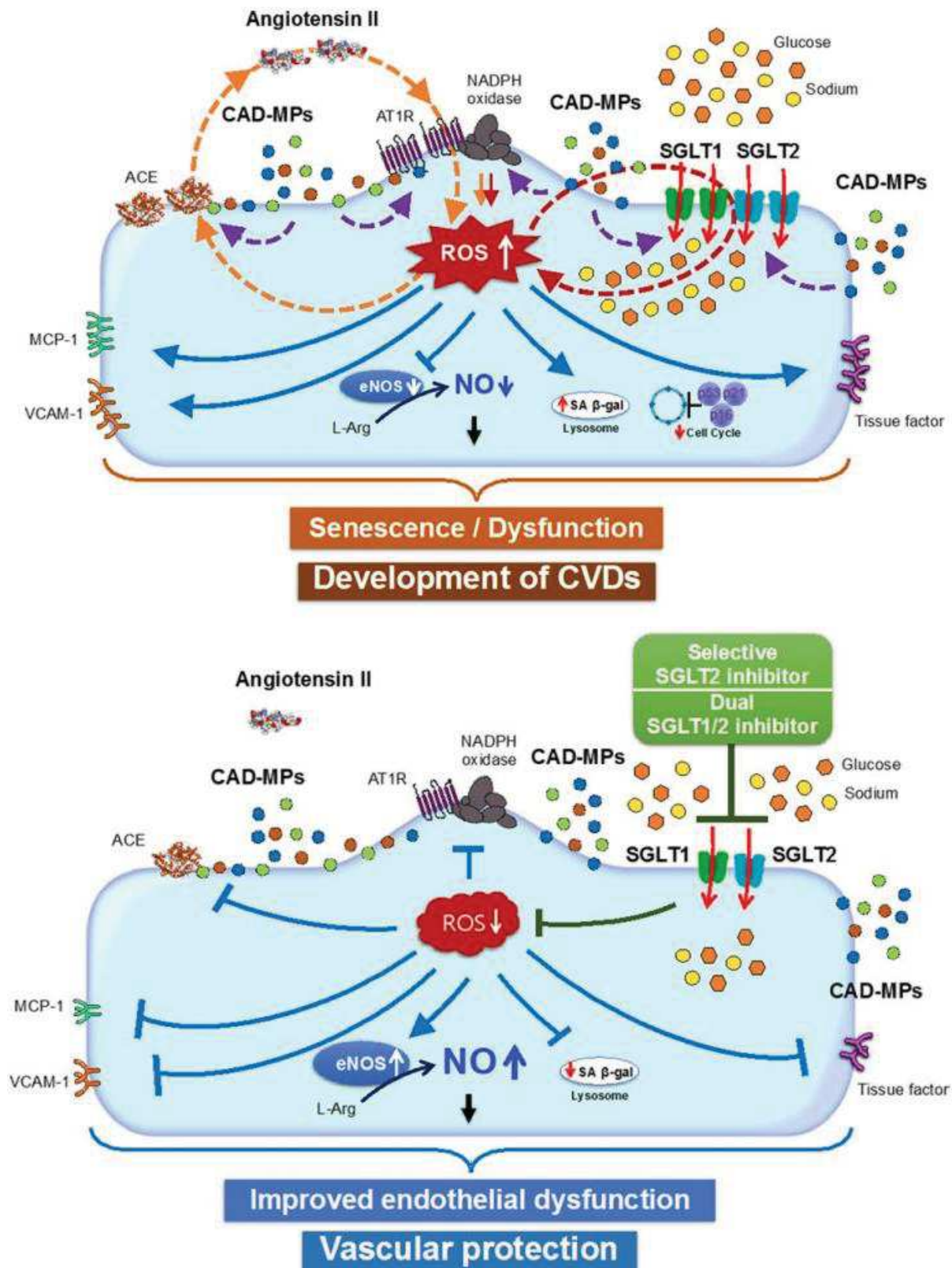


Figure 21. Mécanisme d'action proposé de l'Ang II sur la CE et effets protecteurs de l'inhibition de SGLT1 et 2 (Park et al., 2021)

La principale étude qui fait l'objet de ce travail de thèse, s'inscrit dans le prolongement des travaux de Park et collègues, dont l'objectif est ici, d'étudier le rôle des co-transporteurs SGLT1 et 2 dans un modèle de rat hypertendu ne présentant pas de DT2. Les résultats principaux montrent que l'inhibition des co-transporteurs SGLT1 et 2 permet de réduire fortement le Sox induit par l'Ang II à la fois dans l'aorte mais aussi dans les micro-vaisseaux qui sont fondamentaux dans la régulation de la PA. Il est intéressant de noter que cet effet d'inhibition s'exerce en traitement chronique (pour l'empagliflozine) mais également en traitement aigu (pour la sotagliflozine et l'empagliflozine) *ex vivo*. La normalisation de la régulation du NO est également un effet du traitement chronique avec l'empagliflozine. Ce travail met également en évidence l'effet de protection de l'empagliflozine sur la dysfonction endothéliale, la fibrose et le remodelage vasculaire. L'activation de l'endothélium est également réduite comme le montre la baisse de l'expression de VCAM-1 et de MCP-1 par exemple. De plus, la dysfonction diastolique induite par l'Ang II est significativement réduite par l'empagliflozine vraisemblablement en agissant sur le remodelage cardiaque d'une part (réduction de l'expression du collagène I, des MMP-2 et 9) et sur l'hypertrophie des cardiomyocytes d'autre part. Ces effets sont associés à une réduction de l'expression et de l'activité des cotransporteurs SGLT1 et 2 dans l'endothélium de l'aorte, de la branche secondaire de l'artère mésentérique et dans la microcirculation coronaire. Cette étude confirme le rôle de l'Ang II dans la surexpression et la suractivation de SGLT1 et 2 ainsi que le rôle protecteur de l'empagliflozine sur les effets délétères induits par l'Ang II.

Les observations tirées de ces quatre travaux sont confortées par des résultats similaires au sein de cellules du tube contourné proximal rénal *in vitro*, chez la souris et dans des prélèvements rénaux humains (Miyata et al., 2021). L'étude a montré un lien entre la surexpression des cotransporteurs SGLT2 et l'activité accrue du SRAA. Le traitement aigu

d'Ang II, caractérisé par un bolus unique, entraîne une augmentation de l'expression de SGLT2. En revanche, le traitement chronique d'Ang II pour une durée de quatre semaines, a mené à une absence de détection de SGLT2. L'usage de la canagliflozine a prévenu le rein de l'ensemble des conséquences délétères induites par l'Ang II. L'inhibition de SGLT2 n'a pas conduit à une réduction de la PA mais a significativement prévenu la fibrose interstitielle et glomérulaire ainsi que l'expression de nombreux marqueurs pro-fibrotiques. Une autre étude récente a permis de tirer les mêmes conclusions, à savoir un effet protecteur contre la fibrose rénale induite par l'Ang II sans modification de la PA, en ajoutant que l'effet de protection contre la fibrose résulte principalement d'une infiltration de cellules inflammatoires bien moindre au sein du glomérule ou de l'interstitium (Castoldi et al., 2020).

Finalement, les observations tirées de ces études, mettent en évidence l'effet protecteur CV majeur de l'empagliflozine sur la fonction endothéliale et l'IC accompagné d'une dysfonction diastolique. Ces résultats s'inscrivent dans un nouveau champ de recherche qui met en exergue le rôle des inhibiteurs sélectifs de SGLT2 dans la prise en charge de pathologies CV avec ou sans DT2. En effet, une méta-analyse des études DAPA-HF et EMPEROR-Reduced ont confirmé chez l'Homme, une réduction de la mortalité toute cause de 13 % et de 14 % de la mortalité d'origine CV chez des patients présentant une HFrEF avec ou sans DT2 (Zannad et al., 2020). L'inhibition des co-transporteurs SGLT2 a également été accompagnée d'une réduction relative de 26% du critère composite de mortalité CV et de première hospitalisation pour IC. D'autres études ont montré chez l'animal et chez l'homme une amélioration de l'index de masse du VG et de la fonction diastolique (Connelly et al., 2019; Desjardins et al., 2017; Habibi et al., 2017; Hammoudi et al., 2017).

Dans le champ de la recherche fondamentale, il s'agira à l'avenir d'étudier les voies de signalisation induites par SGLT1 et 2 dont le Sox, ainsi que leurs mécanismes de régulation,

afin de parvenir à élucider l'aspect pharmacologique des gliflozines sur le système CV.

CONCLUSION GENERALE

L'ensemble de ce travail de thèse met en évidence le rôle majeur des co-transporteurs SGLT1 et 2 dans la dysfonction vasculaire et cardiaque dans un modèle de rat hypertendu induit par l'Ang II. En effet, l'Ang II entraîne une élévation importante de la PA, une augmentation du Sox ainsi qu'une baisse de la synthèse de NO au sein de l'aorte. Tous ces effets dépendants du Sox sont prévenus par le traitement avec un inhibiteur sélectif de SGLT2, l'empagliflozine. De plus, l'Ang II induit à la fois dans les macro et micro vaisseaux, une activation du système angiotensine local ce qui favorise d'autant plus le Sox et la dysfonction endothéliale. L'expression des marqueurs athérotrombotiques est également augmentée tels que MCP-1 et VCAM-1 tout comme les marqueurs de fibrose et de remodelage vasculaire. L'empagliflozine protège le système vasculaire contre les effets délétères de l'Ang II. Au niveau cardiaque, les effets d'hypertrophie, de fibrose et de remodelage sont là encore fortement inhibés par l'empagliflozine. En cohérence avec des études *in vitro* antérieures, l'Ang II présente un effet stimulateur de l'expression et de l'activité des cotransporteurs SGLT1 et 2, particulièrement au niveau de l'endothélium ce qui laisse supposer un rôle de ces derniers dans la dysfonction endothéliale induite par l'Ang II. Cet impact majeur est conforté par l'effet de l'empagliflozine qui réduit l'expression et l'activité des transporteurs SGLT1 et 2.

L'ensemble des effets protecteurs CV observés au sein de ce modèle de rat hypertendu prend place sans abaissement de la PA. De nombreuses études cliniques ont montré un effet d'abaissement de la PA par les gliflozines de l'ordre de 3 à 5 mmHg essentiellement chez les patients DT2 (Brown et al., 2020). Dans cet essai, le critère de jugement principal a été l'impact de la dapagliflozine sur la masse du VG. Les auteurs ont observé une réduction de la masse du VG et concluent à un effet combiné de la diminution de PA mais aussi d'un moindre remodelage cardiaque et d'une amélioration de la structure du VG. Une autre étude

portant sur un modèle d'IDM chez le rat, a mis en évidence des effets d'amélioration de la fonction systolique de l'empagliflozine indépendants du remplissage cardiaque grâce à des mesures de relation pression-volume. De plus, des éléments d'amélioration de la fonction diastolique ont également été observés comme par exemple, la réduction de la pression télédiastolique du VG. Il est important de noter que la PA était supérieure dans le groupe IDM + empagliflozine que dans le groupe IDM non traité (Connelly et al., 2020). Deux travaux, l'un dans un modèle porcin de HFrEF, l'autre dans un modèle de rat hypertendu avec HFpEF ont montré une importante amélioration de la dysfonction diastolique sans modification significative de la PA. Les effets s'opèrent principalement par une réduction de la masse du VG, une diminution des pressions de remplissage du VG et une moindre rigidité et fibrose cardiaque (Connelly et al., 2019; Santos-Gallego et al., 2021). Un effet structurel direct sur le cœur est ainsi privilégié.

Ainsi, l'inhibition des transporteurs SGLT1 et 2 pourrait constituer une thérapie prometteuse dans la protection CV chez des patients hypertendus ou bien atteints d'IC en particulier l'HFpEF, où peu de solutions thérapeutiques sont actuellement disponibles.

BIBLIOGRAPHIE

Aguillón, A.R., Mascarello, A., Segretti, N.D., de Azevedo, H.F.Z., Guimaraes, C.R.W., Miranda, L.S.M., and de Souza, R.O.M.A. (2018). Synthetic Strategies toward SGLT2 Inhibitors. *Org. Process Res. Dev.* 22, 467–488.

Anderson, T.J. (2006). Arterial stiffness or endothelial dysfunction as a surrogate marker of vascular risk. *Can. J. Cardiol.* 22, 72B-80B.

Anderson, T.J., Gerhard, M.D., Meredith, I.T., Charbonneau, F., Delagrangé, D., Creager, M.A., Selwyn, A.P., and Ganz, P. (1995). Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 75, 71B-74B.

Baartscheer, A., Schumacher, C.A., Wüst, R.C.I., Fiolet, J.W.T., Stienen, G.J.M., Coronel, R., and Zuurbier, C.J. (2017). Empagliflozin decreases myocardial cytoplasmic Na⁺ through inhibition of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger in rats and rabbits. *Diabetologia* 60, 568–573.

Bader, M. (2013). ACE2, angiotensin-(1–7), and Mas: the other side of the coin. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 465, 79–85.

Banday Anees A. and Lokhandwala Mustafa F. (2011). Oxidative Stress Causes Renal Angiotensin II Type 1 Receptor Upregulation, Na⁺/H⁺ Exchanger 3 Overstimulation, and Hypertension. *Hypertension* 57, 452–459.

Banerjee, S.K., McGaffin, K.R., Pastor-Soler, N.M., and Ahmad, F. (2009). SGLT1 is a novel cardiac glucose transporter that is perturbed in disease states. *Cardiovasc. Res.* 84, 111–118.

Barzilay, J.I., Davis, B.R., Cutler, J.A., Pressel, S.L., Whelton, P.K., Basile, J., Margolis, K.L., Ong, S.T., Sadler, L.S., Summerson, J., et al. (2006). Fasting Glucose Levels and Incident Diabetes Mellitus in Older Nondiabetic Adults Randomized to Receive 3 Different

Classes of Antihypertensive Treatment: A Report From the Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *Arch. Intern. Med.* 166, 2191–2201.

Battistoni, A., Ucci, S., Nicoletti, C., Montezano, A.C., Filippini, A., Volpe, M., Touyz, R.M., and Savoia, C. (2021). ROLE OF ALDOSTERONE AND P66SHC PROTEIN ON EXPRESSION OF THE SODIUM-GLUCOSE TRANSPORTER SGLT2 IN THE VASCULAR SYSTEM. *J. Hypertens.* 39.

Bentley-Lewis, R., Aguilar, D., Riddle, M.C., Claggett, B., Diaz, R., Dickstein, K., Gerstein, H.C., Johnston, P., Køber, L.V., Lawson, F., et al. (2015). Rationale, design, and baseline characteristics in Evaluation of LIXisenatide in Acute Coronary Syndrome, a long-term cardiovascular end point trial of lixisenatide versus placebo. *Am. Heart J.* 169, 631-638.e7.

Bohlen, H.G., and Lash, J.M. (1993). Topical hyperglycemia rapidly suppresses EDRF-mediated vasodilation of normal rat arterioles. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 265, H219–H225.

Bolinder, J., Ljunggren, Ö., Kullberg, J., Johansson, L., Wilding, J., Langkilde, A.M., Sugg, J., and Parikh, S. (2012). Effects of Dapagliflozin on Body Weight, Total Fat Mass, and Regional Adipose Tissue Distribution in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus with Inadequate Glycemic Control on Metformin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, 1020–1031.

Bonora, B.M., Avogaro, A., and Fadini, G.P. (2018). Sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors and diabetic ketoacidosis: An updated review of the literature. *Diabetes Obes. Metab.* 20, 25–33.

- Bonora, B.M., Avogaro, A., and Fadini, G.P. (2020). Extraglycemic Effects of SGLT2 Inhibitors: A Review of the Evidence. *Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* *13*, 161–174.
- Bouthoorn, S., Valstar, G.B., and Gohar, A. The prevalence of left ventricular diastolic dysfunction and heart failure with preserved ejection fraction in men and women with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *17*.
- Brown, D.I., and Griendling, K.K. (2015). Regulation of Signal Transduction by Reactive Oxygen Species in the Cardiovascular System. *Circ. Res.* *116*, 531–549.
- Buse, J.B. (2007). Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) Trial: Design and Methods. *Ration. Des. Methods Action Control Cardiovasc. Risk Diabetes ACCORD Trial 99*, S21–S33.
- Cannon, C.P., Pratley, R., Dagogo-Jack, S., Mancuso, J., Huyck, S., Masiukiewicz, U., Charbonnel, B., Frederich, R., Gallo, S., Cosentino, F., et al. (2020). Cardiovascular Outcomes with Ertugliflozin in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* *383*, 1425–1435.
- Cassis, L.A., Police, S.B., Yiannikouris, F., and Thatcher, S.E. (2008). Local adipose tissue renin-angiotensin system. *Curr. Hypertens. Rep.* *10*, 93.
- Castoldi, G., Carletti, R., Ippolito, S., Colzani, M., Barzagli, F., Stella, A., Zerbini, G., Perseghin, G., and di Gioia, C.R.T. (2020). Renal Anti-Fibrotic Effect of Sodium Glucose Cotransporter 2 Inhibition in Angiotensin II-Dependent Hypertension. *Am. J. Nephrol.* *51*, 119–129.

Chen, J., Chen, J.-K., and Harris, R.C. (2012). Angiotensin II induces epithelial-to-mesenchymal transition in renal epithelial cells through reactive oxygen species/Src/caveolin-mediated activation of an epidermal growth factor receptor-extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 32, 981–991.

Cherney, D.Z., Perkins, B.A., Soleymanlou, N., Har, R., Fagan, N., Johansen, O.E., and Woerle, H.-J. (2014). The effect of empagliflozin on arterial stiffness and heart rate variability in subjects with uncomplicated type 1 diabetes mellitus. 8.

Chino, Y., Samukawa, Y., Sakai, S., Nakai, Y., Yamaguchi, J., Nakanishi, T., and Tamai, I. (2014). SGLT2 inhibitor lowers serum uric acid through alteration of uric acid transport activity in renal tubule by increased glycosuria. *Biopharm. Drug Dispos.* 35, 391–404.

Chow, B.S.M., and Allen, T.J. (2016). Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) in renal and cardiovascular disease. *Clin. Sci.* 130, 1307–1326.

Cleland, J.G.F., Tendera, M., Adamus, J., Freemantle, N., Polonski, L., Taylor, J., and on behalf of PEP-CHF Investigators (2006). The perindopril in elderly people with chronic heart failure (PEP-CHF) study. *Eur. Heart J.* 27, 2338–2345.

Cohen, N.D., Gutman, S.J., Briganti, E.M., and Taylor, A.J. (2019). Effects of empagliflozin treatment on cardiac function and structure in patients with type 2 diabetes: a cardiac magnetic resonance study. *Intern. Med. J.* 49, 1006–1010.

Connelly Kim A., Zhang Yanling, Visram Aylin, Advani Andrew, Batchu Sri N., Desjardins Jean-François, Thai Kerri, and Gilbert Richard E. (2019). Empagliflozin Improves Diastolic Function in a Nondiabetic Rodent Model of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *JACC Basic Transl. Sci.* 4, 27–37.

Connelly, K.A., Zhang, Y., Desjardins, J.-F., Nghiem, L., Visram, A., Batchu, S.N., Yerra, V.G., Kabir, G., Thai, K., Advani, A., et al. (2020). Load-independent effects of empagliflozin contribute to improved cardiac function in experimental heart failure with reduced ejection fraction. *Cardiovasc. Diabetol.* *19*, 13.

Cosentino, F., Cannon, C.P., Cherney, D.Z.I., Masiukiewicz, U., Pratley, R., Dagogo-Jack, S., Frederich, R., Charbonnel, B., Mancuso, J., Shih, W.J., et al. (2020). Efficacy of Ertugliflozin on Heart Failure–Related Events in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Established Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Circulation* *142*, 2205–2215.

Crowley, S.D., Gurley, S.B., Herrera, M.J., Ruiz, P., Griffiths, R., Kumar, A.P., Kim, H.-S., Smithies, O., Le, T.H., and Coffman, T.M. (2006). Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 17985.

Currie, G., Bethel, M.A., Holzhauser, B., Haffner, S.M., Holman, R.R., and McMurray, J.J.V. (2017). Effect of valsartan on kidney outcomes in people with impaired glucose tolerance. *Diabetes Obes. Metab.* *19*, 791–799.

Dahlöf, B., Devereux, R.B., Kjeldsen, S.E., Julius, S., Beevers, G., de Faire, U., Fyhrquist, F., Ibsen, H., Kristiansson, K., Lederballe-Pedersen, O., et al. (2002). Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *The Lancet* *359*, 995–1003.

Darmellah, A., Baetz, D., Prunier, F., Tamareille, S., Rücker-Martin, C., and Feuvray, D. (2007). Enhanced activity of the myocardial Na⁺/H⁺ exchanger contributes to left ventricular hypertrophy in the Goto–Kakizaki rat model of type 2 diabetes: critical role of Akt. *Diabetologia* *50*, 1335–1344.

Davies, M.J., D'Alessio, D.A., Fradkin, J., Kernan, W.N., Mathieu, C., Mingrone, G., Rossing, P., Tsapas, A., Wexler, D.J., and Buse, J.B. (2018a). Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2018. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetologia* 61, 2461–2498.

Delafontaine, P., Anwar, A., Lou, H., and Ku, L. (1996). G-protein coupled and tyrosine kinase receptors: evidence that activation of the insulin-like growth factor I receptor is required for thrombin-induced mitogenesis of rat aortic smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 97, 139–145.

DeMarco, V.G., Habibi, J., Jia, G., Aroor, A.R., Ramirez-Perez, F.I., Martinez-Lemus, L.A., Bender, S.B., Garro, M., Hayden, M.R., Sun, Z., et al. (2015). Low-Dose Mineralocorticoid Receptor Blockade Prevents Western Diet–Induced Arterial Stiffening in Female Mice. *Hypertension* 66, 99–107.

Desjardins, J., Zhang, Y., Thai, K., Kabir, G., Gilbert, R., and Connelly, K. (2017). EMPAGLIFLOZIN REDUCES LV MASS AND IMPROVES DIASTOLIC FUNCTION IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF HEART FAILURE WITH PRESERVED EF. *Can. J. Cardiol.* 33, S137–S138.

Devereux, R.B., Dahlöf, B., Gerds, E., Boman, K., Nieminen, M.S., Papademetriou, V., Rokkedal, J., Harris, K.E., Edelman, J.M., and Wachtell, K. (2004). Regression of Hypertensive Left Ventricular Hypertrophy by Losartan Compared With Atenolol. *Circulation* 110, 1456–1462.

Di Franco, A., Cantini, G., Tani, A., Coppini, R., Zecchi-Orlandini, S., Raimondi, L., Luconi, M., and Mannucci, E. (2017). Sodium-dependent glucose transporters (SGLT) in human ischemic heart: A new potential pharmacological target. *Int. J. Cardiol.* *243*, 86–90.

Dluhy, R.G., and McMahon, G.T. (2008). Intensive Glycemic Control in the ACCORD and ADVANCE Trials. *N. Engl. J. Med.* *358*, 2630–2633.

Dominici, F.P., Burghi, V., Muñoz, M.C., and Giani, J.F. (2014). Modulation of the action of insulin by angiotensin-(1–7). *Clin. Sci.* *126*, 613–630.

Eguchi, S., Kawai, T., Scalia, R., and Rizzo, V. (2018). Understanding Angiotensin II Type 1 Receptor Signaling in Vascular Pathophysiology. *Hypertension* *71*, 804–810.

Elliott, K.J., Bourne, A.M., Takayanagi, T., Takaguri, A., Kobayashi, T., Eguchi, K., and Eguchi, S. (2013). ADAM17 silencing by adenovirus encoding miRNA-embedded siRNA revealed essential signal transduction by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *62*, 1–7.

Eriksson, J.W., Lundkvist, P., Jansson, P.-A., Johansson, L., Kvarnström, M., Moris, L., Miliotis, T., Forsberg, G.-B., Risérus, U., Lind, L., et al. (2018). Effects of dapagliflozin and n-3 carboxylic acids on non-alcoholic fatty liver disease in people with type 2 diabetes: a double-blind randomised placebo-controlled study. *Diabetologia* *61*, 1923–1934.

Fadini, G.P. (2017). Effects of the SGLT2 inhibitor dapagliflozin on HDL cholesterol, particle size, and cholesterol efflux capacity in patients with type 2 diabetes: a randomized placebo-controlled trial. *10*.

Fadini, G.P., Sciannameo, V., Franzetti, I., Bottigliengo, D., D'Angelo, P., Vinci, C., Berchialla, P., Arena, S., Buzzetti, R., Avogaro, A., et al. (2019). Similar effectiveness of dapagliflozin and GLP-1 receptor agonists concerning combined endpoints in routine clinical practice: A multicentre retrospective study. *Diabetes Obes. Metab.* *21*, 1886–1894.

Feig, D.I., Kang, D.-H., and Johnson, R.J. (2008). Uric Acid and Cardiovascular Risk. *N. Engl. J. Med.* *359*, 1811–1821.

Ferrannini, E., Baldi, S., Frascerra, S., Astiarraga, B., Heise, T., Bizzotto, R., Mari, A., Pieber, T.R., and Muscelli, E. (2016). Shift to Fatty Substrate Utilization in Response to Sodium–Glucose Cotransporter 2 Inhibition in Subjects Without Diabetes and Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes* *65*, 1190.

Ferrannini, G., Hach, T., Crowe, S., Sanghvi, A., Hall, K.D., and Ferrannini, E. (2015). Energy Balance After Sodium–Glucose Cotransporter 2 Inhibition. *Diabetes Care* *38*, 1730.

Flammer, A.J., Hermann, F., Wiesli, P., Schwegler, B., Chenevard, R., Hürlimann, D., Sudano, I., Gay, S., Neidhart, M., Riesen, W., et al. (2007). Effect of losartan, compared with atenolol, on endothelial function and oxidative stress in patients with type 2 diabetes and hypertension. *J. Hypertens.* *25*, 785–791.

Folli, F., Kahn, C.R., Hansen, H., Bouchie, J.L., and Feener, E.P. (1997). Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. *J. Clin. Invest.* *100*, 2158–2169.

Forrester, S.J., Kawai, T., O'Brien, S., Thomas, W., Harris, R.C., and Eguchi, S. (2016). Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation: Mechanisms, Pathophysiology, and

Potential Therapies in the Cardiovascular System. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 56, 627–653.

Forrester, S.J., Booz, G.W., Sigmund, C.D., Coffman, T.M., Kawai, T., Rizzo, V., Scalia, R., and Eguchi, S. (2018). Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* 98, 1627–1738.

Förstermann, U., Xia, N., and Li, H. (2017). Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ. Res.* 120, 713–735.

From Aaron M., Scott Christopher G., and Chen Horng H. (2010). The Development of Heart Failure in Patients With Diabetes Mellitus and Pre-Clinical Diastolic Dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 55, 300–305.

Fukuda, D., and Sata, M. (2016). Glycemic Control with Ipragliflozin, a Novel Selective SGLT2 Inhibitor, Ameliorated Endothelial Dysfunction in Streptozotocin-Induced Diabetic Mouse. *Front. Cardiovasc. Med.* 3, 9.

Garrido, A.M., and Griendling, K.K. (2009). NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 302, 148–158.

Garvey, W.T., Van Gaal, L., Leiter, L.A., Vijapurkar, U., List, J., Cuddihy, R., Ren, J., and Davies, M.J. (2018). Effects of canagliflozin versus glimepiride on adipokines and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes. *Metabolism* 85, 32–37.

de Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W., and Unger, Th. (2000). International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacol. Rev.* 52, 415.

Ghezzi, C., and Wright, E.M. (2012). Regulation of the human Na⁺-dependent glucose cotransporter hSGLT2. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* *303*, C348–C354.

Ghezzi, C., Loo, D.D.F., and Wright, E.M. (2018). Physiology of renal glucose handling via SGLT1, SGLT2 and GLUT2. *Diabetologia* *61*, 2087–2097.

Giacco, F., and Brownlee, M. (2010). Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circ. Res.* *107*, 1058–1070.

Giani, J.F., Shah, K.H., Khan, Z., Bernstein, E.A., Shen, X.Z., McDonough, A.A., Gonzalez-Villalobos, R.A., and Bernstein, K.E. (2015). The intrarenal generation of angiotensin II is required for experimental hypertension. *Curr. Opin. Pharmacol.* *21*, 73–81.

Girard, J. (2015). Mécanisme d'action des inhibiteurs du cotransporteur sodiumglucose de type 2 (SGLT2). *Inhib. SGLT2 Une Nouv. Cl. Thérapeutique Pour Trait. Diabètes* *9*, S10–S16.

Grant, P.J., and Cosentino, F. (2019). The 2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: New features and the 'Ten Commandments' of the 2019 Guidelines are discussed by Professor Peter J. Grant and Professor Francesco Cosentino, the Task Force chairmen. *Eur. Heart J.* *40*, 3215–3217.

Green, J.B., Bethel, M.A., Armstrong, P.W., Buse, J.B., Engel, S.S., Garg, J., Josse, R., Kaufman, K.D., Koglin, J., Korn, S., et al. (2015). Effect of Sitagliptin on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* *373*, 232–242.

Guzik, T.J., Hoch, N.E., Brown, K.A., McCann, L.A., Rahman, A., Dikalov, S., Goronzy, J., Weyand, C., and Harrison, D.G. (2007). Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J. Exp. Med.* 204, 2449–2460.

Habibi, J., Aroor, A.R., Sowers, J.R., Jia, G., Hayden, M.R., Garro, M., Barron, B., Mayoux, E., Rector, R.S., Whaley-Connell, A., et al. (2017). Sodium glucose transporter 2 (SGLT2) inhibition with empagliflozin improves cardiac diastolic function in a female rodent model of diabetes. *Cardiovasc. Diabetol.* 16, 9.

Hammoudi, N., Jeong, D., Singh, R., Farhat, A., Komajda, M., Mayoux, E., Hajjar, R., and Lebeche, D. (2017). Empagliflozin Improves Left Ventricular Diastolic Dysfunction in a Genetic Model of Type 2 Diabetes. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 31, 233–246.

Hansson, L., Lindholm, L.H., Niskanen, L., Lanke, J., Hedner, T., Niklason, A., Luomanmäki, K., Dahlöf, B., de Faire, U., Mörlin, C., et al. (1999). Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *The Lancet* 353, 611–616.

Harrison, D., Griendling, K.K., Landmesser, U., Hornig, B., and Drexler, H. (2003). Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 91, 7–11.

Harrison, D.G., Guzik, T.J., Lob, H.E., Madhur, M.S., Marvar, P.J., Thabet, S.R., Vinh, A., and Weyand, C.M. (2011). Inflammation, immunity, and hypertension. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 57, 132–140.

Harvey, A., Montezano, A.C., Lopes, R.A., Rios, F., and Touyz, R.M. (2016). Vascular Fibrosis in Aging and Hypertension: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Can. J. Cardiol.* 32, 659–668.

Heeneman, S., Haendeler, J., Saito, Y., Ishida, M., and Berk, B.C. (2000). Angiotensin II Induces Transactivation of Two Different Populations of the Platelet-derived Growth Factor β Receptor: KEY ROLE FOR THE p66 ADAPTOR PROTEIN Shc*. *J. Biol. Chem.* 275, 15926–15932.

Heerspink, H.J.L., Perkins, B.A., Fitchett, D.H., Husain, M., and Cherney, D.Z.I. (2016). Sodium Glucose Cotransporter 2 Inhibitors in the Treatment of Diabetes Mellitus: Cardiovascular and Kidney Effects, Potential Mechanisms, and Clinical Applications. *Circulation* 134, 752–772.

Higuchi, S., Ohtsu, H., Suzuki, H., Shirai, H., Frank, G.D., and Eguchi, S. (2007). Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin. Sci.* 112, 417–428.

Hink, U., Li, H., Mollnau, H., Oelze, M., Matheis, E., Hartmann, M., Skatchkov, M., Thaiss, F., Stahl, R.A.K., Warnholtz, A., et al. (2001). Mechanisms Underlying Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Circ. Res.* 88, e14–e22.

Hirsch, J.R., Loo, D.D.F., and Wright, E.M. (1996a). Regulation of Na⁺/Glucose Cotransporter Expression by Protein Kinases in Oocytes. *J. Biol. Chem.* 271, 14740–14746.

Hirsch, J.R., Loo, D.D.F., and Wright, E.M. (1996b). Regulation of Na⁺/Glucose Cotransporter Expression by Protein Kinases in Oocytes. *J. Biol. Chem.* 271, 14740–14746.

Hui, H., Farilla, L., Merkel, P., and Perfetti, R. (2002). The short half-life of glucagon-like peptide-1 in plasma does not reflect its long-lasting beneficial effects. *Eur. J. Endocrinol.* 863–869.

Inzucchi, S.E., Kosiborod, M., Fitchett, D., Wanner, C., Hehnke, U., Kaspers, S., George, J.T., and Zinman, B. (2018). Improvement in Cardiovascular Outcomes With Empagliflozin Is Independent of Glycemic Control. *Circulation* 138, 1904–1907.

Ismail-Beigi, F., Craven, T., Banerji, M.A., Basile, J., Calles, J., Cohen, R.M., Cuddihy, R., Cushman, W.C., Genuth, S., Grimm, R.H., et al. (2010). Effect of intensive treatment of hyperglycaemia on microvascular outcomes in type 2 diabetes: an analysis of the ACCORD randomised trial. *The Lancet* 376, 419–430.

Jayasooriya, A.P., Mathai, M.L., Walker, L.L., Begg, D.P., Denton, D.A., Cameron-Smith, D., Egan, G.F., McKinley, M.J., Rodger, P.D., Sinclair, A.J., et al. (2008). Mice lacking angiotensin-converting enzyme have increased energy expenditure, with reduced fat mass and improved glucose clearance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 6531.

Jekell, A., Malmqvist, K., Wallén, N.H., Mörtzell, D., and Kahan, T. (2013). Markers of inflammation, endothelial activation, and arterial stiffness in hypertensive heart disease and the effects of treatment: results from the SILVHIA study. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 62, 559–566.

Jia, G., Hill, M.A., and Sowers, J.R. (2018). Diabetic Cardiomyopathy. *Circ. Res.* 122, 624–638.

Johnstone, M., Creager, S., Scales, K., Cusco, J., Lee, B., and Creager, M. (1993). Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 88, 2510–2516.

Joubert, M., Jagu, B., Montaigne, D., Marechal, X., Tesse, A., Ayer, A., Dollet, L., Le May, C., Toumaniantz, G., Manrique, A., et al. (2017). The Sodium–Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Dapagliflozin Prevents Cardiomyopathy in a Diabetic Lipodystrophic Mouse Model. *Diabetes* 66, 1030.

Julius, S., Kjeldsen, S.E., Weber, M., Brunner, H.R., Ekman, S., Hansson, L., Hua, T., Laragh, J., McInnes, G.T., Mitchell, L., et al. (2004). Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial. *The Lancet* 363, 2022–2031.

Kaschina, E., Namsolleck, P., and Unger, T. (2017). AT2 receptors in cardiovascular and renal diseases. *Front. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst. Res.* 125, 39–47.

Kashiwagi, Y., Nagoshi, T., Yoshino, T., Tanaka, T.D., Ito, K., Harada, T., Takahashi, H., Ikegami, M., Anzawa, R., and Yoshimura, M. (2015). Expression of SGLT1 in Human Hearts and Impairment of Cardiac Glucose Uptake by Phlorizin during Ischemia-Reperfusion Injury in Mice. *PLOS ONE* 10, e0130605.

Khemais-Benkhiat, S., Belcastro, E., Idris-Khodja, N., Park, S., Amoura, L., Abbas, M., Auger, C., Kessler, L., Mayoux, E., Toti, F., et al. (2020). Angiotensin II-induced redox-sensitive SGLT1 and 2 expression promotes high glucose-induced endothelial cell senescence. *J. Cell. Mol. Med.* 24, 2109–2122.

- Kim, J., Montagnani, M., Koh, K.K., and Quon, M.J. (2006). Reciprocal Relationships Between Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction. *Circulation* *113*, 1888–1904.
- King, P., Peacock, I., and Donnelly, R. (1999). The UK Prospective Diabetes Study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. *Br. J. Clin. Pharmacol.* *48*, 643–648.
- Kinlay, S., and Ganz, P. (1997). Role of Endothelial Dysfunction in Coronary Artery Disease and Implications for Therapy. *Am. J. Cardiol.* *80*, 11I-16I.
- de Kloet, A.D., Krause, E.G., Kim, D.-H., Sakai, R.R., Seeley, R.J., and Woods, S.C. (2009). The Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Using Captopril on Energy Balance and Glucose Homeostasis. *Endocrinology* *150*, 4114–4123.
- Knatterud, G.L., Meinert, C.L., Klimt, C.R., Osborne, R.K., and Martin, D.B. (1971). Effects of Hypoglycemic Agents on Vascular Complications in Patients With Adult-Onset Diabetes: IV. A Preliminary Report on Phenformin Results. *JAMA* *217*, 777–784.
- Kobori, H., Nangaku, M., Navar, L.G., and Nishiyama, A. (2007). The Intrarenal Renin-Angiotensin System: From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and Kidney Disease. *Pharmacol. Rev.* *59*, 251.
- Kong, P., Christia, P., and Frangogiannis, N.G. (2014). The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell. Mol. Life Sci.* *71*, 549–574.
- Kosiborod, M., Cavender, M.A., Fu, A.Z., Wilding, J.P., Khunti, K., Holl, R.W., Norhammar, A., Birkeland, K.I., Jørgensen, M.E., Thuresson, M., et al. (2017). Lower Risk of Heart Failure and Death in Patients Initiated on Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors Versus

Other Glucose-Lowering Drugs: The CVD-REAL Study (Comparative Effectiveness of Cardiovascular Outcomes in New Users of Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors). *Circulation* 136, 249–259.

Kristensen, S.L., Rørth, R., Jhund, P.S., Docherty, K.F., Sattar, N., Preiss, D., Køber, L., Petrie, M.C., and McMurray, J.J.V. (2019). Cardiovascular, mortality, and kidney outcomes with GLP-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cardiovascular outcome trials. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 7, 776–785.

Kuchay, M.S., Krishan, S., Mishra, S.K., Farooqui, K.J., Singh, M.K., Wasir, J.S., Bansal, B., Kaur, P., Jevalikar, G., Gill, H.K., et al. (2018). Effect of Empagliflozin on Liver Fat in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Controlled Trial (E-LIFT Trial). *Diabetes Care* 41, 1801–1808.

Kusaka, H., Koibuchi, N., Hasegawa, Y., Ogawa, H., and Kim-Mitsuyama, S. (2016). Empagliflozin lessened cardiac injury and reduced visceral adipocyte hypertrophy in prediabetic rats with metabolic syndrome. *Cardiovasc. Diabetol.* 15, 157.

Lai En Yin, Solis Glenn, Luo Zaiming, Carlstrom Mattias, Sandberg Kathryn, Holland Steven, Wellstein Anton, Welch William J., and Wilcox Christopher S. (2012). p47phox Is Required for Afferent Arteriolar Contractile Responses to Angiotensin II and Perfusion Pressure in Mice. *Hypertension* 59, 415–420.

Lambert, R., Srodulski, S., Peng, X., Margulies, K.B., Despa, F., and Despa, S. (2015). Intracellular Na^+ Concentration ($[\text{Na}^+]_i$) Is Elevated in Diabetic Hearts Due to Enhanced Na^+ -Glucose Cotransport. *J. Am. Heart Assoc.* 4.

- Lan, N.S.R., Fegan, P.G., Yeap, B.B., and Dwivedi, G. (2019). The effects of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors on left ventricular function: current evidence and future directions. *ESC Heart Fail.* *6*, 927–935.
- Lastra, G., Dhuper, S., Johnson, M.S., and Sowers, J.R. (2010). Salt, aldosterone, and insulin resistance: impact on the cardiovascular system. *Nat. Rev. Cardiol.* *7*, 577–584.
- Lavoie, J.L., and Sigmund, C.D. (2003). Minireview: Overview of the Renin-Angiotensin System—An Endocrine and Paracrine System. *Endocrinology* *144*, 2179–2183.
- Lee, D.M., Battson, M.L., Jarrell, D.K., Hou, S., Ecton, K.E., Weir, T.L., and Gentile, C.L. (2018). SGLT2 inhibition via dapagliflozin improves generalized vascular dysfunction and alters the gut microbiota in type 2 diabetic mice. *Cardiovasc. Diabetol.* *17*, 62.
- Lee, M.H., Song, H.K., Ko, G.J., Kang, Y.S., Han, S.Y., Han, K.H., Kim, H.K., Han, J.Y., and Cha, D.R. (2008). Angiotensin receptor blockers improve insulin resistance in type 2 diabetic rats by modulating adipose tissue. *Kidney Int.* *74*, 890–900.
- Lee, S.Y., Lee, T.W., Park, G.T., Kim, J.H., Lee, H.-C., Han, J.-H., Yoon, A., Yoon, D., Kim, S., Jung, S.M., et al. (2020). Sodium/glucose Co-Transporter 2 Inhibitor, Empagliflozin, Alleviated Transient Expression of SGLT2 after Myocardial Infarction. *Kcj* *51*, 251–262.
- Lee, T.-M., Chang, N.-C., and Lin, S.-Z. (2017). Dapagliflozin, a selective SGLT2 Inhibitor, attenuated cardiac fibrosis by regulating the macrophage polarization via STAT3 signaling in infarcted rat hearts. *Free Radic. Biol. Med.* *104*, 298–310.

- Leiter, L.A., Forst, T., Polidori, D., Balis, D.A., Xie, J., and Sha, S. (2016). Effect of canagliflozin on liver function tests in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* *42*, 25–32.
- Lerman, A., and Burnett, J. (1992). Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation* *86*, III12-19.
- Li, C., Zhang, J., Xue, M., Li, X., Han, F., Liu, X., Xu, L., Lu, Y., Cheng, Y., Li, T., et al. (2019). SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart. *Cardiovasc. Diabetol.* *18*, 15.
- Li, C.-Y., Wang, L.-X., Dong, S.-S., Hong, Y., Zhou, X.-H., Zheng, W.-W., and Zheng, C. (2018). Phlorizin Exerts Direct Protective Effects on Palmitic Acid (PA)-Induced Endothelial Dysfunction by Activating the PI3K/AKT/eNOS Signaling Pathway and Increasing the Levels of Nitric Oxide (NO). *Med. Sci. Monit. Basic Res.* *24*, 1–9.
- Li, L., Feng, D., Luo, Z., Welch, W.J., Wilcox, C.S., and Lai, E.Y. (2015a). Remodeling of Afferent Arterioles From Mice With Oxidative Stress Does Not Account for Increased Contractility but Does Limit Excessive Wall Stress. *Hypertens. Dallas Tex* *1979* *66*, 550–556.
- Li, X.C., Shull, G.E., Miguel-Qin, E., and Zhuo, J.L. (2015b). Role of the Na⁺/H⁺ exchanger 3 in angiotensin II-induced hypertension. *Physiol. Genomics* *47*, 479–487.
- Lin, B., Koibuchi, N., Hasegawa, Y., Sueta, D., Toyama, K., Uekawa, K., Ma, M., Nakagawa, T., Kusaka, H., and Kim-Mitsuyama, S. (2014). Glycemic control with empagliflozin, a novel selective SGLT2 inhibitor, ameliorates cardiovascular injury and cognitive dysfunction in obese and type 2 diabetic mice. *Cardiovasc. Diabetol.* *13*, 148.

Liu, Y., Dai, S., Liu, L., Liao, H., and Xiao, C. (2018). Spironolactone is superior to hydrochlorothiazide for blood pressure control and arterial stiffness improvement: A prospective study. *Medicine (Baltimore)* 97, e0500–e0500.

Lonardo, A., Nascimbeni, F., Mantovani, A., and Targher, G. (2018). Hypertension, diabetes, atherosclerosis and NASH: Cause or consequence? *J. Hepatol.* 68, 335–352.

Lteif, A.A., Han, K., and Mather, K.J. (2005). Obesity, Insulin Resistance, and the Metabolic Syndrome. *Circulation* 112, 32–38.

Luo, R., Zhang, W., Zhao, C., Zhang, Y., Wu, H., Jin, J., Zhang, W., Grenz, A., Eltzschig, H.K., Tao, L., et al. (2015). Elevated Endothelial Hypoxia-Inducible Factor-1 α Contributes to Glomerular Injury and Promotes Hypertensive Chronic Kidney Disease. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 66, 75–84.

Luther, J.M., and Brown, N.J. (2011). The renin–angiotensin–aldosterone system and glucose homeostasis. *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 734–739.

Madhur, M.S., Lob, H.E., McCann, L.A., Iwakura, Y., Blinder, Y., Guzik, T.J., and Harrison, D.G. (2010). Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 55, 500–507.

Man Son, S., Whalin, M.K., Harrison, D.G., Taylor, W.R., and Griendling, K.K. (2004). Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Curr. Diab. Rep.* 4, 247–252.

Mancia, G., De Backer, G., Dominiczak, A., Cifkova, R., Fagard, R., Germano, G., Grassi, G., Heagerty, A.M., Kjeldsen, S.E., Laurent, S., et al. (2007). 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial

Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J. Hypertens.* 25, 1105–1187.

Marso, S.P., Daniels, G.H., Brown-Frandsen, K., Kristensen, P., Mann, J.F.E., Nauck, M.A., Nissen, S.E., Pocock, S., Poulter, N.R., Ravn, L.S., et al. (2016). Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* 375, 311–322.

Massie, B.M., Carson, P.E., McMurray, J.J., Komajda, M., McKelvie, R., Zile, M.R., Anderson, S., Donovan, M., Iverson, E., Staiger, C., et al. (2008). Irbesartan in Patients with Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. *N. Engl. J. Med.* 359, 2456–2467.

Matavelli, L.C., and Siragy, H.M. (2015). AT2 receptor activities and pathophysiological implications. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 65, 226–232.

Matsui-Hirai, H., Hayashi, T., Yamamoto, S., Ina, K., Maeda, M., Kotani, H., Iguchi, A., Ignarro, L.J., and Hattori, Y. (2011). Dose-Dependent Modulatory Effects of Insulin on Glucose-Induced Endothelial Senescence In Vitro and In Vivo: A Relationship between Telomeres and Nitric Oxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 337, 591.

Matsutani, D., Sakamoto, M., Kayama, Y., Takeda, N., Horiuchi, R., and Utsunomiya, K. (2018). Effect of canagliflozin on left ventricular diastolic function in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc. Diabetol.* 17, 73.

McMurray, J.J.V., Gerstein, H.C., Holman, R.R., and Pfeffer, M.A. (2014). Heart failure: a cardiovascular outcome in diabetes that can no longer be ignored. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2, 843–851.

McMurray, J.J.V., Solomon, S.D., Inzucchi, S.E., Køber, L., Kosiborod, M.N., Martinez, F.A., Ponikowski, P., Sabatine, M.S., Anand, I.S., Bělohávek, J., et al. (2019). Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *N. Engl. J. Med.* *381*, 1995–2008.

Mehta, P.K., and Griendling, K.K. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* *292*, C82–C97.

Mennuni, S., Rubattu, S., Pierelli, G., Tocci, G., Fofi, C., and Volpe, M. (2014). Hypertension and kidneys: unraveling complex molecular mechanisms underlying hypertensive renal damage. *J. Hum. Hypertens.* *28*, 74–79.

Meune, C., Wahbi, K., Duboc, D., and Weber, S. (2011). Meta-Analysis of Renin-Angiotensin-Aldosterone Blockade for Heart Failure in Presence of Preserved Left Ventricular Function. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* *16*, 368–375.

Meyrelles, S.S., Peotta, V.A., Pereira, T.M.C., and Vasquez, E.C. (2011). Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids Health Dis.* *10*, 211–211.

Mitchell, G.F., Hwang, S.-J., Vasan, R.S., Larson, M.G., Pencina, M.J., Hamburg, N.M., Vita, J.A., Levy, D., and Benjamin, E.J. (2010). Arterial stiffness and cardiovascular events: the Framingham Heart Study. *Circulation* *121*, 505–511.

Miyata, K.N., Lo, C.-S., Zhao, S., Liao, M.-C., Pang, Y., Chang, S.-Y., Peng, J., Kretzler, M., Filep, J.G., Ingelfinger, J.R., et al. (2021). Angiotensin II up-regulates sodium-glucose co-

transporter 2 expression and SGLT2 inhibitor attenuates Ang II-induced hypertensive renal injury in mice. *Clin. Sci.* 135, 943–961.

Montecucco, F., Pende, A., and Mach, F. (2009). The renin-angiotensin system modulates inflammatory processes in atherosclerosis: evidence from basic research and clinical studies. *Mediators Inflamm.* 2009, 752406–752406.

Montezano, A.C., Nguyen Dinh Cat, A., Rios, F.J., and Touyz, R.M. (2014). Angiotensin II and Vascular Injury. *Curr. Hypertens. Rep.* 16, 431.

Nair, S., and Wilding, J.P.H. (2010). Sodium Glucose Cotransporter 2 Inhibitors as a New Treatment for Diabetes Mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 34–42.

Nauck, M. (2014). Update on developments with SGLT2 inhibitors in the management of type 2 diabetes. *Drug Des. Devel. Ther.* 1335.

Neal, B., Mahaffey, K.W., Erond, N., and Desai, M. (2017). Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 14.

Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.-P., et al. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404, 787–790.

Nissen, S.E., and Wolski, K. (2007). Effect of Rosiglitazone on the Risk of Myocardial Infarction and Death from Cardiovascular Causes. *N. Engl. J. Med.* 356, 2457–2471.

Odenbach, J., Wang, X., Cooper, S., Chow, F.L., Oka, T., Lopaschuk, G., Kassiri, Z., and Fernandez-Patron, C. (2011). MMP-2 Mediates Angiotensin II–Induced Hypertension Under the Transcriptional Control of MMP-7 and TACE. *Hypertension* 57, 123–130.

Oelze, M., Kröller-Schön, S., Welschhof, P., Jansen, T., Hausding, M., Mikhed, Y., Stamm, P., Mader, M., Zinßius, E., Agdauletova, S., et al. (2014). The Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitor Empagliflozin Improves Diabetes-Induced Vascular Dysfunction in the Streptozotocin Diabetes Rat Model by Interfering with Oxidative Stress and Glucotoxicity. *PLoS ONE* 9, e112394.

Ohtsu, H., Dempsey, P.J., Frank, G.D., Brailoiu, E., Higuchi, S., Suzuki, H., Nakashima, H., Eguchi, K., and Eguchi, S. (2006). ADAM17 Mediates Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation and Vascular Smooth Muscle Cell Hypertrophy Induced by Angiotensin II. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, e133–e137.

Pabel, S., Wagner, S., Bollenberg, H., Bengel, P., Kovács, Á., Schach, C., Tirilomis, P., Mustroph, J., Renner, A., Gummert, J., et al. (2018). Empagliflozin directly improves diastolic function in human heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 20, 1690–1700.

Packer, M., Anker, S.D., Butler, J., Filippatos, G., Pocock, S.J., Carson, P., Januzzi, J., Verma, S., Tsutsui, H., Brueckmann, M., et al. (2020). Cardiovascular and Renal Outcomes with Empagliflozin in Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* 383, 1413–1424.

Padia, S.H., and Carey, R.M. (2013). AT2 receptors: beneficial counter-regulatory role in cardiovascular and renal function. *Pflugers Arch.* 465, 99–110.

Paredes, S., Matta-Coelho, C., Monteiro, A.M., Brás, A., Marques, O., Alves, M., and Ribeiro, L. (2016). Cardiovascular safety of type 2 diabetes medications: Review of existing literature and clinical implications. *Hormones* 15, 170–185.

Park, S.-H. (2020). Empagliflozin improved systolic blood pressure, endothelial dysfunction and heart remodeling in the metabolic syndrome ZSF1 rat.

Park, S.-H. (2021). Angiotensin II-induced upregulation of SGLT1 and 2 contributes to human microparticle-stimulated endothelial senescence and dysfunction: protective effect of gliflozins.

Peng, F., Pan, H., Wang, B., Lin, J., and Niu, W. (2015). The impact of angiotensin receptor blockers on arterial stiffness: a meta-analysis. *Hypertens. Res.* 38, 613–620.

Perlstein, T.S., Henry, R.R., Mather, K.J., Rickels, M.R., Abate, N.I., Grundy, S.M., Mai, Y., Albu, J.B., Marks, J.B., Pool, J.L., et al. (2012). Effect of angiotensin receptor blockade on insulin sensitivity and endothelial function in abdominally obese hypertensive patients with impaired fasting glucose. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 122, 193–202.

Pfeffer, M.A., Swedberg, K., Granger, C.B., Held, P., McMurray, J.J., Michelson, E.L., Olofsson, B., Östergren, J., and Yusuf, S. (2003). Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *The Lancet* 362, 759–766.

Pfeffer, M.A., Claggett, B., Diaz, R., Dickstein, K., Gerstein, H.C., Køber, L.V., Lawson, F.C., Ping, L., Wei, X., Lewis, E.F., et al. (2015). Lixisenatide in Patients with Type 2 Diabetes and Acute Coronary Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 373, 2247–2257.

Pieper, G.M., Langenstroer, P., and Siebeneich, W. (1997). Diabetic-induced endothelial dysfunction in rat aorta: role of hydroxyl radicals. *Cardiovasc. Res.* 34, 145–156.

Ponikowski, P., Voors, A.A., Anker, S.D., Bueno, H., Cleland, J.G.F., Coats, A.J.S., Falk, V., González-Juanatey, J.R., Harjola, V.-P., Jankowska, E.A., et al. (2016). 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur. Heart J.* 37, 2129–2200.

Pontes, R.B., Girardi, A.C.C., Nishi, E.E., Campos, R.R., and Bergamaschi, C.T. (2015a). Crosstalk between the renal sympathetic nerve and intrarenal angiotensin II modulates proximal tubular sodium reabsorption. *Exp. Physiol.* 100, 502–506.

Pontes, R.B., Crajoinas, R.O., Nishi, E.E., Oliveira-Sales, E.B., Girardi, A.C., Campos, R.R., and Bergamaschi, C.T. (2015b). Renal nerve stimulation leads to the activation of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 via angiotensin II type I receptor. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 308, F848-56.

Pontoglio, M., Prié, D., Cheret, C., Doyen, A., Leroy, C., Froguel, P., Velho, G., Yaniv, M., and Friedlander, G. (2000). HNF1 α controls renal glucose reabsorption in mouse and man. *EMBO Rep.* 1, 359–365.

Poulsen, S.B., Fenton, R.A., and Rieg, T. (2015). Sodium-glucose cotransport: *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 24, 463–469.

Raffetto, J.D., and Khalil, R.A. (2008). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem. Pharmacol.* 75, 346–359.

- Rahmoune, H., Thompson, P.W., Ward, J.M., Smith, C.D., Hong, G., and Brown, J. (2005). Glucose Transporters in Human Renal Proximal Tubular Cells Isolated From the Urine of Patients With Non–Insulin-Dependent Diabetes. *Diabetes* 54, 3427.
- Ramirez, A.J., Sanchez, M.J., and Sanchez, R.A. (2019). Diabetic patients with essential hypertension treated with amlodipine: blood pressure and arterial stiffness effects of canagliflozin or perindopril. *J. Hypertens.* 37.
- Ramkumar, N., and Kohan, D.E. (2016). The nephron (pro)renin receptor: function and significance. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* 311, F1145–F1148.
- Rieg, T., and Vallon, V. (2018). Development of SGLT1 and SGLT2 inhibitors. *Diabetologia* 61, 2079–2086.
- Riquier-Brison, A.D.M., Leong, P.K.K., Pihakaski-Maunsbach, K., and McDonough, A.A. (2009). Angiotensin II stimulates trafficking of NHE3, NaPi2, and associated proteins into the proximal tubule microvilli. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* 298, F177–F186.
- Rizos, C.V., Liberopoulos, E.N., Tellis, C.C., Tselepis, A.D., and Elisaf, M.S. (2013). The effect of combining rosuvastatin with sartans of different peroxisome proliferator receptor- γ activating capacity on plasma 8-isoprostane prostaglandin F2a levels. *Arch. Med. Sci. AMS* 9, 172–176.
- Robinson, L.E., Holt, T.A., Rees, K., and Randeve, H.S. Effects of exenatide and liraglutide on heart rate, blood pressure and body weight: systematic review and meta-analysis. 16.
- Rojas, E., Velasco, M., Bermudez, V., Israili, Z., and Bolli, P. (2012). Targeting Hypertension in Patients with Cardiorenal Metabolic Syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* 14, 397–402.

Rossetti, L., Smith, D., Shulman, G.I., Papachristou, D., and DeFronzo, R.A. (1987). Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 79, 1510–1515.

Rüster, C., and Wolf, G. (2011). Angiotensin II as a Morphogenic Cytokine Stimulating Renal Fibrogenesis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22, 1189.

Sakai Takaaki and Miura Shinichiro (2017). Abstract 17041: Effect of Sodium-glucose Cotransporter 2 Inhibitor on Vascular Endothelial Function and Diastolic Function in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction (hfpef). *Circulation* 136, A17041–A17041.

Santos-Gallego, C.G., Requena-Ibanez, J.A., San Antonio, R., Garcia-Ropero, A., Ishikawa, K., Watanabe, S., Picatoste, B., Vargas-Delgado, A.P., Flores-Umanzor, E.J., Sanz, J., et al. (2021). Empagliflozin Ameliorates Diastolic Dysfunction and Left Ventricular Fibrosis/Stiffness in Nondiabetic Heart Failure. *JACC Cardiovasc. Imaging* 14, 393–407.

Santos-Gallego Carlos G., Vargas-Delgado Ariana P., Requena-Ibanez Juan Antonio, Garcia-Ropero Alvaro, Mancini Donna, Pinney Sean, Macaluso Frank, Sartori Samantha, Roque Merce, Sabatel-Perez Fernando, et al. (2021). Randomized Trial of Empagliflozin in Nondiabetic Patients With Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 77, 243–255.

Satou, R., Shao, W., and Navar, L.G. (2015). Role of stimulated intrarenal angiotensinogen in hypertension. *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* 9, 181–190.

Sattar, N., McLaren, J., Kristensen, S.L., Preiss, D., and McMurray, J.J. (2016). SGLT2 Inhibition and cardiovascular events: why did EMPA-REG Outcomes surprise and what were the likely mechanisms? *Diabetologia* 59, 1333–1339.

Sattar, N., Fitchett, D., Hantel, S., George, J.T., and Zinman, B. (2018). Empagliflozin is associated with improvements in liver enzymes potentially consistent with reductions in liver fat: results from randomised trials including the EMPA-REG OUTCOME® trial. *Diabetologia* 61, 2155–2163.

Scalia, R., Gong, Y., Berzins, B., Freund, B., Feather, D., Landesberg, G., and Mishra, G. (2011). A Novel Role for Calpain in the Endothelial Dysfunction Induced by Activation of Angiotensin II Type 1 Receptor Signaling. *Circ. Res.* 108, 1102–1111.

Schmidt, A., Yan, S., Wautier, J., and Stern, D. (1999). Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ. Res.* 84, 489–497.

Schulman, I.H., and Zhou, M.-S. (2009). Vascular insulin resistance: A potential link between cardiovascular and metabolic diseases. *Curr. Hypertens. Rep.* 11, 48–55.

Shen, J.Z., and Young, M.J. (2012). Corticosteroids, Heart Failure, and Hypertension: A Role for Immune Cells? *Endocrinology* 153, 5692–5700.

Shigiyama, F. (2017). Effectiveness of dapagliflozin on vascular endothelial function and glycemic control in patients with early-stage type 2 diabetes mellitus: DEFENCE study. 12.

Shimizu, I., and Minamino, T. (2016). Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 97, 245–262.

Shindler, D.M., Kostis, J.B., Yusuf, S., Quinones, M.A., Pitt, B., Stewart, D., Pinkett, T., Ghali, J.K., Wilson, A.C., and The SOLVD Investigators (1996). Diabetes mellitus, a predictor of morbidity and mortality in the studies of left ventricular dysfunction (SOLVD) trials and registry. *Am. J. Cardiol.* 77, 1017–1020.

Shiuchi, T., Iwai, M., Li, H.-S., Wu, L., Min, L.-J., Li, J.-M., Okumura, M., Cui, T.-X., and Horiuchi, M. (2004). Angiotensin II Type-1 Receptor Blocker Valsartan Enhances Insulin Sensitivity in Skeletal Muscles of Diabetic Mice. *Hypertension* 43, 1003–1010.

Singh, P., Bahrami, L., Castillo, A., and Majid, D.S.A. (2013). TNF- α type 2 receptor mediates renal inflammatory response to chronic angiotensin II administration with high salt intake in mice. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* 304, F991–F999.

Soga, F., Tanaka, H., Tatsumi, K., Mochizuki, Y., Sano, H., Toki, H., Matsumoto, K., Shite, J., Takaoka, H., Doi, T., et al. (2018). Impact of dapagliflozin on left ventricular diastolic function of patients with type 2 diabetic mellitus with chronic heart failure. *Cardiovasc. Diabetol.* 17, 132.

Solini, A. (2017). Dapagliflozin acutely improves endothelial dysfunction, reduces aortic stiffness and renal resistive index in type 2 diabetic patients: a pilot study. 9.

Sowers, J.R. (2004). Insulin resistance and hypertension. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 286, H1597–H1602.

Sowers, J.R., Whaley-Connell, A., and Epstein, M. (2009). Narrative Review: The Emerging Clinical Implications of the Role of Aldosterone in the Metabolic Syndrome and Resistant Hypertension. *Ann. Intern. Med.* 150, 776–783.

Sparks, M.A., Crowley, S.D., Gurley, S.B., Mirotsoy, M., and Coffman, T.M. (2014). Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr. Physiol.* 4, 1201–1228.

Stamler, J., Vaccaro, O., Neaton, J.D., and Wentworth, D. (1993). Diabetes, Other Risk Factors, and 12-Yr Cardiovascular Mortality for Men Screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 16, 434.

Stegbauer, J., Lee, D.-H., Seubert, S., Ellrichmann, G., Manzel, A., Kvakan, H., Muller, D.N., Gaupp, S., Rump, L.C., Gold, R., et al. (2009). Role of the renin-angiotensin system in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 14942.

Steinberg, H.O., Chaker, H., Leaming, R., Johnson, A., Brechtel, G., and Baron, A.D. (1996). Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 97, 2601–2610.

Steinberger, J., and Daniels, S.R. (2003). Obesity, Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Risk in Children. *Circulation* 107, 1448–1453.

Steven, S., Oelze, M., Hanf, A., Kröller-Schön, S., Kashani, F., Roohani, S., Welschhof, P., Kopp, M., Gödtel-Armbrust, U., Xia, N., et al. (2017). The SGLT2 inhibitor empagliflozin improves the primary diabetic complications in ZDF rats. *Redox Biol.* 13, 370–385.

Storgaard, H., Gluud, L.L., Bennett, C., Grøndahl, M.F., Christensen, M.B., Knop, F.K., and Vilsbøll, T. (2016). Benefits and Harms of Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitors in Patients with Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE* 11, e0166125.

Summers, C., de Kloet, A.D., Krause, E.G., Unger, T., and Steckelings, U.M. (2015). Angiotensin type 2 receptors: blood pressure regulation and end organ damage. *Curr. Opin. Pharmacol.* *21*, 115–121.

Tabatabai, N.M., Sharma, M., Blumenthal, S.S., and Petering, D.H. (2009). Enhanced expressions of sodium–glucose cotransporters in the kidneys of diabetic Zucker rats. *Diabetes Res. Clin. Pract.* *83*, e27–e30.

Tahara, A., Kurosaki, E., Yokono, M., Yamajuku, D., Kihara, R., Hayashizaki, Y., Takasu, T., Imamura, M., Li, Q., Tomiyama, H., et al. (2014). Effects of sodium-glucose cotransporter 2 selective inhibitor ipragliflozin on hyperglycaemia, oxidative stress, inflammation and liver injury in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *J. Pharm. Pharmacol.* *66*, 975–987.

Tanaka, A., Shimabukuro, M., Machii, N., Teragawa, H., Okada, Y., Shima, K.R., Takamura, T., Taguchi, I., Hisauchi, I., Toyoda, S., et al. (2019). Effect of Empagliflozin on Endothelial Function in Patients With Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease: Results from the Multicenter, Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind EMBLEM Trial. *Diabetes Care* *42*, e159.

Targher, G., and Bonora, E. (2010). Risk of Cardiovascular Disease in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *N. Engl. J. Med.* *10*.

Terami, N., Ogawa, D., Tachibana, H., Hatanaka, T., Wada, J., Nakatsuka, A., Eguchi, J., Horiguchi, C.S., Nishii, N., Yamada, H., et al. (2014). Long-Term Treatment with the Sodium Glucose Cotransporter 2 Inhibitor, Dapagliflozin, Ameliorates Glucose Homeostasis and Diabetic Nephropathy in db/db Mice. *PLOS ONE* *9*, e100777.

Tesfamariam, B., Brown, M.L., Deykin, D., and Cohen, R.A. (1990). Elevated glucose promotes generation of endothelium-derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. *J. Clin. Invest.* *85*, 929–932.

Tikellis, C., Wookey, P.J., Candido, R., Andrikopoulos, S., Thomas, M.C., and Cooper, M.E. (2004). Improved Islet Morphology after Blockade of the Renin- Angiotensin System in the ZDF Rat. *Diabetes* *53*, 989.

Townsend, R.R., Wilkinson, I.B., Schiffrin, E.L., Avolio, A.P., Chirinos, J.A., Cockcroft, J.R., Heffernan, K.S., Lakatta, E.G., McEniery, C.M., Mitchell, G.F., et al. (2015). Recommendations for Improving and Standardizing Vascular Research on Arterial Stiffness. *Hypertension* *66*, 698–722.

Turk, E., Kerner, C.J., Lostao, M.P., and Wright, E.M. (1996). Membrane Topology of the Human Na⁺/Glucose Cotransporter SGLT1. *J. Biol. Chem.* *271*, 1925–1934.

Uthman, L., Baartscheer, A., Bleijlevens, B., Schumacher, C.A., Fiolet, J.W.T., Koeman, A., Jancev, M., Hollmann, M.W., Weber, N.C., Coronel, R., et al. (2018). Class effects of SGLT2 inhibitors in mouse cardiomyocytes and hearts: inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger, lowering of cytosolic Na⁺ and vasodilation. *Diabetologia* *61*, 722–726.

Vaccari, C.S., Lerakis, S., Hammoud, R., and Khan, B.V. (2008). Mechanisms of benefit of angiotensin receptor blockers in coronary atherosclerosis. *Am. J. Med. Sci.* *336*, 270–277.

Vallés, P.G., Bocanegra, V., Gil Lorenzo, A., and Costantino, V.V. (2015). Physiological Functions and Regulation of the Na⁺/H⁺ Exchanger [NHE1] in Renal Tubule Epithelial Cells. *Kidney Blood Press. Res.* *40*, 452–466.

Velloso, L.A., Folli, F., Sun, X.J., White, M.F., Saad, M.J., and Kahn, C.R. (1996). Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 12490.

Verma, S. (2018). SGLT2 inhibitors and mechanisms of cardiovascular benefit: a state-of-the-art review. 10.

Verma, S., Garg, A., Yan, A.T., Gupta, A.K., Al-Omran, M., Sabongui, A., Teoh, H., Mazer, C.D., and Connelly, K.A. (2016). Effect of Empagliflozin on Left Ventricular Mass and Diastolic Function in Individuals With Diabetes: An Important Clue to the EMPA-REG OUTCOME Trial? *Diabetes Care* 39, e212.

Verma Subodh, Mazer C. David, Yan Andrew T., Mason Tamique, Garg Vinay, Teoh Hwee, Zuo Fei, Quan Adrian, Farkouh Michael E., Fitchett David H., et al. (2019). Effect of Empagliflozin on Left Ventricular Mass in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Coronary Artery Disease. *Circulation* 140, 1693–1702.

Versari, D., Daghini, E., Viridis, A., Ghiadoni, L., and Taddei, S. (2009). Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. *Diabetes Care* 32 *Suppl* 2, S314–S321.

Vestri, S., Okamoto, M.M., de Freitas, H.S., Aparecida dos Santos, R., Nunes, M.T., Morimatsu, M., Heimann, J.C., and Machado, U.F. (2001). Changes in Sodium or Glucose Filtration Rate Modulate Expression of Glucose Transporters in Renal Proximal Tubular Cells of Rat. *J. Membr. Biol.* 182, 105–112.

Vlachopoulos, C., Aznaouridis, K., and Stefanadis, C. (2010a). Prediction of Cardiovascular Events and All-Cause Mortality With Arterial Stiffness. 55, 10.

Vlachopoulos, C., Aznaouridis, K., and Stefanadis, C. (2010b). Prediction of Cardiovascular Events and All-Cause Mortality With Arterial Stiffness: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 55, 1318–1327.

Wang, M., Kim, S.H., Monticone, R.E., and Lakatta, E.G. (2015). Matrix Metalloproteinases Promote Arterial Remodeling in Aging, Hypertension, and Atherosclerosis. *Hypertension* 65, 698–703.

Wayne Alexander, Kenneth E. Bernstein, Kevin J. Catt, Marc de Gasparo, Khurajam Dhanachandra Singh, Satoru Eguchi, Emanuel Escher, Theodore L. Goodfriend, Mastgugu Horiuchi, László Hunyady, et al. (2019). Angiotensin receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. IUPHARBPS Guide Pharmacol. CITE 2019.

Weber, M.A., Mansfield, T.A., Alessi, F., Iqbal, N., and Ptaszynska, A. Effects of dapagliflozin on blood pressure in hypertensive diabetic patients on renin–angiotensin sy. 12.

Wei, Y., Sowers, J.R., Nistala, R., Gong, H., Uptergrove, G.M.-E., Clark, S.E., Morris, E.M., Szary, N., Manrique, C., and Stump, C.S. (2006). Angiotensin II-induced NADPH Oxidase Activation Impairs Insulin Signaling in Skeletal Muscle Cells*. *J. Biol. Chem.* 281, 35137–35146.

Wei, Y., Whaley-Connell, A.T., Chen, K., Habibi, J., Uptergrove, G.M.-E., Clark, S.E., Stump, C.S., Ferrario, C.M., and Sowers, J.R. (2007). NADPH Oxidase Contributes to Vascular Inflammation, Insulin Resistance, and Remodeling in the Transgenic (mRen2) Rat. *Hypertension* 50, 384–391.

Wei, Y., Sowers, J.R., Clark, S.E., Li, W., Ferrario, C.M., and Stump, C.S. (2008). Angiotensin II-induced skeletal muscle insulin resistance mediated by NF- κ B activation via NADPH oxidase. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 294, E345–E351.

Weisbrod, R.M., Shiang, T., Al Sayah, L., Fry, J.L., Bajpai, S., Reinhart-King, C.A., Lob, H.E., Santhanam, L., Mitchell, G., Cohen, R.A., et al. (2013). Arterial stiffening precedes systolic hypertension in diet-induced obesity. *Hypertens. Dallas Tex 1979* 62, 1105–1110.

Whelton, P.K., He, J., Appel, L.J., Cutler, J.A., Havas, S., Kotchen, T.A., Roccella, E.J., Stout, R., Vallbona, C., Winston, M.C., et al. (2002). Primary Prevention of Hypertension Clinical and Public Health Advisory From the National High Blood Pressure Education Program. *JAMA* 288, 1882–1888.

Widmer, R.J., and Lerman, A. (2014). Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* 2014, 291–308.

Williams, S.B., Cusco, J.A., Roddy, M.-A., Johnstone, M.T., and Creager, M.A. (1996). Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Am. Coll. Cardiol.* 27, 567–574.

Wiviott, S.D., Raz, I., Bonaca, M.P., Mosenzon, O., Kato, E.T., Cahn, A., Silverman, M.G., Zelniker, T.A., Kuder, J.F., Murphy, S.A., et al. (2019). Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* 380, 347–357.

Wright, E.M., Loo, D.D.F., and Hirayama, B.A. (2011). Biology of Human Sodium Glucose Transporters. *Physiol. Rev.* 91, 733–794.

Wright, E.M., Hirsch, J.R., Loo, D.D.F., and Zampighi, G.A. REGULATION OF Na⁺/GLUCOSE COTRANSPORTERS. 7.

Yaribeygi, H., Atkin, S.L., Butler, A.E., and Sahebkar, A. (2019). Sodium–glucose cotransporter inhibitors and oxidative stress: An update. *J. Cell. Physiol.* 234, 3231–3237.

Yavuz, D., Koç, M., Toprak, A., Akpunar, I., Velioglu, A., Deyneli, O., Haklar, G., and Akalln, S. (2003). Effects of ACE inhibition and AT1-receptor antagonism on endothelial function and insulin sensitivity in essential hypertensive patients. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 4, 197–203.

Zannad, F., Ferreira, J.P., Pocock, S.J., Anker, S.D., Butler, J., Filippatos, G., Brueckmann, M., Ofstad, A.P., Pfarr, E., Jamal, W., et al. (2020). SGLT2 inhibitors in patients with heart failure with reduced ejection fraction: a meta-analysis of the EMPEROR-Reduced and DAPA-HF trials. *The Lancet* 396, 819–829.

Zhang, J., Patel, M.B., Griffiths, R., Mao, A., Song, Y., Karlovich, N.S., Sparks, M.A., Jin, H., Wu, M., Lin, E.E., et al. (2014). Tumor necrosis factor- α produced in the kidney contributes to angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 64, 1275–1281.

Zhang, J., Bottiglieri, T., and McCullough, P.A. (2017). The Central Role of Endothelial Dysfunction in Cardiorenal Syndrome. *Cardiorenal Med.* 7, 104–117.

Zhou, M.-S., and Schulman, I.H. (2009). Prevention of diabetes in hypertensive patients: results and implications from the VALUE trial. *Vasc. Health Risk Manag.* 5, 361–368.

Zhou, L., Cryan, E.V., D'Andrea, M.R., Belkowski, S., Conway, B.R., and Demarest, K.T. (2003). Human cardiomyocytes express high level of Na⁺/glucose cotransporter 1 (SGLT1). *J. Cell. Biochem.* 90, 339–346.

Zhou, M.-S., Schulman, I.H., and Zeng, Q. (2012). Link between the renin–angiotensin system and insulin resistance: Implications for cardiovascular disease. *Vasc. Med.* 17, 330–341.

Zhu, Q., Wang, Z., Xia, M., Li, P.-L., Van Tassell, B.W., Abbate, A., Dhaduk, R., and Li, N. (2011). Silencing of hypoxia-inducible factor-1 α gene attenuated angiotensin II-induced renal injury in Sprague-Dawley rats. *Hypertens. Dallas Tex 1979* 58, 657–664.

Zinman, B., Wanner, C., Lachin, J.M., Fitchett, D., Bluhmki, E., Hantel, S., Mattheus, M., Devins, T., Johansen, O.E., Woerle, H.J., et al. (2015). Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* 373, 2117–2128.

Rôle des co-transporteurs sodium glucose 1 et 2 dans la dysfonction vasculaire et cardiaque chez le rat hypertendu induit par l'Angiotensine II

Résumé en français

La voie pro-oxydante de l'angiotensine II est associée à une surexpression des co-transporteurs sodium glucose 1 et 2 (SGLT1 et 2) au sein des cellules endothéliales ainsi qu'à l'induction de la dysfonction endothéliale dans les artères coronaires. L'ensemble de ces effets a été prévenu par l'inhibiteur mixte de SGLT1 et 2, sotagliflozine ainsi que par l'inhibiteur sélectif de SGLT2, l'empagliflozine suggérant ainsi l'implication de ces transporteurs dans l'induction de la dysfonction endothéliale. L'objet de cette étude est d'évaluer le rôle de SGLT1 et 2 dans la dysfonction vasculaire et cardiaque induites par la réponse hypertensive de l'angiotensine II chez le rat. L'étude montre que l'hypertension induite par l'angiotensine II mène à une dysfonction diastolique du ventricule gauche et à une dysfonction endothéliale des macro et des micro vaisseaux associées à une surexpression de SGLT1 et 2 dans les cellules endothéliales. De plus, ce travail indique que l'ensemble des effets cardiovasculaires délétères observés sont prévenus par l'empagliflozine sans pour autant moduler la pression artérielle. L'ensemble de cette étude montre que l'inhibition des transporteurs SGLT1/2 apparaît comme une intéressante stratégie pour protéger la fonction CV des patients non diabétiques avec dysfonction diastolique.

Mots-clés : Cotransporteurs sodium glucose 1 et 2, Angiotensine II, Dysfonction diastolique, Dysfonction endothéliale

Résumé en anglais

The angiotensin II prooxidant pathway has been shown to upregulate the expression of SGLT1 and 2 and to induce premature endothelial dysfunction in coronary endothelial cells. Since these effects are prevented by the dual SGLT1/2 inhibitor sotagliflozin and the SGLT2 inhibitor empagliflozin, SGLT1 and 2 are involved in the induction of endothelial dysfunction. The aim of the study is to evaluate the rôle of SGLT1 and 2 in the Ang II-induced hypertensive response in rats leading to cardiac and vascular endothelial dysfunction. The findings indicate that Ang II-induced hypertension promoting left ventricle cardiac dysfunction, and both macro and microvascular endothelial dysfunction are associated with an up-regulation of SGLT1 and 2 in endothelial cells. They further suggest that inhibition of SGLT1 and/or SGLT2 might be an attractive therapeutic strategy to protect the CV function, and, hence, the subsequent development of cardiovascular diseases.

Keywords: Sodium glucose co-transporters 1 and 2, Angiotensin II, Diastolic dysfunction, Endothelial dysfunction

