

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Physiologie, Physiopathologie et Biologie Systémique Médicale

Par

Justine DHOT

Implication de l'endothélium dans le développement de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 4 Décembre 2020

Unité de recherche : Université de Nantes, CNRS, INSERM, l'institut du thorax, F-44000 Nantes, France

Rapporteurs avant soutenance :

Marie-Ange RENAULT
Elise BELAIDI-CORSAT

Chargée de Recherche, INSERM, HDR, Université de Bordeaux
Maitre de Conférences Universitaires, INSERM, HDR, Université de Grenoble

Composition du Jury :

Président : Paul MULDER

Professeur, INSERM, Université de Rouen

Examineurs : Mathias MERICKSKAY
Paul MULDER

Directeur de Recherche, INSERM, Université Paris-Sud
Professeur, INSERM, Université de Rouen

Dir. de thèse : Chantal GAUTHIER

Professeur, INSERM, Doyen de la Faculté des Sciences et des
Techniques, Université de Nantes

Co-dir. de thèse : Benjamin LAUZIER

Maitre de Conférences Universitaires, INSERM, HDR, Université de Nantes

Invité

Co-enc de thèse : Bruno POIRIER

Global Study Manager, PhD, Sanofi, Paris

REMERCIEMENTS

Si je fais le bilan de ces trois années de thèse, c'est qu'au-delà des résultats des réussites et des échecs, rien n'aurait été possible seule.

Dans les prochaines pages je vais remercier toutes les personnes qui ont participé, d'une façon ou une autre, à ce travail.

REMERCIEMENTS

Merci aux membres de mon jury.

Je souhaite tout d'abord remercier le Pr. Paul Mulder et le Dr. Mathias Mericskay d'avoir accepté d'être examinateurs lors de ma soutenance.

Je souhaite remercier les Dr. Marie-Ange Renault et Dr. Elise Belaidi-Corsat d'avoir accepté d'être rapporteurs, merci pour vos corrections et vos conseils.

Je remercie les Pr. Paul Mulder et Luc Bertrand d'avoir participé à mon comité de suivi de thèse, merci pour vos nombreux conseils et d'avoir toujours été présent.

Maintenant je tiens à remercier mon équipe encadrante : le Pr. Chantal Gauthier en tant que directrice de thèse, le Dr. Benjamin Lauzier en tant que co-directeur de thèse et le Dr. Bruno Poirier en tant que co-encadrant.

REMERCIEMENTS

Merci à mon équipe encadrante.

Tout d'abord, merci à vous Chantal, de m'avoir accueillie dans l'équipe IIb et d'avoir été ma directrice de thèse. Merci pour vos conseils, pour votre temps, pour votre écoute et pour votre confiance.

Je tiens maintenant à remercier le binôme de choc : Benjamin et Bruno. Une thèse CIFRE implique un laboratoire public et un laboratoire privé, soit l'institut du thorax à Nantes et Sanofi à Chilly-Mazarin dans mon cas. La gestion de ces deux univers différents dans deux villes différentes a été grandement simplifiée par Benjamin et Bruno. Merci pour votre bonne humeur sans faille, pour votre disponibilité, pour votre bienveillance et pour votre patience. C'est une chance d'avoir eu deux chefs aussi complémentaires. Vous m'avez transmis votre passion de la science, votre rigueur scientifique, nos échanges scientifiques m'ont permis de progresser et d'avancer. Un grand merci pour votre aide pour la rédaction de cette thèse, pour vos nombreux conseils, pour vos corrections et pour le temps consacré à la relecture.

Merci à toi Ben, pour m'avoir accueillie dans la « team beta3 » pendant mon stage de Master 2. Merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir soutenue et de m'avoir fait confiance. Merci pour tes conseils scientifiques, merci d'avoir consacré autant de temps et d'énergie pour les relectures d'abstract, de mémoire, de manuscrit de thèse et j'en passe. Merci pour toutes les belles opportunités : enseignement, encadrement d'étudiants, participation aux congrès et collaborations avec d'autres laboratoires. Rien n'aurait été possible sans ton investissement, ton implication et ton aide. Un grand merci !

Merci à toi Bruno, de m'avoir accueillie dans la grande famille de Sanofi. Je suis fière d'avoir été ta première étudiante en thèse. Merci de m'avoir fait confiance aussi rapidement, de m'avoir épaulée et aidée lorsque je suis arrivée à Chilly-Mazarin. Merci d'avoir toujours été disponible, d'avoir pris le temps de m'écouter et de me conseiller toujours avec bienveillance. Merci pour ton soutien et tout ton temps consacré à la relecture de ma thèse. Merci pour ta bonne humeur et d'avoir fait en sorte que je ne manque de rien lors de mes déplacements à Chilly-Mazarin. Un grand merci !

REMERCIEMENTS

Merci à mes collègues.

Je souhaite remercier mes collègues de Sanofi. Merci à Marie-Pierre, Philip, Maria-Francesca, Cécile, Noémie, Sandra, Cyril, George, Laëtitia, Xavier pour votre aide dans la mise en place du projet, pour votre temps et votre implication dans le projet. Un merci tout particulier à Morgane pour ta patience et ton temps afin de me former à l'isolement des cardiomyocytes et des cellules endothéliales. Merci à toutes les autres personnes qui ont pris le temps de m'accueillir à Sanofi.

Je souhaite remercier l'ensemble de l'équipe I1b à l'institut du thorax. Tout d'abord merci à Bertrand, d'avoir été présent dans les échanges scientifiques et d'avoir été toujours de bon conseil. Un grand merci à Michel DW. pour son aide sur la publication de l'article. Merci à Michel R. pour sa bonne humeur et merci pour les échanges scientifiques. Merci à Marja, pour toutes les corrections d'abstracts, d'articles et pour son aide. Merci à la team « Patch-auto », Jérôme, Sébastien, Barbara et Ludivine pour leur bonne humeur de tous les jours.

Merci à Virginie, pour ta bonne humeur, tes blagues et ton énergie. Merci pour toutes les heures passées sur les mesures de pression intra-ventriculaire.

Merci à Angélique, pour ta patience, pour avoir été présente et pour tes nombreux conseils. Merci de m'avoir aidée pendant toutes ces années et merci pour tout le temps de formation. Grâce à toi les Western-Blot, les RT-qPCR, les extractions de protéines, d'ARN, d'ADN n'ont (presque) plus de secret pour moi.

Merci à Morteza, d'avoir toujours répondu présent quand on a besoin de quelque chose.

Merci à Mélanie de m'avoir transmis tes connaissances en réactivité vasculaire, merci d'avoir consacré autant de temps à me former et autant de temps à faire des manips.

Un merci tout particulier à Thomas et Antoine. Je crois que je n'aurai pas assez de mots pour vous remercier. Merci pour vos blagues (même si elles n'étaient pas toujours drôles), merci pour votre bonne humeur, merci d'avoir toujours été compréhensif, merci pour votre aide et merci pour tous les coups de main. Je n'oublierai jamais les moments de commérage dans le bureau, les pauses café, les congrès... Je n'ai aucun doute pour la réussite de votre thèse ! Je vous souhaite plein de belles choses pour la suite.

REMERCIEMENTS

Merci à Ludivine, d'avoir été toujours à l'écoute dans les bons et les mauvais moments, toujours dispo pour une pause clope ou une pause-café. Merci d'avoir été présente. Je te souhaite plein de réussite et de bonheur pour la suite.

Merci à Anaïs, mon binôme de « galère ». Ah il y en a des choses à dire sur ces derniers mois : entre la douche à l'acide acétique, les tuyaux du système de réactivité vasculaire qui explosent et les problèmes de bain-marie... ! Merci de m'avoir fait rire pendant ces derniers mois alors que je rédigeais. Merci pour ta bonne humeur et ton humour à toute épreuve.

Aux nouveaux arrivant dans l'équipe : Angélique, Oliver, Thomas et Manon. Je vous souhaite à tous beaucoup de réussite ! Je n'ai pas de doute que tout va bien se passer pour vous et que vous irez loin. Un grand merci aux « anciens ». Merci à Valentine et Marine qui ont travaillé sur le projet Tg β ₃. Merci à David, Fouzia, Valentin et tous les autres étudiants qui sont venu dans l'équipe.

Merci à Corinne pour ta bonne humeur et ton aide dans toutes les démarches administratives.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les autres personnes qui m'ont aidé dans ce projet.

Merci à Imen, pour son aide dans la mise en place de la cohorte, pour son aide aussi dans la récupération des artères mammaires de patient.

Un grand merci à Céline et Vincent pour leur aide concernant les systèmes de réactivité vasculaires.

Merci à Maud pour sa disponibilité.

Un grand merci à Angela pour son aide, son implication et son temps afin de réaliser la RPE. Merci pour les grands moments de fou rire. Ce fut long et difficile mais toujours dans la bonne humeur.

Merci aux autres doctorants d'être aussi soudés. Merci à Constance, Manon B., Cyrielle, Adrien, Bastien, Robin, Camille, Milène, Lindsay, Surya, Dorian, Eléonore, Meryl, Yoann, Victoria, Enora, Manon D...

Merci à Stélina et à Claudio. Merci de m'avoir aussi bien accueillie en Roumanie. Cette expérience aura été unique ! Grâce à vous j'ai découvert tellement de choses. Merci pour votre bienveillance, votre accueil, vos cadeaux et votre temps. Il y a eu un avant et un après cette aventure en Roumanie, alors pour tout je vous dis merci.

Merci à l'UTE d'avoir pris soin des animaux.

Et un merci tout particulier aux rats ! Sans vous ce projet n'aurait pas été possible.

REMERCIEMENTS

Merci à ma famille, à mes amis.

Merci à mes parents, à mon frère, Corentin, et à ma sœur, Jeanne ; merci d'avoir toujours été compréhensifs face à mes choix, d'avoir été présents, pour votre soutien et vos encouragements.

Merci à mon papy, à mes tantes, à la famille Albert, à Catherine, à la famille Garnier, pour avoir été présents et pour vos encouragements.

Un merci tout particulier à ma Maman, d'être présente, de me soutenir depuis toujours dans les bons ou les mauvais moments, d'avoir toujours été d'une grande patience et d'avoir été compréhensive malgré mes sauts d'humeur. Merci d'avoir pris le temps de relire ma thèse.

Merci à Béa, pour le temps consacré à la relecture de mon manuscrit, pour tes commentaires pertinents et pour tes encouragements.

Merci à Clémence, Noémie et Marion d'avoir toujours été présentes, d'avoir pris le temps de m'écouter et d'avoir été d'un soutien sans failles. J'ai beaucoup de chance de vous avoir, je vous aime.

Merci à la team les « Nantais ou presque » : Olivia, Pierre, Axelle, Adèle, Corentin, Quentin et Mathilde. Merci pour toutes les soirées, les weekends, les vacances, vous êtes des amis en or !

Merci aux « Mesnilois » : Emilie, Romain, Aurore, Sylvain, Lucie, Louise, Maxime, Mikeu, Manuella, Alexis, Simon, Margot, Loulou.... La liste est trop longue pour que je vous remercie un par un, mais sachez que je suis fière de vous avoir comme amis.

Merci à toi Simon, d'être toi, d'être présent, d'être aussi compréhensif, bienveillant, aimant. Je ne te remercierai jamais assez de tout ce que tu as fait pour moi. Tu es la meilleure partie de moi, tu es mon meilleur ami, l'amour de ma vie. Alors merci pour tout, merci pour ton soutien et merci d'être là. J'ai hâte de réaliser tous nos projets. Je t'aime.

AVANT-PROPOS

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. L'insuffisance cardiaque représente une grande majorité de ces maladies avec plus de 40 millions de personnes atteintes dans le monde, dont la mortalité et la morbidité sont élevées. Il existe trois types d'insuffisance cardiaque : à fraction d'éjection réduite, à fraction d'éjection intermédiaire et à fraction d'éjection préservée. A ce jour, il n'existe pas de traitement pour l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée. Il est donc important de comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans cette pathologie pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Pour améliorer les connaissances sur cette pathologie, des modèles animaux sont développés et utilisés pour modéliser la pathologie. C'est dans ce contexte que l'équipe de Chantal Gauthier à l'institut du thorax a élaboré un modèle animal développant une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée. Initialement créé pour étudier le rôle du récepteur β_3 -adrénergique, ce modèle surexprime le récepteur β_3 -adrénergique humain au niveau des cellules endothéliales. Dans ce cadre, il a été mis en évidence de façon fortuite que les animaux développent, avec l'âge une dysfonction diastolique caractéristique de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

La caractérisation de ce modèle a été un travail sur le long terme au long court ayant impliqué la collaboration de nombreuses personnes. En 2016, lorsque je suis arrivée au laboratoire pour mon stage de M2, j'ai continué la caractérisation du modèle, travail que j'ai poursuivi en thèse. Au cours de celle-ci, j'ai plus particulièrement focalisé mon attention sur la caractérisation de la fonction endothéliale dans l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée. En effet de nombreuses études ont mis en évidence que l'endothélium joue un rôle majeur dans la pathologie. Le second objectif de ma thèse a été d'identifier des cibles thérapeutiques ou des biomarqueurs potentiels.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	I
AVANT-PROPOS	VIII
TABLE DES MATIERES	1
ABREVIATIONS	7
TABLE DES FIGURES.....	14
TABLE DES TABLEAUX.....	16
INTRODUCTION	17
1. Les bases de la fonction cardiaque	17
1.1. Les cellules cardiaques.....	17
1.2. Le couplage excitation-contraction	18
1.2.1. La membrane plasmique	18
1.2.2. Le réticulum sarcoplasmique.....	20
1.2.3. Les protéines de l'appareil contractile.....	20
1.2.4. Les mécanismes cellulaires du couplages excitation-contraction	22
1.3. Le cycle cardiaque.....	24
1.3.1. Evaluation de la fonction cardiaque par échocardiographie.....	28
1.3.2. Evaluation de la fonction cardiaque par cathétérisme cardiaque	32
2. Les bases de la fonction vasculaire.....	32
2.1. Les cellules musculaires lisses	32
2.2. La fonction de l'endothélium	33
2.3. Le monoxyde d'azote	34
2.3.1. La fonction du monoxyde d'azote.....	34
2.3.2. Les [•] NO synthases	36
3. L'insuffisance cardiaque.....	38
3.1. L'histoire de l'insuffisance cardiaque	38

TABLE DES MATIERES

3.2.	Définition	40
3.3.	Diagnostic.....	42
3.3.1.	Symptômes et signes cliniques.....	42
3.3.2.	Examens cliniques initiaux.....	42
3.3.2.1.	Les peptides natriurétiques	44
3.3.2.2.	L'électrocardiogramme	45
3.3.2.3.	L'échocardiographie.....	45
3.4.	Epidémiologie et étiologie de l'insuffisance cardiaque	47
3.4.1.	Epidémiologie	47
3.4.1.	Etiologie	49
3.5.	Les différentes terminologies de l'insuffisance cardiaque.....	50
3.5.1.	Insuffisance cardiaque aiguë	50
3.5.1.1.	Insuffisance cardiaque aiguë de novo.....	50
3.5.1.2.	Insuffisance cardiaque aiguë décompensée.....	50
3.5.2.	Insuffisance cardiaque chronique	51
3.5.3.	Classifications NYHA et ACC/AHA	51
3.5.4.	Classification en fonction de la fraction d'éjection.....	53
3.5.5.	Insuffisance cardiaque droite ou gauche	56
3.6.	Les caractéristiques de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite	57
3.7.	Les caractéristiques de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection « <i>mid-range</i> ».....	58
4.	L'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée	59
4.1.	Définition	59
4.2.	Diagnostic.....	59
4.2.1.	Score H ₂ FPEP.....	61
4.2.2.	L'algorithme diagnostique HFA – PEFf	61

TABLE DES MATIERES

4.3.	Les comorbidités	68
4.3.1.	Le vieillissement.....	70
4.3.2.	Les œstrogènes	73
4.3.3.	Hypertension artérielle	75
4.3.4.	Obésité.....	77
4.3.5.	Le diabète	78
4.3.6.	L'anémie.....	80
4.3.7.	L'insuffisance rénale chronique	80
4.3.8.	Hypertension artérielle pulmonaire	81
4.3.9.	La fibrillation atriale.....	81
5.	Physiopathologie de l'ICFEP	85
5.1.	Altérations fonctionnelles dans l'ICFEP.....	85
5.1.1.	Dysfonction diastolique.....	85
5.1.2.	Dysfonction systolique	87
5.2.	Altérations structurelles dans l'ICFEP	89
5.2.1.	Hypertrophie du ventricule gauche	89
5.2.2.	Fibrose cardiaque	90
5.2.3.	Anomalies structurelles et fonctionnelles de l'oreillette gauche.....	91
5.2.4.	Rigidité macro et micro vasculaire.....	92
5.3.	Anomalies cellulaires et moléculaires.....	94
5.3.1.	Les anomalies du cytosquelette	94
5.3.2.	Anomalies du cycle du calcium.....	95
5.3.2.1.	Les anomalies de la libération du calcium	96
5.3.2.2.	Les anomalies de la recapture du calcium	97
6.	Traitements dans l'ICFEP.....	98
6.1.	Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion	98
6.2.	Les antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II	98

TABLE DES MATIERES

6.3. Les antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II associés aux inhibiteurs à la néphrilyse.....	99
6.4. Les β -bloquants	100
6.5. Les bloqueurs des canaux calciques.....	101
6.6. Les antagonistes du récepteur minéralocorticoïde	101
6.7. L'ivabradine	101
6.8. Les nitrates	101
7. Modèles animaux dans l'ICFep	102
7.1. Modèles animaux d'hypertension artérielle	105
7.1.1. Le rat Dahl salt-sensitive	105
7.1.2. Le rat DOCA	105
7.1.3. Les modèles hypertendus induits par l'angiotensine II	106
7.1.4. Les modèles hypertendus induits par constriction aortique	106
7.2. Modèles de diabète et d'obésité	106
7.3. Modèles avec un syndrome cardiométabolique	107
7.4. Vieillessement.....	108
8. Nouveau paradigme de l'ICFep	110
8.1. Les altérations du métabolisme cardiaque	110
8.2. L'inflammation bas grade	111
8.3. Dysfonction endothéliale.....	112
8.4. Le stress oxydant.....	112
8.5. La dysfonction de la voie du monoxyde d'azote dans l'ICFep	113
9. Le système adrénergique	116
9.1. Les récepteurs β_1 -AR et β_2 -AR	117
9.2. Le récepteur β_3 -AR	119
9.3. Implication du récepteur β_3 -AR dans l'insuffisance cardiaque.....	122

TABLE DES MATIERES

10. La place de la recherche dans le développement de nouveaux traitements...	126
10.1. La recherche	128
10.2. Le développement du médicament.....	130
OBJECTIFS DE LA THESE	132
RESULTATS	133
1. Caractérisation d'un nouveau modèle d'ICFEp	133
1.1. Préambule.....	133
1.2. Article 1 : La surexpression du récepteur β_3 – adrénergique induit une dysfonction diastolique chez le rat.	135
1.3. Discussion	150
2. Dysfonction endothéliale et ICFEp	155
2.1. Préambule.....	155
2.2. Article 2 : La dysfonction endothéliale : conséquence ou cause de la dysfonction diastolique.....	158
2.3. Discussion	181
3. Oestrogène et ICFEp	184
3.1. Préambule.....	184
3.2. Article 3 : Implication d'une alimentation riche en soja pour les modèles animaux	186
3.3. Discussion	201
4. Identification de cibles thérapeutique et biomarqueurs dans l'ICFEp.....	203
4.1. Introduction	203
4.2. Matériels et Méthodes	205
4.3. Résultats	205
4.3.1. Expression cardiaque et circulante de la protéine AK1.....	205
4.3.2. Cohorte	206
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	209

TABLE DES MATIERES

1. Avantages et limitations du modèle.....	209
2. Les altérations de la fonction endothéliale	211
3. Les altérations du métabolisme cardiaque.....	212
CONCLUSION	214
REFERENCES.....	215
ANNEXES	254
1. Annexes 1 : Données complémentaires de l'article 1.....	254
2. Annexes 2 : Publications, communications orales et posters	280

ABREVIATIONS

[Ca ²⁺] _i :	concentration intracellulaire du Ca ²⁺ libre
•NO :	<i>Nitric Oxyde</i> ou monoxyde d'azote
Abrév. :	Abréviation
AC :	Adénylyl Cyclase
ACC :	<i>American College of Cardiology</i>
ADHERE :	<i>Acute DEcompensated Heart Failure REgistry</i>
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
ADNmt :	ADN mitochondriale
ADP :	Adenosine DiPhosphate
AHA :	<i>American Heart Association</i>
AK1 :	Adénylate Kinase 1
ALDO-DHF :	<i>ALDOsterone receptor blockade in Diastolic Heart Failure</i>
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
AMPc :	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AMPK :	<i>AMP Kinase</i> ou kinase AMP dépendante
ang II :	angiotensine II
ANSM :	Agence Nationale française de Sécurité du Médicament
AR :	<i>Adrenergic Receptor</i> ou récepteur adrénergique
ASK1 :	<i>Apoptosis Signal-regulating Kinase 1</i> ou kinase 1 régulée par le signal d'apoptose
AT1 :	<i>Angiotensin II Type 1 receptor</i> ou récepteur de Type 1 à l'Angiotensine II
ATP :	Adénosine TriPhosphate
BH4 :	tetrahydrobioptérine
BNP :	<i>Brain Natriuretic Peptide</i> ou peptide natriurétique de type B
C :	Chirurgical
Ca ²⁺ :	Calcium
CAMKII :	Calmoduline Kinase II
CEPS :	Comité Economique des Produits de Santé

ABREVIATIONS

CHARM-Preserved :	<i>Candesartan in Heart failure: Assessment of Reduction in Mortality and morbidity – in patients with chronic heart failure and Preserved ventricular ejection fraction</i>
CIBIS-ELD :	<i>Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study in ELDerly</i>
CICR :	<i>Calcium Induced-Calcium Released</i> ou Calcium induit-Calcium libéré
CK :	Créatine Kinase
CML :	Cellule Musculaire Lisse
COHERE :	<i>CarvedilOl HEart failure REgistry</i>
d :	diastole
DOCA :	<i>deoxycorticosterone acetate</i> ou acétate de désoxycorticostérone
DP/dTmax :	Dérivée Première de Pression maximale en fonction du Temps
DP/dTmin :	Dérivée Première de Pression minimale en fonction du Temps
DT2 :	Diabète de Type 2
E/A :	ratio de l'onde E sur l'onde A
ECG :	ElectroCardioGramme
EDIFY :	<i>The prEserveD left ventricular ejection fraction chronic heart Failure with ivabradine study</i>
ELANDD :	<i>Effects of the Long-term Administration of Nebivolol on the clinical symptoms, exercise capacity, and left ventricular function of patients with Diastolic Dysfunction</i>
EMA :	<i>European Medicines Agency</i> ou agence européenne du médicament
eNOS :	<i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i> ou synthase endothéliale de monoxyde d'azote
ESC :	<i>European Society of Cardiology</i> ou société européenne de cardiologie
ET-1 :	EndoThéline-1
f :	femme
FA :	Fibrillation Atriale
FC :	Fréquence Cardiaque
FE :	Fraction d'Ejection
F _{passive} :	Force passive
G :	Génétique
GCs :	Guanylate Cyclase soluble

ABREVIATIONS

Gi :	protéine G inhibitrice
GLS :	<i>Global Longitudinal Strain</i> ou contrainte longitudinale globale
GLUT :	<i>GLUcose Transporter</i> ou transporteur de glucose
GMPc :	Guanosine MonoPhosphate cyclique
Gs :	protéine G stimulatrice
h :	homme
HAS :	Haute Autorité de Santé
HFA :	<i>Heart Failure Association</i>
HFD :	<i>High Fat Diet</i> ou Régime alimentaire riche en graisses
HFpEF :	<i>Heart Failure with preserved Ejection Fraction</i>
HTA :	HyperTension Artérielle
HTAP :	HyperTension Artérielle Pulmonaire
IC :	Insuffisance Cardiaque
I _{CA, L} :	courant CAlcique de type L entrant
ICAM-2 :	<i>InterCellular Adhesion Molecule 2</i> ou molécule d'adhésion intercellulaire 2
ICFEm :	Insuffisance Cardiaque à Fraction d'Ejection « <i>mid-range</i> »
ICFEp :	Insuffisance Cardiaque à Fraction d'Ejection préservée
ICFEr :	Insuffisance Cardiaque à Fraction d'Ejection réduite
IEC :	Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion
IFN- γ :	InterFéroN- γ
IL :	InterLeukine
IMC :	Indice de Masse Corporelle
INDIE-HFpEF :	<i>Inorganic Nitrite Delivery to Improve Exercise capacity in Heart Failure With preserved Ejection Fraction</i>
iNOS :	<i>inducible Nitric Oxyde Synthase</i> ou synthase inductible de monoxyde d'azote
I-PRESERVE :	<i>Irbesartan in patients with heart failure and PRESERVED ejection fraction</i>
IR :	Insulino-Résistance
IRC :	Insuffisance Rénale Chronique
IRM :	Imagerie par Résonnance Magnétique

ABREVIATIONS

ITV _{AO} :	Intégrale de Temps * Vitesse sous AOrtique
J-DHF :	<i>Japanese Diastolic Heart Failure study</i>
LAVI :	<i>Left Atrial Volume Index</i> ou index du volume de l'oreillette gauche
L-NAME :	N(ω)-Nitro-L-Arginine Methyl Ester
L-NMMA :	N ^g -Monométhyl-L-Arginine Monoacétate
LVMI :	<i>Left Ventricular Mass Index</i> ou index de masse ventriculaire gauche
MEC :	Matrice ExtraCellulaire
MMP-2 :	<i>Matrix MetalloProteinase-type 2</i> ou métalloprotéinase matricielle de type 2
MyBPC :	<i>Myosin Binding Protein C</i> ou protéine C de liaison à la myosine
Na ⁺ :	sodium
NADPH :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide PHosphate
NCX :	<i>Na⁺/Ca²⁺ eXchanger</i> ou échangeur sodium-calcium
ND :	Non Déterminé
NEAT-HFpEF :	<i>Nitrate's Effect on Activity Tolerance in Heart Failure with preserved Ejection Fraction</i>
NF-κB :	<i>Nuclear Factor- κB</i> ou facteur nucléaire – κB
nNOS :	<i>neuronal Nitric Oxyde Synthase</i> ou synthase neuronale de monoxyde d'azote
NOHA :	Nω -Hydroxy-L-Arginine
NOX :	<i>NADPH OXydase</i> ou oxydase du NADPH
NYHA :	<i>New-York Heart Association</i>
O ₂ :	Oxygène
O ₂ ^{•-} :	anion superoxyde
OCDE :	Organisation de Coopération et de Développement Economiques
OLETF :	<i>Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat</i>
ONOO ⁻ :	peroxynitrite
OPTIMIZE-HF :	<i>Organized Program to Initiate lifesaving TreatMent in HospitalIZed patiEnts with Heart Failure</i>
OZR :	Obese Zucker Rat ou rat obèse Zucker
P :	Pharmacologique
PA :	Paroi Antérieure

ABREVIATIONS

PAD :	Pression Artérielle Diastolique
PAM :	Pression Artérielle Moyenne
PARAGON-HF :	<i>Prospective comparison of ARni with Arb Global Outcomes iN HF with preserved ejection fraction</i>
PARAMOUNT :	<i>Prospective comparison of ARni with Arb on Management Of heart failUre with preserved ejectionN fracTion</i>
PAS :	Pression Artérielle Systolique
PASP :	<i>Pulmonary Artery Systolic Pressure</i> ou pression systolique de l'artère pulmonaire
PCR :	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCr :	PhosphoCréatine
PCWP :	<i>Pulmonary Capillary Wedge Pressure</i> ou pression capillaire pulmonaire
PDE :	PhosphoDiEstérase
PEC :	Prise En Charge
PEP-CHF :	<i>Perindopril in Elderly People with Chronic Heart Failure</i>
PI3K :	Phosphatidyl Inositol 3-Kinase
PICP :	Procollagen type I Carboxy-terminal Peptide
PIIINP :	Procollagen type III amiNo-terminal Peptide
PKA :	Protéine Kinase A
PKC :	Protéine Kinase C
PKG :	Protéine Kinase G
PLB :	PhosphoLamBan
PP :	Paroi Postérieure
PREVEND :	<i>Prevention of Renal and Vascular End-Stage Disease</i>
PTD :	Pression TéléDiastolique
PTD _{VG} :	Pression TéléDiastolique du Ventricule Gauche
PTX3 :	<i>PenTraXin 3</i> ou pentraxine 3
RAAM-PEF :	<i>Randomized Aldosterone AntagonisM in heart failure with Preserved Ejection Fraction</i>
ROS :	<i>Reactive Oxygen Species</i> ou espèces réactives de l'oxygène
RS :	Réticulum Sarcoplasmique

ABREVIATIONS

RWT :	<i>Relative Wall Thickness</i> ou épaisseur relative de la paroi
RyR2 :	<i>Ryanodine Receptor type 2</i> ou récepteur à la Ryanodine de type 2
s :	systole
SAMP8 :	<i>Senescence Accelerated Mouse-Prone 8</i>
SERCA2a :	<i>Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium Adenosine triphosphatase 2a</i> ou calcium adenosine triphosphatase du reticulum sarco/endoplasmique
SHHF :	<i>Spontaneously Hypertensive Heart Failure</i> ou Insuffisance cardiaque hypertensive spontanée
SHR :	<i>Spontaneous Hypertensive Rat</i> ou rat hypertendu spontanément
SIV :	Septum Inter-Ventriculaire
SNA :	Système Nerveux Autonome
SNE :	Système Nerveux Entérique
SNP :	Système Nerveux Parasymphatique
SNS :	Système Nerveux Sympathique
SOD :	SuperOxydes Dismutases
SPECT/CT :	<i>Single Photon Emission Tomography/Computed Tomography</i>
sST2 :	<i>soluble Suppression of Tumorigenecity 2</i> ou suppression soluble de la tumorigénécité 2
SWEDIC :	<i>SWEdish Doppler-echocardiographIC study</i>
Tau :	constante de relaxation
TDE :	Temps de Décélération de l'onde E
TGF- β :	<i>Transforming Growth Factor-β</i> ou facteur de croissance transformant- β
Tg β_3 :	rat transgénique surexprimant le récepteur β_3 -AR humain
TIMP-2 :	<i>Tissue Inhibitor of MetalloProteinases-type 2</i> ou inhibiteur tissulaire des metalloproteases de type 2
TNF- α :	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i> ou Facteur de nécrose tumorale - α
TOPCAT :	<i>Treatment Of Preserved Cardiac function heart failure with an Aldosterone anTagonist</i>
TR :	<i>Tricuspid Regurgitation</i> ou régurgitation tricuspide
TRIV :	Temps de Relaxation Iso-Volumique
UNCAM :	Union Nationale des Caisses d'Assurance Maladie

ABREVIATIONS

VCAM-1 :	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-type 1</i> ou molécule d'adhésion cellulaire vasculaire de type 1
VES :	Volume d'Ejection Systolique
VG :	Ventricule Gauche
WT :	<i>Wild Type rat</i> ou animaux contrôle
ZDF :	<i>Zucker Diabetic Fatty</i>
α -AR :	α - <i>Adrenergic Receptor</i> ou récepteurs α -adrénergiques
β -AR :	β - <i>Adrenergic Receptor</i> ou récepteurs β -adrénergiques
β -ARK :	β - <i>Adrenergic Receptor Kinase</i> ou kinase du récepteur β adrénérique
β -PRESERVE :	β - <i>blocker in heart failure with PRESERVED left ventricular ejection fraction</i>

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Organisation des myofibrilles au niveau des cardiomyocytes	19
Figure 2 : Couplage excitation contraction	21
Figure 3 : Cycle cardiaque.....	23
Figure 4 : Déroulement d'un cycle cardiaque	23
Figure 5 : Relation pression-volume au cours du cycle cardiaque dans le ventricule gauche	25
Figure 6 : Loi de Frank-Starling	27
Figure 7 : Réaction enzymatique catalysée par les NOS.....	35
Figure 8 : Formation du BNP	43
Figure 9 : Organigramme pour le diagnostic de l'IC à l'aide du BNP	43
Figure 10 : Proportion de la population présentant une IC dans différents des pays	46
Figure 11 : Résumé de l'algorithme HFA-PEFF pour le diagnostic de l'ICFEp	60
Figure 12 : Algorithme décisionnel HFA-PEFF pour le diagnostic de l'ICFEp.....	63
Figure 13 : Evaluation du score échocardiographique et des peptides natriurétiques.....	63
Figure 14 : Tests fonctionnels en cas de diagnostic incertain	65
Figure 15 : Les comorbidités dans l'ICFEp	67
Figure 16 : Caractéristiques des patients ICFEp	67
Figure 17 : Mécanismes de la dysfonction diastolique.....	67
Figure 18 : Mécanismes moléculaires participant au vieillissement cardiovasculaire.....	69
Figure 19 : Rôles des œstrogènes	72
Figure 20 : Mécanismes par lesquels l'obésité peut contribuer à l'ICFEp.....	76
Figure 21 : Physiopathologie du diabète dans l'IC.....	79
Figure 22 : La fibrillation atriale	82
Figure 23 : Répartitions des anomalies de la dysfonction diastolique chez les patients ICFEp	86
Figure 24 : Altérations des réserves cardiaques dans l'ICFEp.....	86
Figure 25 : Classification de la géométrie du VG	88
Figure 26 : Remodelage ventriculaire dans l'ICFEp.....	88
Figure 27 : Rôle des comorbidités dans les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'ICFEp.....	93
Figure 28 : Modèles physiopathologiques de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.....	109

TABLE DES FIGURES

Figure 29 : Schématisation des voies de signalisation couplées aux récepteurs β_1 -AR et β_2 -AR au niveau cardiaque.....	118
Figure 30 : Schématisation des voies de signalisation couplées aux récepteurs β_3 -AR au niveau cardiaque.....	120
Figure 31 : Développement du médicament.....	125
Figure 32 : Les différentes étapes de la recherche.....	127
Figure 33 : Processus d'optimisation des têtes de série (leads).....	129
Figure 34 : Les différentes étapes du développement du médicament.....	129
Figure 35 : Evaluation du ONOO ⁻ au niveau cardiaque	153
Figure 36 : Evaluation de l'expression protéique d'AK1 au niveau cardiaque à 45 et 60 semaines chez les animaux WT et Tg β_3	204
Figure 37 : Evaluation de l'expression protéique d'AK1 au niveau du sang total à 45 semaines chez les animaux WT et Tg β_3	204
Figure 38 : Concentration plasmatique d'IL-1 β , TNF- α et d'IL-6 à 15, 30 et 45 semaines chez les WT et les Tg β_3	208

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Paramètres évalués par échocardiographie.....	29
Tableau 2 : Paramètres évalués par échocardiographie-Doppler	30
Tableau 3 : Paramètres évalués en hémodynamique invasive.....	31
Tableau 4 : Symptômes et signes cliniques de l'IC.....	41
Tableau 5 : Différentes étiologies de l'IC	48
Tableau 6 : Classification clinique de la sévérité de l'IC	52
Tableau 7 : Définition de l'ICF _{Er} , de l'ICF _{Em} et de l'ICF _{Ep}	54
Tableau 8 : Description du score H ₂ FPEP	60
Tableau 9 : Classification de la dysfonction diastolique	84
Tableau 10 : Les différents modèles d'ICF _{Ep}	103

INTRODUCTION

L'insuffisance cardiaque (IC) est une pathologie complexe. En effet, il existe plusieurs types d'IC et de nombreuses étiologies ce qui rends le diagnostic des patients compliqué. A ce jour, il est nécessaire d'améliorer nos connaissances sur l'IC afin de trouver de nouveaux outils diagnostic et de nouveaux traitements. Afin de simplifier la compréhension de ce manuscrit, il est nécessaire de poser les bases de la fonction cardiaque et des techniques utilisées pour l'évaluer.

1. Les bases de la fonction cardiaque

1.1. Les cellules cardiaques

Le cœur est composé de plusieurs types cellulaires qui repose sur une matrice extracellulaire (MEC) :

- les cardiomyocytes représentent 30 % de l'ensemble des cellules (en nombre) (Zhou and Pu, 2016),
- les autres types cellulaires représentent 70 % du nombre des cellules du myocarde, et incluent les cellules musculaires lisses (CML), les cellules endothéliales, les fibroblastes, les neurones et les cellules du système immunitaire (Zaglia and Mongillo, 2017; Zhou and Pu, 2016).

La MEC forme un réseau entourant et reliant ces différents types cellulaires. La MEC est composée de protéines, glycoprotéines, protéoglycanes et glycosaminoglycanes (Rienks et al., 2014). Les composants de la MEC sont organisés en trois catégories :

- les éléments non structurels qui participent au remodelage de la matrice. Cette catégorie est composée de cytokines, de protéase, de facteur de croissance comme le *Transforming growth factor β* (TGF- β),
- les éléments structurels de la lame basale. Cette structure entoure les cardiomyocytes et les cellules endothéliales. Elle est essentiellement composée de laminine, de fibronectine et de collagène (type IV),
- les éléments structurels de la matrice interstitielle qui est constituée de collagènes (type I et III) et d'élastine. Cette structure permet l'organisation du tissu.

Les collagènes forment la structure fibreuse de la matrice. Cette grande famille est composée de 28 types de collagène. Au niveau de la MEC, les collagènes fibrillaires de type I et III sont majoritairement représentés. Ils permettent la structuration de la MEC et, de par leurs propriétés, fournissent une résistance à l'étirement. Les collagènes sont majoritairement produits par les fibroblastes cardiaques (Kisling et al., 2019).

Le cœur est un muscle strié comme le muscle squelettique. Pour fonctionner le cœur renferme un système d'automatisme, ce qui permet au cœur d'avoir un cycle de contraction et de relaxation en alternance. Les cardiomyocytes sont reliés entre eux par des disques intercalaires qui permettent le passage de l'activité électrique d'une cellule à une autre pour synchroniser la fonction cardiaque (Woodcock and Matkovich, 2005).

1.2. Le couplage excitation-contraction

Le couplage excitation-contraction est le mécanisme qui regroupe l'ensemble des processus qui vont permettre de transformer un potentiel d'action en une activité mécanique donc une contraction. La genèse d'une activité électrique va entraîner une augmentation du calcium (Ca^{2+}) au niveau intracellulaire, c'est le transitoire calcique. Puis le déclenchement de la contraction aura lieu. Le Ca^{2+} ainsi que l'adénosine triphosphate (ATP) jouent un rôle central dans le mécanisme de couplage excitation-contraction. Au niveau du myocyte, plusieurs structures sont nécessaires pour réaliser la contraction cardiaque.

1.2.1. La membrane plasmique

La membrane plasmique des cardiomyocytes présente des tubules T qui vont permettre la propagation du potentiel d'action. Cette membrane plasmique est composée de canaux calciques de type L, qui permettent l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule, et de l'échangeur sodium (Na^+) / Ca^{2+} (NCX), qui permettent la sortie de Ca^{2+} de la cellule.

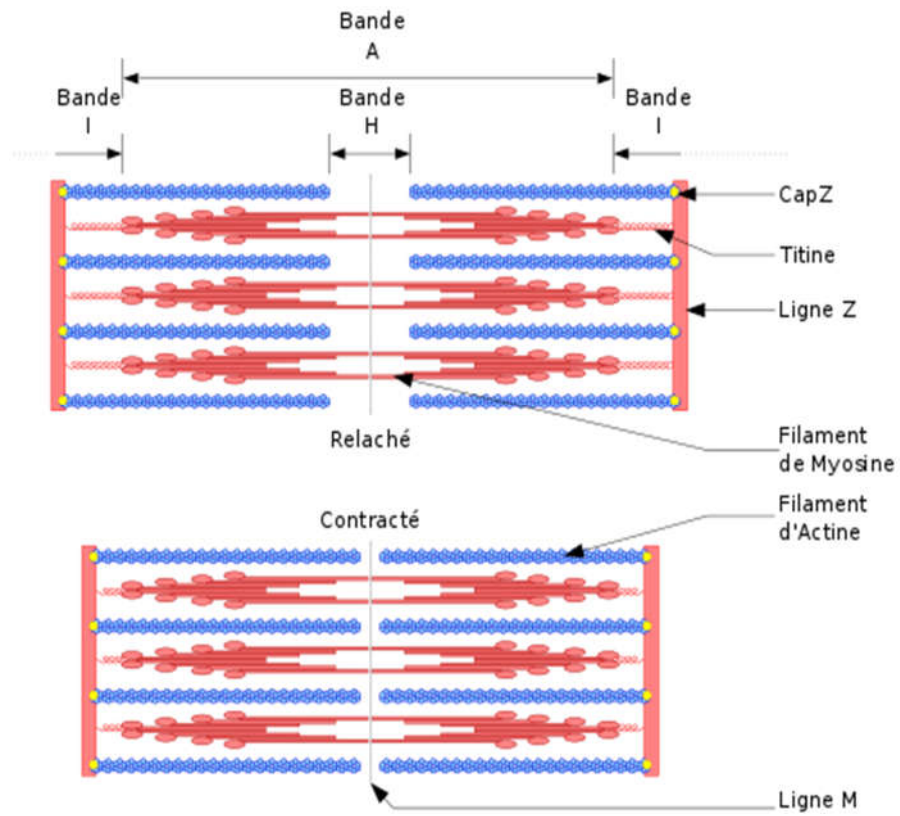


Figure 1 : Organisation des myofibrilles au niveau des cardiomyocytes

D'après Richfield *et al.*, 2014 (Richfield, 2014).

1.2.2. Le réticulum sarcoplasmique

Le réticulum sarcoplasmique (RS) est formé d'une partie longitudinale et d'une partie jonctionnelle qui est localisé à proximité de la membrane des tubules T. Il a pour fonction de capter, séquestrer et libérer le Ca^{2+} nécessaire pour la contraction. Le RS est composé du récepteur à la ryanodine de type 2 (RyR2) qui permet la libération du Ca^{2+} contenu dans le RS. L'activation de ce récepteur est induite par l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire via les canaux calciques de type L. Le repompage du Ca^{2+} cytosolique vers le RS est réalisé par la pompe calcium adénosine triphosphatase du réticulum sarco/endoplasmique de type 2a (SERCA2a). Cette pompe est localisée au niveau du RS longitudinal et peut transporter deux molécules de Ca^{2+} pour une molécule d'ATP hydrolysé.

1.2.3. Les protéines de l'appareil contractile

Dans une cellule cardiaque le sarcomère mesure généralement 1,8 μm . Il est composé de filaments fins et épais (Lamb, 2000).

La myosine qui constitue le filament épais, est responsable de l'activité contractile du cardiomyocyte par l'interaction de ses têtes ATPasiques avec les filaments fins d'actine lors de la fixation du Ca^{2+} sur la troponine C, qui induit le raccourcissement du sarcomère. Ainsi le couple actine-myosine est le principal déterminant de la contraction, mais il a également un rôle important dans la relaxation.

Les myofibrilles, qui composent les fibres musculaires, s'étendent sur toute la longueur des cardiomyocytes. Elles sont composées de filaments épais et de filaments fins (Figure 1). Les filaments épais sont composés de myosine qui est une protéine structurelle et fonctionnelle possédant un site de fixation à l'actine. L'actine est l'un des constituants des filaments fins. Parmi les filaments fins, on retrouve aussi d'autres protéines régulatrices de la contraction comme la troponine et la tropomyosine.

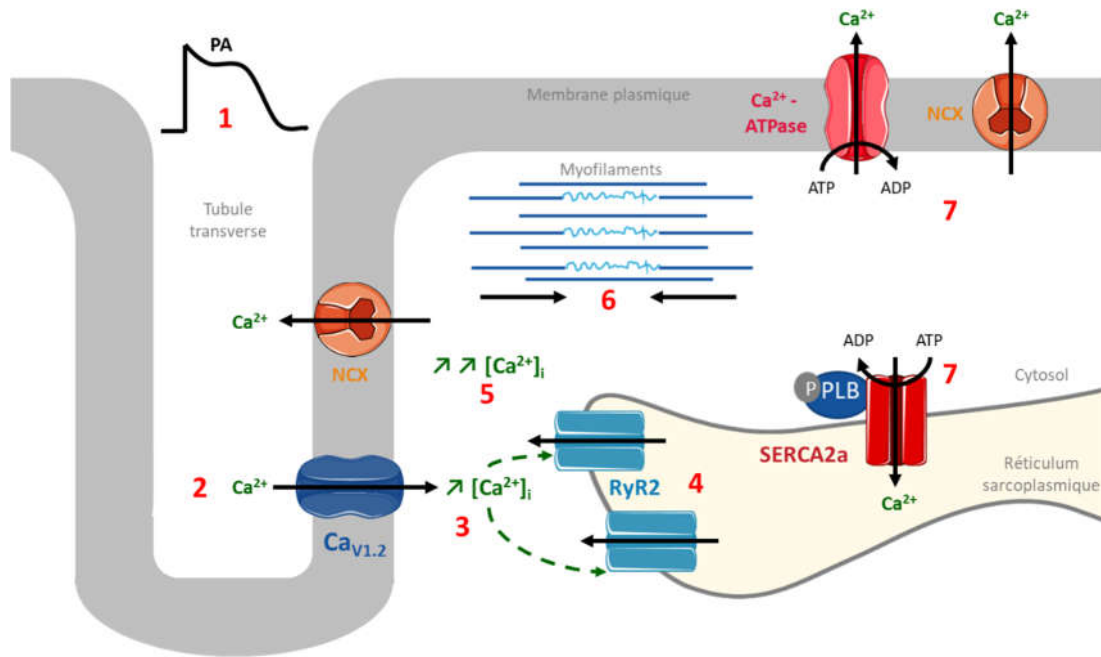


Figure 2 : Couplage excitation contraction

Adapté de Bers, 2002 (Bers, 2002). Lors de l'arrivée du potentiel d'action (PA) au niveau des tubules transverse (1), les canaux calciques de type L, $\text{Ca}_{V1.2}$, vont s'activer et laisser entrer du calcium (Ca^{2+}) dans la cellule (2). La concentration en calcium intracellulaire ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) augmente (3) pour atteindre le seuil d'activation des récepteurs à la Ryanodine (RyR2) qui vont induire la libération des stocks de Ca^{2+} contenus dans le réticulum sarcoplasmique (RS) (4). L'augmentation massive de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (5) va permettre le raccourcissement des myofilaments : c'est la contraction (6). Puis afin d'induire la relaxation, le Ca^{2+} va être extrudé vers l'extérieur de la cellule grâce à l'échangeur NCX et aux Ca^{2+} - ATPase (7). De plus le Ca^{2+} est aussi pris en charge par la pompe ATPase du RS (SERCA2a) afin de rétablir les stocks calciques au niveau du RS (7). Ca^{2+} : calcium ; PA : potentiel d'action ; NCX : Echangeur sodium (Na^+)/ Ca^{2+} ; RyR2 : récepteur à la Ryanodine de type 2 ; SERCA2a : réticulum sarco/endoplasmique calcium-adenosine triphosphatase de type 2a ; PLB : phospholamban ; ATP : adénosine triphosphate ; ADP : adénosine diphosphate.

Le complexe troponine-tropomyosine permet de cacher les sites d'interactions entre l'actine et la myosine lors de la relaxation des myofibrilles. L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire va induire un changement de conformation du complexe libérant les sites d'interactions entre la myosine et l'actine. Cette interaction entre le filament épais et le filament fin, via l'interaction de la myosine et de l'actine, permet le raccourcissement des sarcomères et donc la contraction musculaire.

On trouve aussi la titine, giga-protéine sarcomérique qui possède des propriétés élastiques et structurelles. Il existe deux isoformes de titine : l'isoforme N2BA qui est la plus compliant et l'isoforme N2B qui est la plus rigide. Cette protéine assure le maintien des filaments épais et permet ainsi au muscle de retrouver sa forme initiale après avoir été étiré. Ses propriétés élastiques lui permettent de participer à la relaxation passive du sarcomère et par extension du myocarde (LeWinter and Granzier, 2013). Ces propriétés élastiques sont modulées, entre autres, par l'état de phosphorylation de la titine. La rigidité de la titine peut être modulée par la variation d'expression des isoformes ou par les altérations de leur état de phosphorylation. Par conséquent les paramètres fonctionnels systolique et diastolique des patients vont eux aussi être modulés.

1.2.4. Les mécanismes cellulaires du couplages excitation-contraction

Le Ca^{2+} joue un rôle central dans le mécanisme de couplage excitation-contraction. Ce mécanisme regroupe l'ensemble des processus qui vont permettre de transformer un potentiel d'action, soit un influx électrique, en action mécanique par la contraction du cardiomyocyte. Les étapes du couplage excitation-contraction sont les suivantes (Bers, 2002) (Figure 2) :

- 1 : le potentiel d'action arrive au niveau des tubules T des cardiomyocytes,
- 2 : la variation du potentiel de membrane induite par le potentiel d'action va conduire à l'activation et l'ouverture des canaux Ca^{2+} de type L présents sur les tubules T. L'activation de ces canaux va permettre un courant calcique de type L entrant ($I_{\text{Ca,L}}$) et donc une entrée de Ca^{2+} dans la cellule,
- 3 : la concentration intracellulaire du Ca^{2+} libre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) dans le cardiomyocyte passe de 100 nM à 10-20 μM localement,

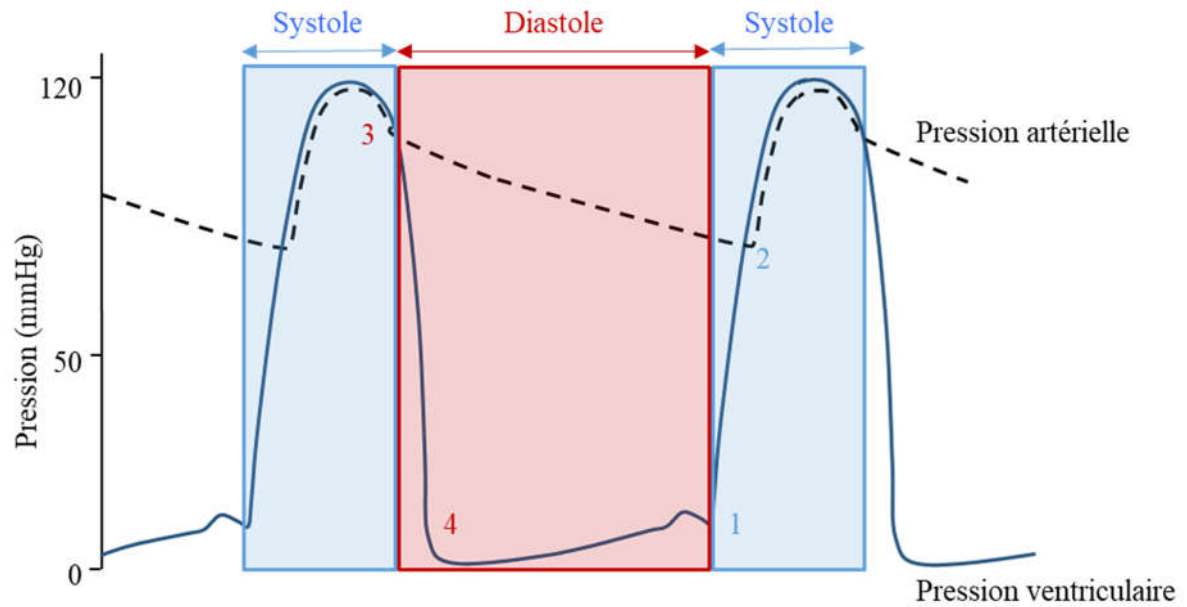


Figure 3 : Cycle cardiaque

Adapté d'E.Klabunde, 2012. (E. Klabunde, 2012)

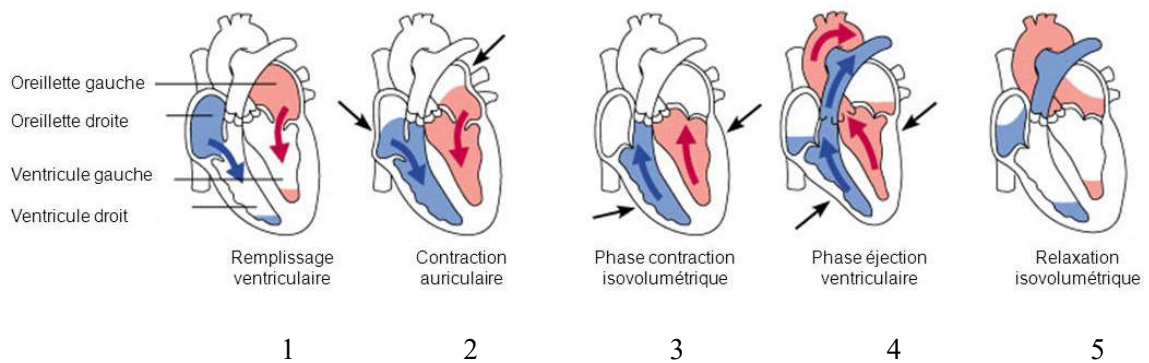


Figure 4 : Déroulement d'un cycle cardiaque

D'après McKinley and Michael, 2014. (McKinley and Michael, 2014)

- 4 : l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ va activer le récepteur RyR2 induisant son ouverture et la libération de Ca^{2+} par le RS grâce au mécanisme appelé *calcium induced-calcium released* (CICR),
- 5 : le $[Ca^{2+}]_i$ augmente pour atteindre des concentrations comprises entre 200-400 μM et diffuse dans toute la cellule,
- 6 : le Ca^{2+} va se fixer au niveau des myofilaments et plus particulièrement au niveau de la troponine. Cela va induire un changement de conformation du complexe troponine-tropomyosine. Par son action, le Ca^{2+} va libérer le site d'interaction entre l'actine et la myosine et initier l'hydrolyse de l'ATP en adénosine diphosphate (ADP). Ce mécanisme va produire un mouvement mécanique qui s'observe par un raccourcissement des sarcomères : la contraction,
- 7 : la diminution de la $[Ca^{2+}]_i$ est essentielle pour permettre la relaxation du cardiomyocyte et le retour à l'état initial du complexe troponine-tropomyosine. Le Ca^{2+} va être principalement recapté par la pompe SERCA2a. Cette pompe, régulée par le phospholamban (PLB) et localisée sur la membrane du RS, permet un transport actif du Ca^{2+} du cytosol vers la lumière du RS. La phosphorylation du PLB, par la protéine kinase A (PKA) ou par la Calmoduline Kinase II (CAMKII), va lever l'action inhibitrice du PLB sur la pompe et donc augmenter l'activité de SERCA2a (Schwinger et al., 1999) . La diminution de la $[Ca^{2+}]_i$ va aussi être gérée par l'échangeur NCX et la Ca^{2+} - ATPase au niveau de la membrane plasmique induisant la sortie du $[Ca^{2+}]_i$ vers l'extérieur de la cellule.

1.3. Le cycle cardiaque

L'activité du cœur se décompose en deux phases distinctes : la phase de systole (contraction cardiaque et éjection du sang) et la phase de diastole (relaxation cardiaque et remplissage du cœur) (Figure 3). Le cycle cardiaque se décompose en cinq phases (Figure 4) :

- le remplissage ventriculaire avec une phase rapide et une phase lente,
- la systole auriculaire,
- la contraction isovolumique,
- l'éjection ventriculaire,
- et la relaxation isovolumique.

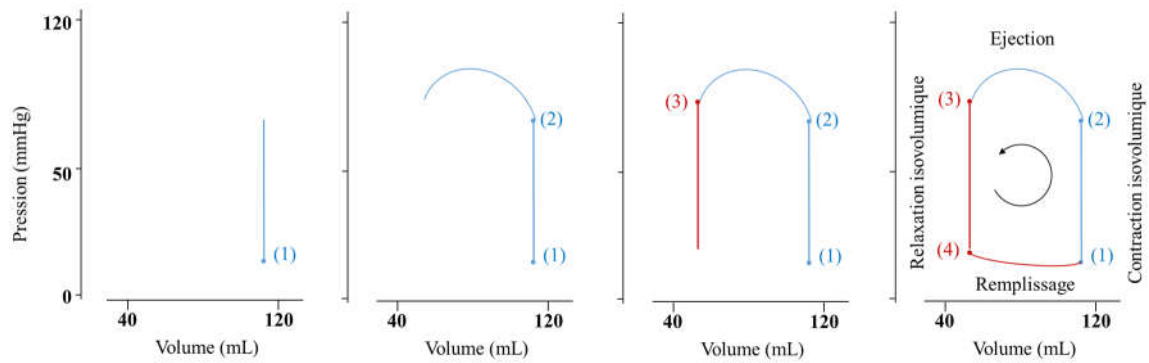


Figure 5 : Relation pression-volume au cours du cycle cardiaque dans le ventricule gauche

Adapté d'E.Klabunde, 2012 (E. Klabunde, 2012).

Début de systole cardiaque avec la contraction isovolumique et la fermeture de la valve mitrale (1). Début de l'éjection du sang avec l'ouverture de la valve aortique (2). Fin de la systole et début de la diastole avec la fermeture de la valve aortique (3). Cette étape correspond à la relaxation isovolumique. L'ouverture de la valve mitrale (4) permet le commencement du remplissage cardiaque avec une phase rapide puis une phase lente. Le remplissage se termine par une systole auriculaire ce qui entraîne le début d'un nouveau cycle cardiaque.

Dans un souci de simplification, le déroulement d'un cycle cardiaque sera détaillé uniquement pour le ventricule et l'oreillette gauche. Les mêmes étapes se déroulent au niveau du cœur droit.

La phase systolique se décompose de la façon suivante (Figure 5) :

- la fermeture de la valve mitrale est initiée par l'élévation de la pression intra-ventriculaire,
- la pression ventriculaire augmente sans modification du volume ventriculaire, c'est la phase de contraction isovolumique,
- puis la pression dans le ventricule devient supérieure à la pression artérielle et provoque l'ouverture de la valve aortique, permettant l'éjection du sang du ventricule gauche (VG) vers l'aorte, c'est la période d'éjection systolique.

Enfin l'éjection du sang provoque la diminution de la pression intra-ventriculaire et la fermeture de la valve aortique ; on parle de la télésystole. C'est le début de la phase de diastole. La diastole est divisée en 4 phases :

- la phase de relaxation isovolumique : le muscle cardiaque se relâche sans variation du volume intraventriculaire,
- la phase de remplissage rapide et passif : lorsque la pression ventriculaire devient plus faible que la pression dans les oreillettes, la valve mitrale s'ouvre. Le remplissage passif des ventricules par gradient de pression auriculo-ventriculaire peut donc commencer. En situation physiologique, 70 à 80 % du remplissage a lieu pendant cette phase,
- la phase de remplissage lent ou diastase : les pressions s'égalisent entre l'oreillette gauche et le VG entraînant une réduction du flux auriculo-ventriculaire. Moins de 5 % du remplissage est réalisé lors de la diastase,
- le remplissage actif : durant cette période, l'oreillette se contracte. La systole auriculaire permet de chasser le sang qui remplissait l'oreillette vers le ventricule. Cette phase représente 20 à 30 % du remplissage. Le remplissage des ventricules induit une augmentation de la pression intra-ventriculaire qui est supérieure à la pression auriculaire entraînant une fermeture de la valve mitrale et la fin de la diastole : on parle de la télédiastole. Cela marque aussi le début de la phase de contraction isovolumique et donc d'un nouveau cycle cardiaque (Figure 3 et Figure 4).

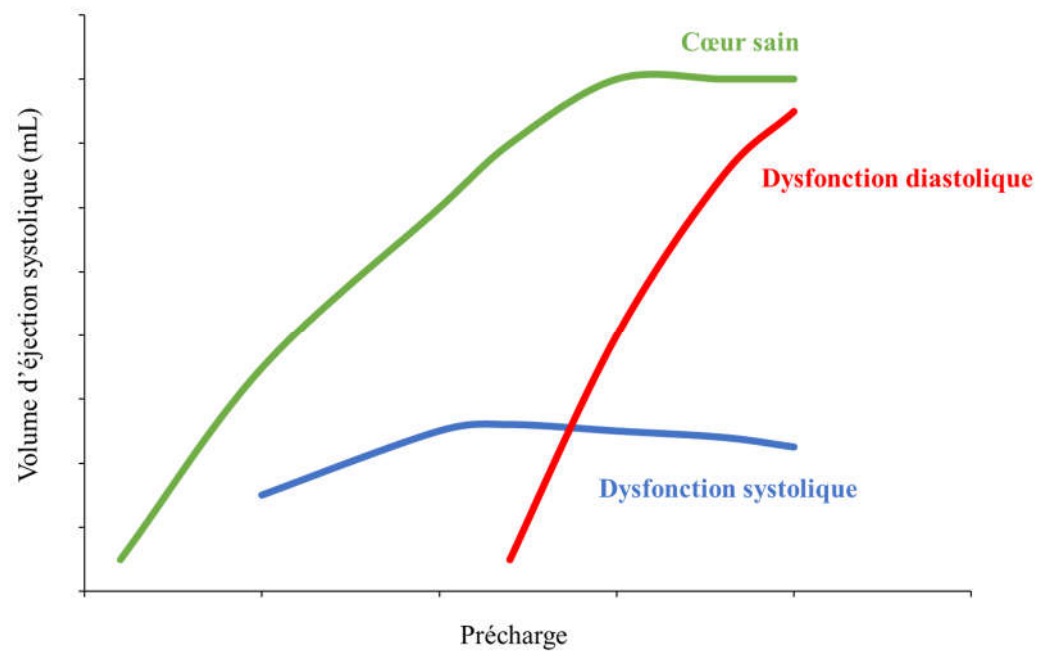


Figure 6 : Loi de Frank-Starling

Adapté de (Chassot, 2010)

L'une des lois fondamentales en hémodynamique est la loi de Frank-Starling. Cette loi explique la relation entre l'étirement des fibres musculaires myocardiques et leur performance contractile. Ces auteurs ont démontré que, dans une limite physiologique, plus les fibres s'étirent, mieux elles se contractent (Frank, 1895; Starling and Visscher, 1927).

Dans le cas du cycle cardiaque, plus le VG se distend lors du remplissage, plus il va se contracter, induisant ainsi une augmentation du volume d'éjection systolique (VES). Cette loi exprime le rapport entre la tension de la paroi (volume ou pression télédiastolique, soit la précharge) et la performance systolique. La proportionnalité entre la force contractile et le volume télédiastolique n'est pas illimitée. Il existe un point à partir duquel l'augmentation du volume télédiastolique ne s'accompagne plus d'une augmentation de la force contractile.

Dans le cas d'une dysfonction systolique : la pente est très faible car il y a peu d'amélioration du VES lors de l'augmentation du remplissage. Cette courbe est aplatie et s'infléchit du fait de la dilatation du ventricule.

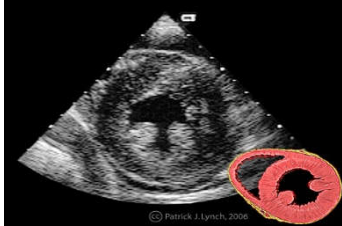
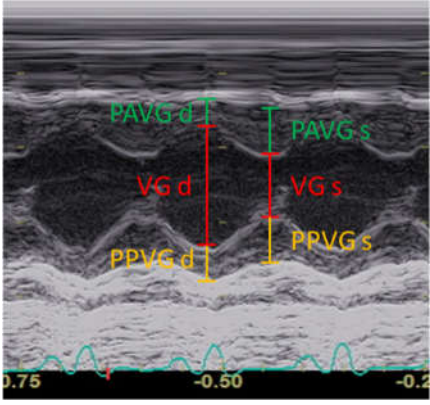
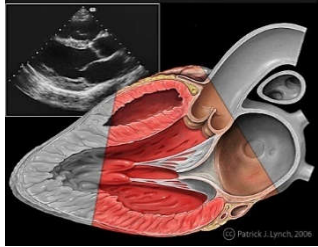
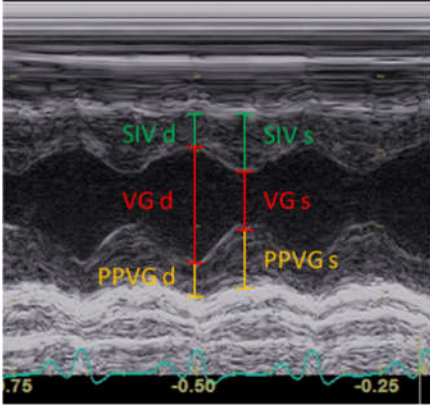
Dans le cas d'une dysfonction diastolique la pente est très importante avec une absence de plateau car le VES est fortement dépendant de la précharge. Les pressions de remplissage en fin de diastole sont très importantes ce qui provoque un déplacement de la courbe vers la droite (Figure 6).

1.3.1. Evaluation de la fonction cardiaque par échocardiographie

Ce principe d'imagerie non-invasive repose sur l'usage d'ultrasons. Les ultrasons, émis par la sonde d'échocardiographie, sont réfléchis lorsqu'ils rentrent en contact avec les tissus. L'onde réfléchie est ensuite captée par la même sonde qui va créer une image de ce tissu. On peut analyser les tissus (cœur, aorte) par l'échocardiographie tridimensionnelle comme présenté dans le Tableau 1, avec de nombreux paramètres. On peut également mesurer les flux avec l'analyse doppler où les ultrasons sont réfléchis par les hématies en mouvement dans les cavités cardiaques et les coronaires. L'onde observée donne l'orientation et la vitesse du flux (Tableau 2).

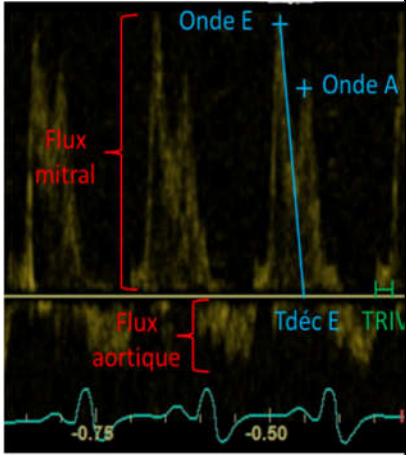
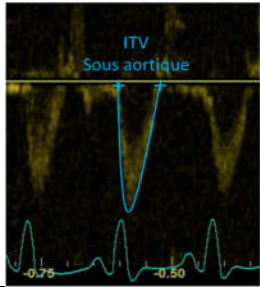
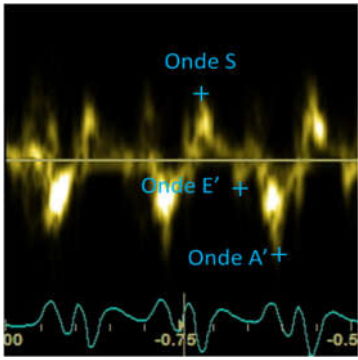
L'échocardiographie permet d'obtenir de nombreuses informations sur la fonction cardiaque, la morphologie du cœur ou des flux sanguins.

Tableau 1 : Paramètres évalués par échocardiographie

Coupe	Abrév.	Définition	Images
Petit axe / Grand axe	PAVG d	Épaisseur de la paroi antérieure du VG en diastole	Coupe petit axe  
Petit axe / Grand axe	PAVG s	Épaisseur de la paroi antérieure du VG en systole	
Petit axe / Grand axe	VG d	Diamètre du VG en diastole	
Petit axe / Grand axe	VG s	Diamètre du VG en systole	
Petit axe / Grand axe	PPVG d	Épaisseur de la paroi postérieure du VG en diastole	Coupe grand axe  
Petit axe / Grand axe	PPVGs	Épaisseur de la paroi postérieure du VG en systole	
Grand axe	SIV d	Épaisseur du Septum Inter- ventriculaire en diastole	
Grand axe	SIV s	Épaisseur du Septum Inter- ventriculaire en diastole	

Abrév. : Abréviation ; VG : ventricule gauche ; PA : paroi antérieure ; d : diastole ; s : systole ; PP : paroi postérieure ; SIV : septum inter-ventriculaire.

Tableau 2 : Paramètres évalués par échocardiographie-Doppler

	Abrév.	Définition	Images
Flux mitral	E	Vitesse de l'onde E : correspond au flux de remplissage passif du VG dû à l'ouverture de la valve mitrale.	
	A	Vitesse de l'onde A : correspond au flux de remplissage actif du VG dû à la contraction atriale.	
	TDE	Temps de décélération de l'onde E	
	TRIV	Temps de relaxation iso-volumique : temps entre la fermeture de la valve aortique et l'ouverture de la valve mitrale.	
Flux aortique	ITV _{AO}	Intégrale Temps*Vitesse sous aortique : distance parcourue par la colonne de sang durant la systole.	
Doppler tissulaire	Onde Sa ou s'	Vitesse de mouvement de la paroi en systole	
	Onde Ea ou e'	Relaxation passive du VG pendant son remplissage	
	Onde Aa ou a'	Relaxation active du VG lors de la contraction de l'oreillette : compliance	

Abrév. : Abréviation ; VG : ventricule gauche ; TRIV : temps de relaxation iso-volumique ; TDE : temps de décélération de l'onde E ; ITV_{AO} : intégrale temps*vitesse sous aortique.

Tableau 3 : Paramètres évalués en hémodynamique invasive

	Abréviations	Paramètres
Artère carotide	PAS (mmHg)	Pression artérielle systolique
	PAD (mmHg)	Pression artérielle diastolique
	PAM (mmHg)	Pression artérielle moyenne
VG	FC (min^{-1})	Fréquence cardiaque
	$\text{DP/dT}_{\text{max}}$ (mmHg.s^{-1})	Vitesse maximale de contraction
	$\text{DP/dT}_{\text{min}}$ (mmHg.s^{-1})	Vitesse maximale de relaxation
	PTD_{VG} (mmHg)	Pression télédiastolique ou pression en fin de diastole
	Tau	Constante de relaxation

PAS : pression artérielle systolique ; PAD : pression artérielle diastolique ; PAM : pression artérielle moyenne ; FC : fréquence cardiaque ; $\text{DP/dT}_{\text{max}}$: vitesse maximale de contraction ; $\text{DP/dT}_{\text{min}}$: vitesse maximale de relaxation ; PTD_{VG} : pression télédiastolique du ventricule gauche ; VG : ventricule gauche.

1.3.2. Evaluation de la fonction cardiaque par cathétérisme cardiaque

La mesure des courbes de pression-volume du VG permet l'évaluation de nombreux paramètres cardiaques et vasculaires. Cette technique invasive permet d'avoir en même temps les pressions et les volumes grâce à une sonde au niveau de la cavité ventriculaire par cathétérisme cardiaque. Les informations obtenues permettent de tracer la relation pression-volume sur un cycle cardiaque comme sur la Figure 5. La liste des paramètres mesurables sont présentés dans le Tableau 3.

2. Les bases de la fonction vasculaire

La fonction du système vasculaire est d'assurer la répartition du débit sanguin entre les organes. Le maintien d'une pression et d'un débit de perfusion sont assurés par différents mécanismes de régulation comme la modification du diamètre des vaisseaux. La majorité des vaisseaux sont composés d'une paroi artérielle qui est compartimentée de la manière suivante (de la lumière vers l'extérieur du vaisseau) : l'intima, la média et l'adventice. L'importance relative de chacun de ces éléments est différente en fonction des secteurs vasculaires ce qui détermine leur propriété. Nous allons nous intéresser aux deux éléments jouant un rôle central dans la régulation : les CML, qui permettent la contraction et la relaxation des vaisseaux, et les cellules endothéliales.

2.1. Les cellules musculaires lisses

La contraction des vaisseaux est induite par l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ suite à une dépolarisation de la membrane ou suite à une fixation d'agonistes sur des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéine G. Dans les deux cas, les stimuli ont pour conséquence finale la mobilisation des stocks de Ca^{2+} du RS. La formation du complexe Ca^{2+} -calmoduline va permettre de démasquer le site catalytique de la kinase des chaînes légères de la myosine en se fixant sur cette dernière (Ogut and Brozovich, 2003). Ceci permet la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine engendrant un changement de conformation de la tête de la myosine qui peut alors se fixer sur l'actine et hydrolyser une molécule d'ATP (Hong et al., 2015).

La relaxation des CML s'effectue par un retour de la $[Ca^{2+}]_i$ à sa valeur de repos et par une désensibilisation de l'appareil contractile. Ce dernier mécanisme implique des facteurs vasodilatateurs, comme le monoxyde d'azote (*NO), qui agissent sur l'endothélium et/ou sur les CML. Les mécanismes cellulaires permettant la diminution de la $[Ca^{2+}]_i$ sont (Akata, 2007):

- l'activation des pompes SERCA par la phosphorylation du PLB qui permettent le recaptage du Ca^{2+} par le RS,
- une extrusion du Ca^{2+} intracellulaire par la pompe Ca^{2+} -ATPase.

En ce qui concerne la désensibilisation de l'appareil contractile au Ca^{2+} , ce mécanisme est réalisé par deux voies de signalisation :

- la voie de l'adénylate cyclase (AC) /3'-5'-adénosine monophosphate cyclique (AMPc)/PKA,
- la voie de la guanlylate cyclase (GC)/3'-5'-guanosine monophosphate cyclique (GMPc)/protéine kinase G (PKG).

L'endothélium joue aussi un rôle important dans la fonction vasculaire.

2.2. La fonction de l'endothélium

Au niveau de la microcirculation, l'endothélium joue un rôle de barrière semi-perméable entre le sang et les tissus en permettant le passage sélectif de certaines molécules, ce qui participe à l'homéostasie plasmatique de ses constituants. A l'inverse, au niveau des artères de gros calibre, l'endothélium doit résister aux forces hémodynamiques et maintenir son intégrité. L'endothélium joue un rôle important dans la régulation de la vasomotricité, la perméabilité vasculaire et la prévention des phénomènes thrombotiques (Rajendran et al., 2013).

Au niveau du cœur, l'endothélium est capable d'interagir directement avec les cardiomyocytes afin de réguler leur contractilité. Cela est possible grâce à la proximité entre cardiomyocytes et cellules endothéliales. En effet, un cardiomyocyte ne se trouve jamais à plus de 50 μm d'une cellule endothéliale (Colliva et al., 2020).

Il existe deux types d'endothélium au niveau cardiaque :

- l'endothélium endocardique qui est présent au niveau des parois des cavités ventriculaires,
- l'endothélium des coronaires qui tapisse l'ensemble du réseau vasculaire perdusant le cœur.

Il est décrit que l'endothélium endocardique et la micro-vasculature coronaire permettent de réguler la contractilité cardiaque. En effet, lorsque cet endothélium est abrasé l'amplitude de la contraction est diminuée. La régulation de l'endothélium sur la contractilité cardiaque s'effectue par une action autocrine et paracrine des cellules endothéliales sur les cardiomyocytes avec l'implication du NO notamment.

2.3. Le monoxyde d'azote

2.3.1. La fonction du monoxyde d'azote

Les propriétés du NO dans le système cardiovasculaire ont été mises en évidence pour la première fois en 1980 par l'équipe de Furchgott et *al* (Furchgott and Zawadzki, 1980; Ignarro et al., 1987) mais ce n'est qu'en 1987 que le NO fut formellement identifié. Le NO est une espèce radicalaire composée d'un atome d'azote lié à un atome d'oxygène dont la durée de demi-vie est de quelques secondes. Ce gaz liposoluble, pouvant diffuser à travers les membranes cellulaires, est capable d'activer de nombreuses voies de signalisation.

Une fois synthétisé, le NO diffuse rapidement vers l'extérieur de la cellule. Le NO entraîne une relaxation du muscle lisse et empêche l'agrégation et l'adhérence plaquettaire via la guanylate cyclase soluble (GCs). La production du NO se fait principalement au niveau de la cellule endothéliale.

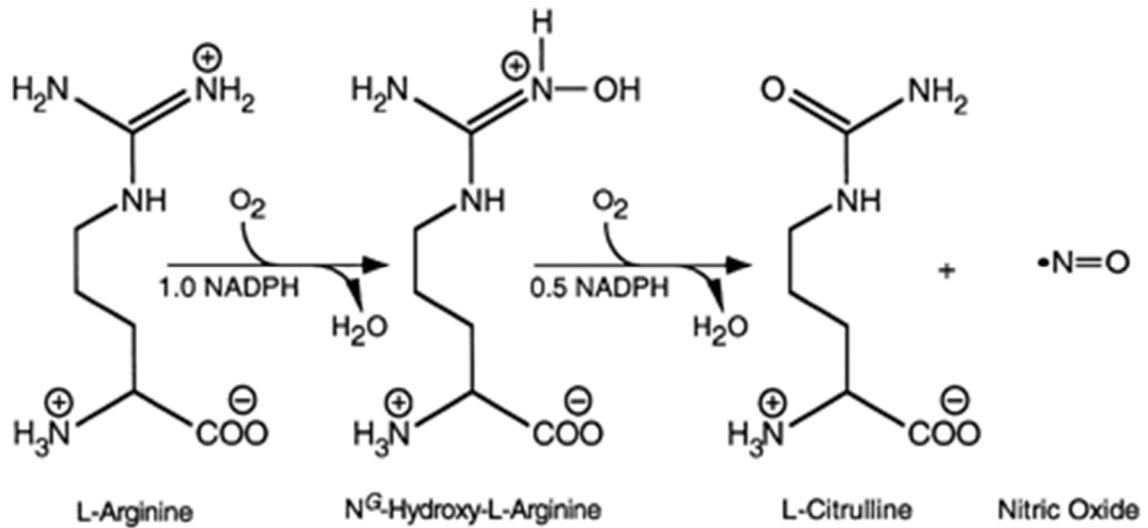


Figure 7 : Réaction enzymatique catalysée par les NOS

D'après Andrew et Mayer, 1999 (Andrew and Mayer, 1999).

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; NOS : 'NO synthases (NOS) ; 'NO : *nitric oxide* ou monoxyde d'azote.

Le NO va induire l'activation de la GCs qui, à son tour, va induire une augmentation du GMPc. Le GMPc active la PKG qui va phosphoryler différents substrats. L'activation de la voie GCs/GMPc/PKG a des effets dépendants de la concentration en NO (Casadei and Sears, 2003). Ainsi, à de faibles concentrations, le NO a un effet inotrope positif sur la contraction cardiaque. A de fortes concentrations, le NO a un effet inotrope négatif (Francis et al., 2010; Hammond and Balligand, 2012; Zaccolo and Movsesian, 2007).

2.3.2. Les NO synthases

Les enzymes responsables de la production du NO sont les NO synthases (NOS), elles appartiennent à la famille des oxydoréductases. Les NOS catalysent l'oxydation d'un acide aminé, la L-arginine, par l'oxygène (O_2) aboutissant à la formation du NO et de la L-citrulline. Il y a deux étapes : l'hydroxylation de la L-arginine en N ω -hydroxy-L-arginine (NOHA) qui reste liée à l'enzyme, puis l'oxydation du NOHA en L-citrulline, accompagnée de la libération du NO (Adak et al., 2002). La tetrahydrobioptérine (BH_4) est un cofacteur essentiel au bon fonctionnement des NOS (Figure 7) (Salerno et al., 1995; Wei et al., 2005). Il existe trois isoformes de NOS, la NOS endothéliale (eNOS), la NOS neuronale (nNOS) et la NOS inducible (iNOS). La nNOS et la eNOS sont des NOS constitutives et Ca^{2+} -dépendantes alors que la iNOS est Ca^{2+} -indépendante.

La NOS neuronale (nNOS – 150kDa), codée par le gène *NOS1/Nos1* (Homme/Rat), a été initialement identifiée au niveau des neurones (Rand and Li, 1995). Les variants d'épissage de nNOS exprimés dans les muscles artériels lisses participent, avec eNOS, à la régulation de la pression artérielle. La nNOS a aussi été identifiée au sein du RS cardiaque où elle est impliquée dans la régulation des flux de Ca^{2+} et de la contraction du myocarde (Elfering et al., 2002).

La NOS inducible (iNOS – 130kDa) est codée par le gène *NOS2* ou *Nos2* (Homme/Rat). L'expression d'iNOS peut être induite par des médiateurs inflammatoires [interféron- γ (IFN- γ), le *tumor necrosis factor α* (TNF- α) et l'interleukine-1 (IL-1)] dans la plupart des types de cellules vasculaires, y compris les cellules endothéliales (Gross et al., 1991), les myocytes cardiaques (Balligand et al., 1994), les CML (Geller et al., 1993) et les macrophages (Buttery et al., 1996). L'expression de la iNOS est responsable de la diminution de la production du NO , dérivée de l'eNOS, dans les vaisseaux traités par des médiateurs inflammatoires (Kessler et al., 1997).

La NOS endothéliale (eNOS – 133kDa) est codée par le gène *NOS3* ou *Nos3* (Homme/Rat). Cette NOS est majoritairement exprimée au niveau des cellules endothéliales et est la source principale de production du NO . Elle est aussi exprimée sur le plan cardiaque que cela soit au niveau ventriculaire ou au niveau auriculaire (Balligand et al., 1993; Schulz et al., 1991). La eNOS présente la particularité de pouvoir s'associer avec la couche lipidique grâce à un site d'accrochage pour les chaînes d'acide gras. Généralement, on retrouve l'eNOS au niveau des cavéoles qui sont des replis ultra-structuraux de la membrane plasmique enrichis en cavéoline. Cela permet une facilitation de la diffusion du NO vers le sang ou les cellules sous-jacentes. Bien que l'eNOS ait souvent été appelée auparavant NOS constitutive, un certain nombre de facteurs aussi divers que l'hypoxie (Liao et al., 1995), l'oestrogène (Goetz et al., 1994) et l'exercice (Sessa et al., 1994) sont maintenant connus pour modifier son expression. Comme le contrôle endothélial du tonus vasculaire est un processus sensible et très précis, ces changements sont susceptibles d'être importants pour la fonction cardiovasculaire, en particulier dans des situations physiopathologiques.

3. L'insuffisance cardiaque

3.1. L'histoire de l'insuffisance cardiaque

L'un des premiers écrits décrivant l'IC remonte au V^{ème} siècle avant notre ère. Cette œuvre écrite par Hippocrate est un recueil de descriptions cliniques. Parmi ces descriptions, Hippocrate décrit la présence de deux symptômes chez des patients : la dyspnée ou le syndrome œdémateux généralisé (Katz and Katz, 1962). La présence de ces deux symptômes suggère une IC.

Dans l'œuvre d'Hippocrate, traduite par Emile Littré, une description d'un patient coïncide avec l'IC : « le patient apparaît jaune, le corps entier est œdémateux ; le visage est rouge ; la bouche est sèche ; il a soif et quand il mange la respiration s'accélère. Dans la même journée il peut aller mieux alors que dans d'autres cas il souffre beaucoup et semble sur le point de mourir » (Littré, 1839).

Au cours des années, les descriptions et la définition de l'IC va progresser avec l'évolution des connaissances. La découverte du caractère contractile du cœur et la compréhension de la cinétique du cœur avec la systole ainsi que le rôle des valves avec les travaux de Galien vont améliorer les connaissances sur l'IC. Les manifestations cliniques de l'IC ont pu être expliquées par la description de la circulation sanguine en plaçant le cœur comme une pompe avec des phases de contraction et de relâchement. On doit cette description aux travaux d'Harvey au XVII^{ème} siècle (Harvey, 1928).

De nombreuses découvertes scientifiques ont permis d'améliorer la compréhension de l'IC avec notamment la description par Frank et Starling de la réponse cardiaque aux variations de charge : loi de Frank-Starling décrite dans les années 1900 (Frank, 1895; Starling, 1918; Starling and Visscher, 1927). L'une des premières études épidémiologiques, et donnant une définition précise de l'IC, a été menée à Framingham dans les années 1970 (McKee et al., 1971).

Entre 1970 et 2020, de nombreuses avancées scientifiques ont permis de mieux comprendre l'IC et sa complexité. Si l'on prend en compte uniquement l'IC chronique, en 50 ans, la recherche a permis d'affiner la terminologie associée à l'IC systolique et diastolique. Sur le plan thérapeutique, c'est en 1920 que Saxl et Heilig ont découvert les diurétiques (Saxl and Heiling, 1920). Cependant ces médicaments agissent seulement sur les symptômes de l'IC et notamment sur les œdèmes. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) ont été découverts en 1956 mais ce n'est que dans les années 80 que leur effet bénéfique sur le long terme a été démontré (Ferreira et al., 1970; Gavras et al., 1974; Skeggs et al., 1956). Les β -bloquant, découverts dans les années 1960, ont été utilisés à partir de 1975 (Black et al., 1964; Shand, 2010).

A ce jour, environ 26 millions d'adultes souffrent d'IC dans le monde (Ponikowski et al., 2014). Malgré des décennies de recherche sur cette pathologie, les études épidémiologiques montrent une augmentation de sa prévalence et de la mortalité associée. Les coûts générés pour la prise en charge (PEC) des patients souffrants d'IC sont considérables (Savarese and Lund, 2017). En 2017, le total des dépenses s'élevait à 2,8 milliards d'euros en France. Même si de nombreuses approches pharmacologiques ont permis d'améliorer la PEC de certains patients, de nombreux autres sont encore en détresse thérapeutique avec une qualité de vie drastiquement réduite.

Compte tenu de l'augmentation constante de la prévalence de l'IC, il est important de continuer les recherches fondamentale et clinique pour améliorer :

- l'identification des populations à risque,
- le dépistage précoce de la pathologie pour ralentir sa progression,
- le pronostic clinique des patients grâce à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques,
- le suivi des patients afin d'éviter les ré-hospitalisations.

Ainsi la compréhension de la complexité de l'IC est nécessaire pour améliorer la PEC des patients.

3.2. Définition

L'IC est un syndrome clinique qui se définit par une incapacité du cœur à maintenir un débit sanguin suffisant pour subvenir aux besoins de l'organisme au repos ou à l'effort (Metra and Teerlink, 2017). D'un point de vue physiopathologique, l'IC est la conséquence d'un dysfonctionnement structurel ou fonctionnel du cœur. Ces défauts se traduisent par une diminution du débit cardiaque et/ou une élévation des pressions intracardiaques conduisant à une incapacité du ventricule à se remplir ou à éjecter le sang correctement (Metra and Teerlink, 2017; Ponikowski et al., 2016a).

La mise en évidence de la pathologie à l'origine de l'IC, autrement dit l'étiologie de l'IC, est essentielle au diagnostic mais aussi pour déterminer le traitement spécifique à utiliser. L'autre point essentiel pour la PEC de l'IC est d'identifier le type d'IC que présente le patient.

Tableau 4 : Symptômes et signes cliniques de l'IC

	Majeurs	Mineurs
Symptômes	Essoufflement au repos ou à l'effort Dyspnée nocturne paroxystique Orthopnée Réduction de la tolérance à l'exercice Fatigue et augmentation du temps de récupération après un exercice Gonflement des chevilles	Toux nocturne Respiration sifflante Ballonnement Diminution de l'appétit Confusion Dépression Palpitations Vertiges Syncope Bendopnée
Signes	Pression veineuse centrale > 16 cm Augmentation de la pression jugulaire Reflux hépato-jugulaire Distension veineuse / turgescence jugulaire Galop B3 Perte de poids $\geq$ à 4,5 Kg en 5 jours avec traitement Temps de circulation de 25 sec Choc apexien et/ou cardiomégalie	Perte de poids $\geq$ à 4,5 Kg en 5 jours sans traitement Œdèmes périphériques Cachexie Murmure cardiaque Œdèmes pulmonaires Tachycardie > 120 battements / minute Râles crépitants pulmonaires Hépatomégalie Epanchement pleural Capacité vitale < d'1/3 de la norme

Adapté de Ponikowski *et al.*, 2016 (Ponikowski et al., 2016a). IC : insuffisance cardiaque.

3.3. Diagnostic

Selon la *European Society of Cardiology* ou Société Européenne de Cardiologie (ESC), le diagnostic de l'IC est basé sur trois critères (Ponikowski et al., 2016a):

- dans un premier temps sur la présence de symptômes et signes cliniques caractéristiques de l'IC (Tableau 4) (Davie et al., 1997; Kelder et al., 2011; Mant et al., 2009; Oudejans et al., 2011),
- deuxièmement sur la preuve d'un dysfonctionnement cardiaque – systolique et/ou diastolique – au repos, mis en évidence par échocardiographie (de préférence),
- troisièmement – si nécessaire – sur une réponse positive aux traitements dirigés contre l'IC.

3.3.1. Symptômes et signes cliniques

Les symptômes et signes cliniques (Tableau 4) sont des paramètres importants à surveiller pour établir le diagnostic des patients mais aussi pour adapter le traitement en fonction de l'évolution de ces signes et symptômes cliniques. Généralement, la dyspnée, l'intolérance à l'exercice et l'augmentation de la pression veineuse sont des signes et des symptômes majoritairement retrouvés chez les patients souffrant d'IC.

3.3.2. Examens cliniques initiaux

Les critères sont adaptés en fonction des types d'IC qui sont des pathologies distinctes avec des mécanismes physiopathologiques qui leur sont propres. D'une manière générale, le dosage des peptides natriurétiques, l'électrocardiogramme (ECG) et l'échocardiographie sont réalisés pour le diagnostic de l'IC.

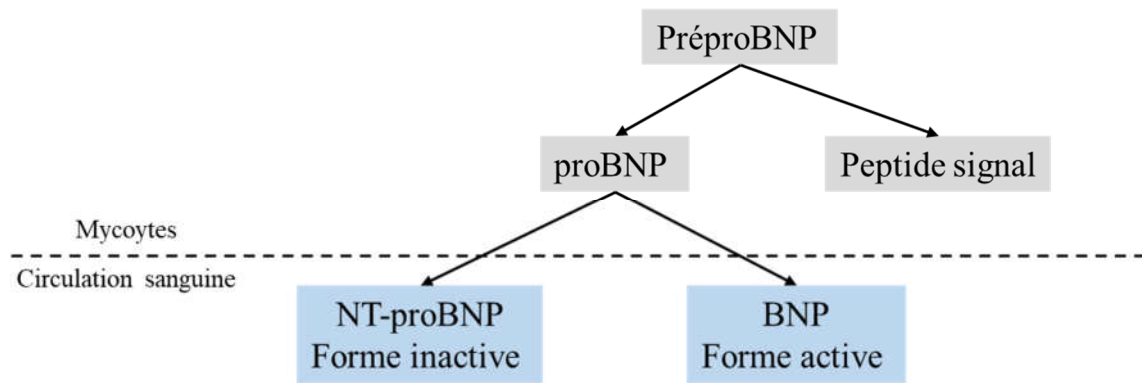


Figure 8 : Formation du BNP

D'après Ray *et al.*, 2003 (Ray *et al.*, 2003). BNP : *brain natriuretic peptide* ou peptide natriurétique de type B.

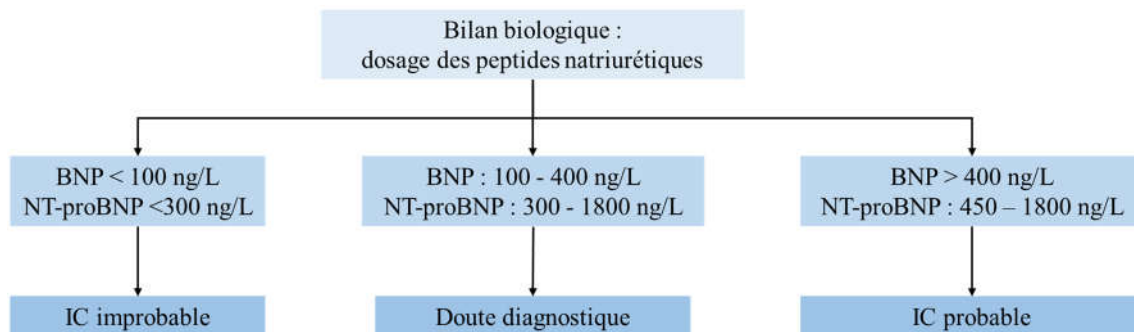


Figure 9 : Organigramme pour le diagnostic de l'IC à l'aide du BNP

D'après Dickstein *et al.*, 2008 (Dickstein *et al.*, 2008). BNP : *brain natriuretic peptide* ou peptide natriurétique de type B ; IC : insuffisance cardiaque.

3.3.2.1. Les peptides natriurétiques

Le dosage des peptides natriurétiques peut être utilisé comme test de diagnostic initial de l'IC. Le *brain natriuretic peptide* ou peptide natriurétique de type B (BNP) est principalement synthétisé par les myocytes en réponse à une augmentation de la charge volumique ou de la pression ventriculaire. Le BNP existe sous différentes formes. La forme de réserve est le préproBNP. Le préproBNP est clivé en proBNP qui sera lui-même clivé en NT-proBNP et en BNP actif. Le NT-proBNP n'a pas d'activité biologique en comparaison au BNP (Figure 8) (Ray et al., 2003).

Le BNP se fixe sur des récepteurs de type A au niveau de l'endothélium vasculaire entraînant une activation de différentes voies de signalisation. Le BNP induit une vasodilatation périphérique, augmente la filtration glomérulaire, diminue la réabsorption du sodium et inhibe le système rénine-angiotensine-aldostérone.

Le BNP et le NT-proBNP ont une valeur prédictive négative forte lors du diagnostic de l'IC (Roberts et al., 2015). A une valeur seuil de 100 ng/L, le BNP a 94 % de valeur prédictive négative, c'est-à-dire que les patients ayant des BNP inférieure au seuil de 100 ng/L ont une probabilité de 94 % de ne pas souffrir d'IC.

Dans le cas d'une dyspnée aiguë, les recommandations de l'ESC donnent les valeurs seuils à considérer pour exclure ou confirmer une origine cardiaque et donc d'orienter ou non vers le diagnostic de l'IC (Figure 9) (Dickstein et al., 2008).

Hors contexte aigu, les valeurs seuils pour exclure l'IC sont : BNP < 35 ng/L et NT-proBNP < 125 ng/L (McMurray et al., 2012).

Le BNP et le NT-proBNP sont donc des marqueurs biologiques de l'IC au niveau diagnostic, pronostic et thérapeutique. L'augmentation du BNP et du NT-proBNP permet de confirmer ou non l'IC dans le cadre du diagnostic. Dans le cas du pronostic, l'augmentation des concentrations du BNP et du NT-proBNP chez un patient souffrant d'IC augmente le risque de décès. Il est donc important de suivre les concentrations des peptides natriurétiques pour voir l'évolution de la pathologie (Maisel et al., 2008).

Les BNP et NT-proBNP ne permettent pas de faire la différence entre une dysfonction systolique ou diastolique. Le diagnostic de l'IC ne peut pas se baser uniquement sur les valeurs des peptides natriurétiques. En effet, les niveaux de BNP et de NT-proBNP augmentent avec l'âge et donc pour un diagnostic idéal, une valeur de référence pour chaque patient serait souhaitable. De plus, d'autres causes que l'IC induisent une augmentation des niveaux de BNP et de NT-proBNP comme le choc septique, l'insuffisance rénale ou la fibrillation atriale (FA). Il faut donc associer le bilan biologique à d'autres examens comme l'ECG (Fuat et al., 2006; Zaphiriou et al., 2005).

3.3.2.2. L'électrocardiogramme

Chaque patient souffrant potentiellement d'IC doit passer un ECG car les anomalies sont courantes chez les patients insuffisants cardiaques (Davie et al., 1996). Dans le cas d'une IC, à dysfonction systolique, une faible proportion des patients présente un ECG normal (< 10%) (Mant et al., 2009). Les anomalies de l'ECG retrouvées dans l'IC sont nombreuses (allongement du QRS, désynchronisations...) et traduisent une hypertrophie ventriculaire ou auriculaire (Thomas et al., 2002).

3.3.2.3. L'échocardiographie

Une échocardiographie standard doit être effectuée pour chaque patient dès qu'il y a une suspicion d'IC. L'échocardiographie permet de confirmer le diagnostic de l'IC en donnant une preuve objective d'une dysfonction cardiaque, structurelle et/ou fonctionnelle. En effet, l'échocardiographie permet de donner des informations sur l'anatomie cardiaque mais renseigne aussi sur le fonctionnement ventriculaire (systolique et diastolique).

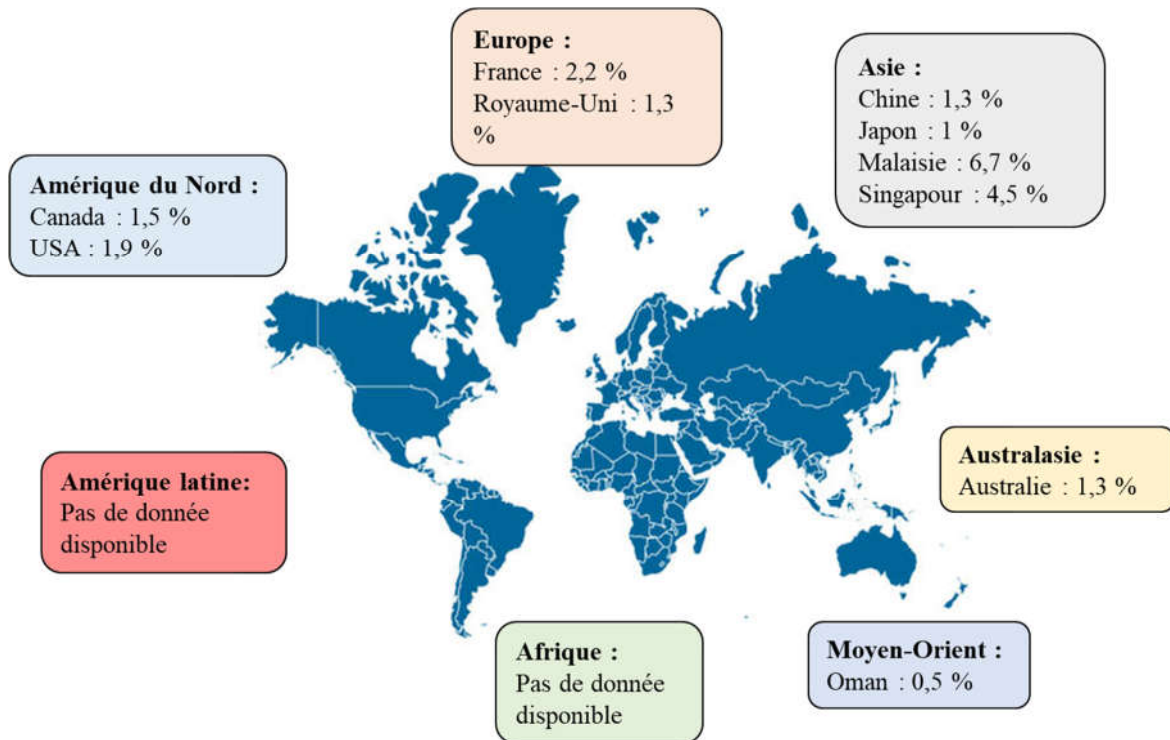


Figure 10 : Proportion de la population présentant une IC dans différents des pays

Adapté de Ponikowski *et al.*, 2014 (Ponikowski et al., 2014). IC : insuffisance cardiaque.

3.4. Epidémiologie et étiologie de l'insuffisance cardiaque

3.4.1. Epidémiologie

Dans de nombreux pays, 1 à 2 % de la population est concernée par l'IC (Bui et al., 2011; Vos et al., 2012). Les données françaises sont identiques avec plus d'1,5 millions de personnes souffrant d'IC, soit 2,2 % de la population (De Peretti et al., 2014) (Figure 10). La prévalence augmente de façon marquée avec l'âge et dépasse les 15 % pour les personnes âgées de plus de 85 ans. Avec plus de 160 000 hospitalisations par an en France, l'IC a un fort impact économique. L'IC est la première cause d'hospitalisation pour les personnes de plus de 60 ans, et est la première cause de mortalité chez les femmes (Wilkins et al., 2017). Les études épidémiologiques prévoient une augmentation de 46 % de la prévalence de l'IC aux Etats-Unis entre 2010 et 2030 (Heidenreich et al., 2011; Mozaffarian Dariush et al., 2016).

Tableau 5 : Différentes étiologies de l'IC

Causes de l'IC		
Hypertension artérielle		
Cardiomyopathie primaire	Génétique	Hypertrophique Arythmogène Mitochondriale Défauts des canaux ioniques
	Acquise	Arythmies : - Tachycardie induite - Bradycardie Stress : - Tako-Tsubo Dommages toxiques : - Abus de drogues (alcool, cocaïne...) - Médicaments (ex : anthracyclines) - Radiation - Métaux lourds (fer, cobalt...) Défauts immunologiques ou inflammatoires : - Infection (maladie de Chagas, HIV...) - Non relié à une infection (maladie aux cellules géantes, maladies rhumatismales...)
Cardiomyopathie secondaire	Infiltrations	Amyloïde Sarcoïdoses Maladies de stockage : - Hémochromatose - Maladie de Fabry - Métastatique
	Désordres métaboliques	Hormonal : - Maladie de la thyroïde - Déficience en hormone de croissance Nutritionnel : - Déficience en L-carnitine - Anémie - Obésité - Diabète
Défauts structurels myocardique et valvulaire	Acquis	Maladies des valves pulmonaire, tricuspide, mitrale et aortique
	Congénitaux	Défauts des oreillettes ou du septum ventriculaire
Maladies péricardiques	Péricardique	Effusion péricardique ou péricardite constrictive
	Endo-myocardique	Fibrose endo-myocardique ou endocardique
Maladies ischémiques	Coronarienne	Maladie coronarienne Dissection coronarienne Embolie coronarienne
	Cardiaque	Cicatrice myocardique Hibernation myocardique

Adapté de Ponikowski *et al.*, 2016 (Ponikowski *et al.*, 2016a). IC : insuffisance cardiaque.

3.4.1. Etiologie

Comme évoqué précédemment, l'identification de l'étiologie est importante pour choisir la meilleure solution thérapeutique. Les patients peuvent avoir plusieurs pathologies cardiaques ou non-cardiaques expliquant le développement de l'IC sur le long terme. L'IC résulte le plus souvent de pathologies cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde, l'hypertension artérielle (HTA) ou d'autres étiologies cardiaques (Tableau 5) (Baldasseroni et al., 2002; Hawkins et al., 2009; McMurray and Pfeffer, 2005).

3.5. Les différentes terminologies de l'insuffisance cardiaque

Il existe plusieurs types d'IC qui se caractérisent par différentes formes cliniques.

3.5.1. Insuffisance cardiaque aiguë

L'IC aiguë se caractérise par l'apparition brutale de signes ou de symptômes caractéristiques. C'est une situation d'exacerbation ou de décompensation caractérisée par une congestion pulmonaire aiguë associée le plus souvent à des œdèmes pulmonaires ou périphériques ainsi qu'une hypoperfusion des organes. Il s'agit souvent d'une situation d'urgence qui nécessite une hospitalisation et un traitement visant à gérer la surcharge liquidienne et les troubles hémodynamiques (Gheorghiade et al., 2005; Nieminen et al., 2005). Il existe deux types d'IC aiguë.

3.5.1.1. Insuffisance cardiaque aiguë de novo

Les patients présentent pour la première fois des symptômes et des signes de l'IC. Dans ce cas précis, l'IC se produit lorsqu'il y a une augmentation soudaine des pressions de remplissages cardiaques et/ou lors d'un dysfonctionnement myocardique aigu entraînant une diminution de la perfusion et un œdème pulmonaire. Dans la majorité des cas, ce type d'IC fait suite à un infarctus du myocarde, à une insuffisance mitrale aiguë par rupture de cordage ou à une insuffisance aortique aiguë dans le cas d'une endocardite infectieuse (Gheorghiade et al., 2005; Kurmani and Squire, 2017).

3.5.1.2. Insuffisance cardiaque aiguë décompensée

Les patients ayant une cardiomyopathie préexistante peuvent décompenser avec l'apparition brutale de signes et de symptômes de l'IC. La décompensation se produit lorsque les mécanismes compensatoires ne sont plus suffisants pour maintenir une fonction cardiaque stable n'entraînant pas de surcharge liquidienne. Dans ce cas, les patients présentent des signes et des symptômes de congestion et de rétention d'eau caractérisés par une prise de poids, une dyspnée d'effort ou une orthopnée. Les cardiomyopathies majoritairement à l'origine de l'IC aiguë décompensée sont les FA, les cardiopathies valvulaires et les cardiopathies dilatées (Gheorghiade et al., 2005; Kurmani and Squire, 2017).

3.5.2. **Insuffisance cardiaque chronique**

L'IC chronique est la forme la plus courante d'IC. Aussi appelé IC congestive ou simplement IC, on peut associer la définition de l'IC chronique à celle de l'IC aiguë décompensée à la différence qu'elle apparaît progressivement au cours du temps, étant une complication à long terme d'un problème cardiaque, respiratoire ou vasculaire. Au début de la pathologie, les patients sont asymptomatiques au repos mais présentent une dyspnée à l'effort. Sur le long terme, la pathologie s'aggrave et les patients présentent des symptômes au repos. L'IC chronique est aussi ponctuée par des phases d'exacerbations entraînant un épisode aigu de décompensation (Crouch, 2005).

Il existe trois classifications de l'IC chronique qui ont été définies par les sociétés savantes ci-dessous, et selon le type de dysfonction ventriculaire (systolique ou diastolique) (Aurigemma and Gaasch, 2004) :

- *New York Heart Association* (NYHA) (Rossi, 1967),
- *American College of Cardiology* (ACC)/*American Heart Association* (AHA) (ACC/AHA) (Hunt et al., 2001).

3.5.3. **Classifications NYHA et ACC/AHA**

Les classifications publiées par la NYHA et l'ACC/AHA sont des systèmes permettant une hiérarchisation fonctionnelle de l'IC et donc une stratification des patients en fonction du stade de leur IC.

Publié pour la première fois en 1964, le système NYHA place les patients dans l'un des quatre groupes définis en fonction de la gravité des symptômes et des limitations de l'activité physique (Rossi, 1967). En 2001, l'ACC, conjointement à l'AHA, a proposé un système de classification alternatif pour les patients souffrants d'IC chronique (Hunt et al., 2001).

Tableau 6 : Classification clinique de la sévérité de l'IC

Classification fonctionnelle de la NYHA		Stades de l'IC selon l'ACC/AHA	
Description	Classes	Stades	Description
Activité physique non limitée : l'activité physique n'induit pas de fatigue, de dyspnée ou de palpitations	I 	A	Haut risque pour une IC : absence de symptômes, de signes et d'anomalies structurelles
		B	IC asymptomatique associée à des anomalies structurelles cardiaques
Limitation physique légère sans symptômes au repos. L'activité induit une fatigue, des palpitations ou une dyspnée.	II	C	IC symptomatique associée à des anomalies structurelles cardiaques
Limitation marquée de l'activité physique sans symptôme au repos. L'activité induit une fatigue, des palpitations ou une dyspnée.	III		
Incapacité d'avoir une activité physique sans inconfort. Symptômes de l'IC présents au repos	IV 	D 	Anomalies structurelles avancées symptomatiques au repos malgré des traitements médicamenteux optimaux

La classification fonctionnelle de l'insuffisance cardiaque (IC) selon la *New York Heart Association* (NYHA) d'après Rossi, 1967 (Rossi, 1967). La classification des stades de l'insuffisance cardiaque (IC) selon l'*American College of Cardiology* (ACC) – *American Heart Association* (AHA) d'après Hunt *et al.*, 2001 (Hunt *et al.*, 2001).

Les deux classifications (Tableau 6) sont totalement différentes. Celle de la NYHA permet d'évaluer l'impact fonctionnel de l'IC sur le patient alors que la classification ACC/AHA permet d'évaluer le stade de l'IC ; elles sont donc complémentaires. Selon la stratification NYHA, la situation clinique du patient peut évoluer positivement ou négativement au cours du temps. Elle permet d'évaluer l'incapacité fonctionnelle des patients en fonction du degré des symptômes, c'est-à-dire l'évaluation de la dyspnée ou de la fatigue en fonction des activités quotidiennes. L'évolution des symptômes chez un même patient est donc mesurable au cours du temps. Les symptômes peuvent s'aggraver ou régresser au cours de l'IC. Avec cette classification un patient peut donc par exemple passer d'une classe III sans traitement à une classe II avec traitement.

La classification de l'ACC/AHA se base sur la détection de l'IC avec l'association des symptômes, des signes cliniques mais aussi des anomalies structurelles et fonctionnelles cardiaques. Les anomalies structurelles n'étant pas réversibles les patients peuvent passer d'un stade A à B ou C ou D mais ne peuvent revenir à un stade inférieur.

3.5.4. Classification en fonction de la fraction d'éjection

C'est en 1971, avec l'étude Framingham, qu'une description de l'IC chronique est donnée avec la distinction de la dysfonction diastolique et de la dysfonction systolique (McKee et al., 1971). Cette classification sous-tend la compréhension de l'étiologie sous-jacente de l'IC afin de déterminer le traitement le plus adapté (Brutsaert and De Keulenaer, 2006; Crouch, 2005; Gaasch and Zile, 2004).

La principale méthode de différenciation entre les dysfonctions diastoliques ou systoliques du cœur consiste à déterminer la valeur de fraction d'éjection (FE) du VG. La FE est le pourcentage de sang éjecté du VG à chaque cycle cardiaque et représente un indicateur de la fonction systolique du cœur (European Study Group on Diastolic Heart Failure, 1998). Différentes techniques permettent l'évaluation de la FE comme l'échocardiographie, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) cardiaque ou la ventriculographie gauche. La plupart des IC systoliques s'accompagnent d'une altération diastolique au repos (Redfield et al., 2003). C'est pour cette raison que depuis 2008, la terminologie IC diastolique/IC systolique a été remplacée par une terminologie se basant sur la valeur de la FE (Dickstein et al., 2008).

Tableau 7 : Définition de l'ICF_{Er}, de l'ICF_{Em} et de l'ICF_{Ep}

	ICF_{Er}	ICF_{Em}	ICF_{Ep}
Critères	Symptômes + signes cliniques	Symptômes + signes cliniques	Symptômes + signes cliniques
	FE < 40 %	FE entre 40 et 49 %	FE > 50 %
		-Augmentation des peptides natriurétiques -Anomalies structurelles cardiaques ou dysfonction diastolique	-Augmentation des peptides natriurétiques -Anomalies structurelles cardiaques ou dysfonction diastolique

Adapté de Ponikowski et *al.*, 2016 (Ponikowski et al., 2016a). IC : insuffisance cardiaque ; ICF_{Er} : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite ; ICF_{Em} : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection « *mid-range* » ; ICF_{Ep} : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée ; FE : fraction d'éjection.

En 2003, il était admis que dans le cas d'une FE inférieure à 40 % on parlait d'une IC systolique et pour une FE supérieure à 50 % on parlait d'une IC diastolique (Cleland et al., 2003). Au fil des années, il y a eu de nombreuses variations dans les valeurs limites de la FE. Les études *Organized Program To Initiate lifesaving treatMent In hospitaliZed patiEnts with Heart Failure* (OPTIMIZE-HF) et *Acute Decompensated HEart failure REgistry* (ADHERE) ont exploré les caractéristiques, les schémas thérapeutiques et les résultats obtenus sur les patients présentant différentes valeurs de FE à l'initiation des traitements. Les résultats de ces études mettent en évidence des distinctions importantes sur l'efficacité des traitements et sur les types de comorbidités par exemple, en fonction de la valeur de la FE (Fonarow et al., 2007; Sweitzer et al., 2008).

Depuis 2016, il existe donc trois catégories d'IC ayant des critères diagnostiques précis liés à l'étiologie, aux traitements préconisés et aux pronostiques variés (Tableau 7) (Ponikowski et al., 2016a) :

- l'IC à FE réduite (ICF_{Er}), avec une FE inférieure à 40 % traduisant une altération de la fonction contractile,
- l'IC à FE « *mid-range* » (ICF_{Em}), avec une FE comprise entre 40 et 49 %,
- l'IC à FE préservée (ICF_{Ep}), avec une FE supérieure à 50 % traduisant une altération de la fonction de relaxation et de remplissage au cours de la diastole.

L'incidence relative des trois sous-groupes d'IC a évolué au cours des dernières décennies dans le monde. L'incidence de l'ICF_{Er} a diminué, et une augmentation de la ICF_{Ep} est observée. Selon une analyse récente, qui découle de l'étude clinique de Framingham, l'IC nouvellement diagnostiquée se répartit comme suit : 56,2 % d'ICF_{Ep}, 31,1 % d'ICF_{Er} et 12,8 % de ICF_{Em} (Vasan et al., 2018).

De Keulenaer et Brutsaert ont proposé un nouveau concept suggérant que l'ICFEp et l'ICFER pourraient être l'expression des mêmes mécanismes physiopathologiques évoluant d'une étape à l'autre (De Keulenaer and Brutsaert, 2007). L'un des arguments allant en faveur d'un tel continuum est la continuité du remodelage du VG d'un type d'hypertrophie concentrique, observé dans l'ICFEp, à un type excentrique, majoritairement observé dans l'ICFER. L'ICFEp n'est pas uniquement caractérisée par une dysfonction diastolique. En effet, dans la majorité des cas, après un examen plus approfondi de la fonction contractile du ventricule gauche, une diminution de la contractilité est observée, ce qui signifie que la fonction systolique est également affectée. En outre, les changements myocardiques à l'examen histologique sont très similaires, avec une hypertrophie des cardiomyocytes et une fibrose interstitielle. Néanmoins, ce concept reste très controversé par d'autres auteurs qui distinguent clairement l'ICFEp de l'ICFER (Borlaug Barry A. and Redfield Margaret M., 2011). Le fait que les patients souffrants d'ICFEp ne répondent pas positivement aux traitements donnés aux patients souffrants d'ICFER est l'un des arguments en faveur d'une physiopathologie différente entre l'ICFER et l'ICFEp (Schiattarella Gabriele G. et al., 2020).

Le travail de cette thèse portant uniquement sur l'ICFEp, le concept utilisant la distinction entre les trois types d'IC a été utilisé.

3.5.5. Insuffisance cardiaque droite ou gauche

Les termes IC droite et gauche sont employés en fonction de la prédominance des symptômes congestifs qui sont soit systémique (IC droite) soit pulmonaire (IC gauche). Lors d'une IC gauche, on observe une dyspnée ou un œdème aigu pulmonaire. A l'inverse, lors d'une IC droite, le symptôme principal est une hépatalgie d'effort ou spontanée. Cette terminologie peut être utilisée dans le cas d'une IC aiguë ou chronique. Elle n'est par contre peu utile pour déterminer le traitement ou l'étiologie de l'IC associée (Crouch, 2005).

La suite du manuscrit traitera uniquement de l'IC gauche.

3.6. Les caractéristiques de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite

Comme décrit précédemment, l'ICFEr se caractérise par l'apparition de signes et de symptômes de l'IC associés à des anomalies structurelles cardiaques entraînant une diminution de la FE. La coronaropathie est l'étiologie principale avec environ deux tiers des cas d'ICFEr (McMurray et al., 2012), et le facteur de risque le plus important pour le développement de l'ICFEr est l'HTA (Levy et al., 1996). Dans l'ICFEr, le myocarde ventriculaire ne peut plus se contracter avec une force suffisante pour pomper le sang de manière adéquate. Au niveau cellulaire et moléculaire, il est décrit des altérations des protéines contractiles cardiaques au niveau des myofibrilles et du cytosquelette. Il est aussi décrit des altérations au niveau des protéines impliquées dans le cycle du Ca^{2+} ou dans le métabolisme cardiaque. Toutes ces modifications entraînent des mécanismes de compensation et un remodelage cardiaque avec l'apparition d'une hypertrophie et d'une dilatation cardiaque (Kalogeropoulos et al., 2016). Les avancées sur la compréhension de l'ICFEr ces dernières années ont permis d'améliorer la PEC des patients et leur espérance de vie (Anker et al., 2014; Thompson et al., 2016). Malgré les avancées thérapeutiques, une grande majorité des patients sont mal diagnostiqués et présentent un fort risque de mortalité (supérieure à 50 % à 5 ans). L'objectif est donc de continuer à enrichir la palette d'outils thérapeutiques associés (Anwar et al., 2015; Bloom et al., 2017; Ponikowski et al., 2014).

3.7. Les caractéristiques de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection
« mid-range »

Selon des études récentes, le pourcentage de la population IC qui entre dans la catégorie ICFEm se situe entre 13 % et 24 % (Coles et al., 2015; Kapoor et al., 2016; Tsuji et al., 2017) ce qui suggère qu'environ 1,6 million de personnes aux États-Unis ont une ICFEm.

Le critère diagnostique principal de l'ICFEm est la valeur de FE qui doit être comprise entre 40 et 49 %. Les caractéristiques cliniques des patients ne sont pas précises car beaucoup de patients souffrants d'ICFEm ont été inclus dans les études cliniques des patients ICFEp ou alors exclus. Les résultats des études OPTIMIZE-HF et ADHERE démontrent que les patients ICFEm se rapprochent plus des caractéristiques des patients souffrants d'ICFep (Fonarow et al., 2007; Sweitzer et al., 2008). Les caractéristiques communes de l'ICFep et de l'ICFEm sont l'âge avancé, le sexe féminin, les comorbidités comme l'HTA, la bronchopneumopathie chronique obstructive et le diabète. L'une des seules caractéristiques partagées par l'ICFEm et de l'ICFep est la forte prévalence des maladies coronariennes associées à l'IC (Cheng et al., 2014). La physiopathologie de l'ICFEm reste peu étudiée. Des altérations des fonctions systoliques et diastoliques sont retrouvées chez ces patients atteints d'ICFEm.

Dans la suite du manuscrit, une attention particulière sera portée à l'ICFep pour laquelle il n'existe pas, à ce jour, de thérapie efficace malgré les nombreuses études cliniques déjà réalisées. Elle fait l'objet d'un effort de recherche (fondamentale et clinique) considérable, et mon travail de thèse vise à contribuer à l'amélioration de ces connaissances.

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

4.1. Définition

L'ICFEp se caractérise par la présence de symptômes et de signes typiques de l'IC, d'une FE ventriculaire gauche dite normale et la présence d'une dysfonction diastolique associée ou non à la présence d'une altération structurelle (McMurray et al., 2012; Ponikowski et al., 2016a).

4.2. Diagnostic

Le plus souvent en clinique, les patients présentent une FE dite normale avec une dyspnée importante mais sans signe évident de surcharge de fluide. Il faut donc associer la dyspnée et la valeur de la FE avec d'autres paramètres pour affiner le diagnostic de l'ICFEp. En 2007, une publication consensus de l'*Heart Failure Association* (HFA) et de l'ESC a posé les bases des critères diagnostiques de l'IC (Paulus et al., 2007).

C'est en 2016 que l'ESC a publié ces recommandations concernant la PEC des patients souffrants d'ICFEp (Ponikowski et al., 2016a) :

- une FE normale ≥ 50 %,
- une augmentation des peptides natriurétiques avec le BNP > 35 pg/mL et/ou le NT-pro-BNP > 125 pg/mL,
- la présence d'altération de la fonction diastolique ou de la structure cardiaque,
- en cas de doute sur le diagnostic, un test de stress diastolique ou une mesure invasive de l'élévation des pressions de remplissage du VG peuvent être nécessaires.

De nouvelles recommandations ont été ajoutées avec notamment en 2018 la publication du score H₂FPEP (Reddy et al., 2018).

Tableau 8 : Description du score H₂FPEP

	VARIABLE CLINIQUE	VALEUR	SCORE
H₂	Poids corporel	IMC > 30 Kg/m ²	2
	Hypertension	≥ 2 traitements contre l'hypertension	1
F	Fibrillation atriale	Paroxysmal ou persistante	3
P	Hypertension pulmonaire	Pression systolique de l'artère pulmonaire > 35 mmHg	1
E	Age	> 60 ans	1
P	Pression de remplissage	E/e' > 9	1
	Score H₂FPEP		Somme 0-9

Adapté de Reddy *et al.*, 2018 (Reddy et al., 2018). IMC : indice de masse corporelle.

Algorithme de diagnostic HFA-PEFF

P	Bilan Initial Confirmer l'IC	• Symptômes et ou signes d'IC • Comorbidités et facteur de risque • ECG • Echocardiographie • Peptide natriurétique • Test d'effort
E	Bilan diagnostique Evaluation du score	• Echocardiographie détaillée • Peptide natriurétique si non réalisé en étape N°1
F1	Bilan avancé Confirmer le diagnostic	• Test de stress diastolique : échocardiographie de stress • Epreuves d'effort cardiopulmonaire • Mesure d'hémodynamique invasive
F2	Bilan étiologique Trouver l'étiologie spécifique de l'ICFEP	• Imagerie par résonance magnétique cardiaque • Biopsie cardiaque/extracardiaque • Scintigraphie myocardique • Tests génétiques • Analyses de laboratoire spécifiques

Figure 11 : Résumé de l'algorithme HFA-PEFF pour le diagnostic de l'ICFEP

Adapté de Pieske *et al.*, 2019 (Pieske et al., 2019). IC : insuffisance cardiaque ; ICFEP : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée ; ECG : électrocardiogramme.

4.2.1. Score H₂FPEP

Ce score, simple à calculer, utilise six critères cliniques et échocardiographiques (Tableau 8).

Ce score permet de discriminer un patient atteint d'ICFEp d'un patient souffrant d'une dyspnée de cause non cardiaque. On estime qu'à partir d'un score de six points le diagnostic de l'ICFEp est fortement probable. D'ailleurs, les résultats d'une étude récente suggèrent que la valeur de ce score pourrait être corrélée à une valeur pronostique (Sueta et al., 2019).

4.2.2. L'algorithme diagnostique HFA – PEF

L'ESC et HFA publient un consensus en 2019 sur le diagnostic de l'ICFEp avec un algorithme diagnostique HFA-PEFF (Figure 11) (Pieske et al., 2019). D'après cet algorithme, on retrouve cinq étapes clés pour le diagnostic de l'ICFEp.

La première étape est le bilan initial ou **l'étape P** (Figure 11). Ce bilan est réalisé lorsqu'un patient présente une dyspnée. L'objectif est de confirmer le diagnostic de l'IC et plus particulièrement celui de l'ICFEp. Pour confirmer le diagnostic de l'ICFEp, de nombreux tests cliniques sont réalisés lors de cette étape : ECG, examen sanguin avec l'analyse des peptides natriurétiques, échocardiographie standard. Cela permet d'exclure l'ICFEr, les maladies valvulaires et d'investiguer la présence d'ischémie, arythmie, anémie ou maladie pulmonaire.

De manière plus détaillée :

- l'ECG permet de donner une indication sur la présence d'une FA qui est fortement prédictive d'une ICFEp (Hendry et al., 2016; Reddy Yogesh N.V. et al., 2018),
- l'échocardiographie permet d'identifier précisément l'ICFEp. Si la valeur de la FE est supérieure ou égale à 50 % et que la valeur du volume télédiastolique du VG est inférieure à 97 mL/m² alors l'ICFEp est envisagée. Par exemple, la mesure de la FE permet de distinguer les patients souffrants d'ICFEr, d'ICFEm et d'ICFEp (Paulus et al., 2007),
- les analyses sanguines permettent d'avoir un état des lieux sur les fonctions rénales, hépatiques ou hormonales. De plus, il est important d'évaluer l'anémie car, associée à l'ICFEp, elle aggrave les symptômes et l'intolérance à l'effort (Kasner et al., 2013).

En ce qui concerne les peptides natriurétiques, l'augmentation du NT-proBNP et du BNP au-delà des valeurs seuils permet de confirmer l'IC (Fuat et al., 2006).

L'utilisation de biomarqueurs a pour but d'améliorer les connaissances de la physiopathologie, de diagnostiquer et stratifier les patients en fonction de la gravité et du risque de progression, et enfin d'utiliser un traitement plus personnalisé.

Dans l'ICFEp plusieurs biomarqueurs sont déjà décrits :

- l'augmentation des BNP. L'utilisation du dosage des BNP au niveau circulant est utile pour établir le diagnostic de l'ICFEp. Dans l'essai clinique *Perindopril in Elderly People with Chronic Heart Failure* (PEP-CHF), les patients dont les niveaux de NT-proBNP étaient $> 1\,035$ pg/mL avaient un risque de mortalité quatre fois plus élevé que ceux dont le taux était < 176 pg/mL (Cleland et al., 2006). A ce jour, c'est le seul biomarqueur reconnu pour diagnostiquer l'ICFEp en Europe,
- l'augmentation du procollagen type III amino-terminal peptide (PIIINP) ou du procollagen type I carboxy-terminal peptide (PICP). Ce sont des propeptides libérés lors de la synthèse du collagène. Chez les patients ICFEp on retrouve donc une augmentation de la concentration des marqueurs de synthèse des collagènes, PICP et PIIINP, au niveau circulant et cette augmentation est corrélée au degré de dysfonction diastolique (Duprez et al., 2018; Eiros et al., 2020; Ravassa et al., 2018; Trippel et al., 2018),
- l'augmentation des niveaux du *soluble Suppression of Tumorigenicity 2* (sST2). ST2 est un récepteur de la famille IL-1 qui régule l'inflammation. La forme soluble de ce récepteur (sST2) bloque la liaison de l'IL-33 au récepteur ST2, empêchant l'action anti-hypertrophique de l'IL-33 (Pascual-Figal and Januzzi, 2015). L'augmentation des niveaux de sST2 est associée à une dysfonction myocardique, à une augmentation de la fibrose et au remodelage cardiaque (Moore and Januzzi, 2010). L'augmentation du sST2 est un facteur de mauvais pronostic dans l'ICFEp (Manzano-Fernández et al., 2011; S et al., 2015).

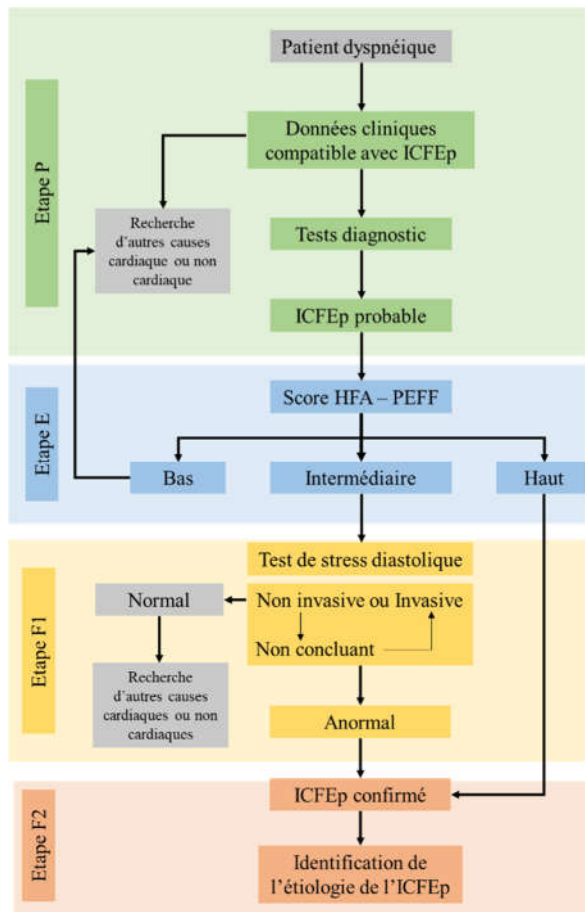


Figure 12 : Algorithme décisionnel HFA-PEFF pour le diagnostic de l'ICFEP

Adapté de Pieske *et al.*, 2019 (Pieske et al., 2019). ICFEP : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

	Fonctionnels	Morphologiques	Biomarqueurs	Biomarqueurs en cas de FA
Majeur	- e' septale < 7 cm/s ou e' latérale < 10 cm/s - $E/e' \geq 15$ - Vitesse TR $> 2,8$ m/s - PASP > 35 mmHg	- LAVI > 34 mL/m² - LVMI ≥ 149 (h) ou 122 (f) g/m² et RWT $> 0,42$	- NT-proBNP > 220 ng/L - BNP > 80 ng/L	- NT-proBNP > 660 ng/L - BNP > 240 ng/L
Mineur	- E/e' entre 9 et 14 - GLS $< 16\%$	- LAVI > 34 mL/m² - LVMI ≥ 149 (h) ou 122 (f) g/m² et RWT $> 0,42$	- NT-proBNP > 220 ng/L - BNP > 80 ng/L	- NT-proBNP > 660 ng/L - BNP > 240 ng/L

Critère Majeur : 2 points
 Critère Mineur : 1 point

Score ≥ 5 : ICFEP
 Score entre 2 et 4 : Test de stress diastolique ou mesure hémodynamique invasive

Figure 13 : Evaluation du score échocardiographique et des peptides natriurétiques

Adapté de Pieske *et al.*, 2019 (Pieske et al., 2019). E : onde E ; e' : onde e' ; E/e' : ratio de l'onde E sur l'onde e' ; GLS : *global longitudinal strain* ou contrainte longitudinale globale ; PASP : *pulmonary artery systolic pressure* ou pression systolique de l'artère pulmonaire ; TR : *tricuspid regurgitation* ou régurgitation tricuspide ; LAVI : *left atrial volume index* ou index du volume de l'oreillette gauche ; LVMI : *left ventricular mass index* ou indice de masse ventriculaire gauche ; RWT : *relative wall thickness* ou épaisseur relative de la paroi ; BNP : *brain natriuretic peptide* ou peptide natriurétique de type B ; ICFEP : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée ; FA : fibrillation atriale ; h : homme ; f : femme.

L'étape E – bilan diagnostique – permet l'évaluation du score d'échocardiographie et des peptides natriurétiques si non réalisés à la 1^e étape (Figure 12). Ce score permet de confirmer ou non le diagnostic de l'ICFEP :

- si le score est supérieur à cinq alors le diagnostic de l'ICFEP est confirmé,
- si le score est inférieur à deux alors le diagnostic de l'ICFEP est remis en cause,
- si un score intermédiaire est obtenu – entre deux et quatre – alors le diagnostic de l'ICFEP est probable. Le patient doit subir d'autres analyses pour confirmer le diagnostic.

Le score est simple, le score est augmenté de deux points si le patient présente un critère majeur et le score est augmenté d'un point si le patient présente un critère mineur (Figure 13).

La valeur seuil pour chaque critère, majeur ou mineur, a été déterminée à partir d'une cohorte de 414 patients (Reddy et al., 2018). Parmi les critères on retrouve l'onde septal e', le ratio E/e', l'index de volume de l'oreillette gauche, la masse du VG ou encore les valeurs de BNP et NT-proBNP.

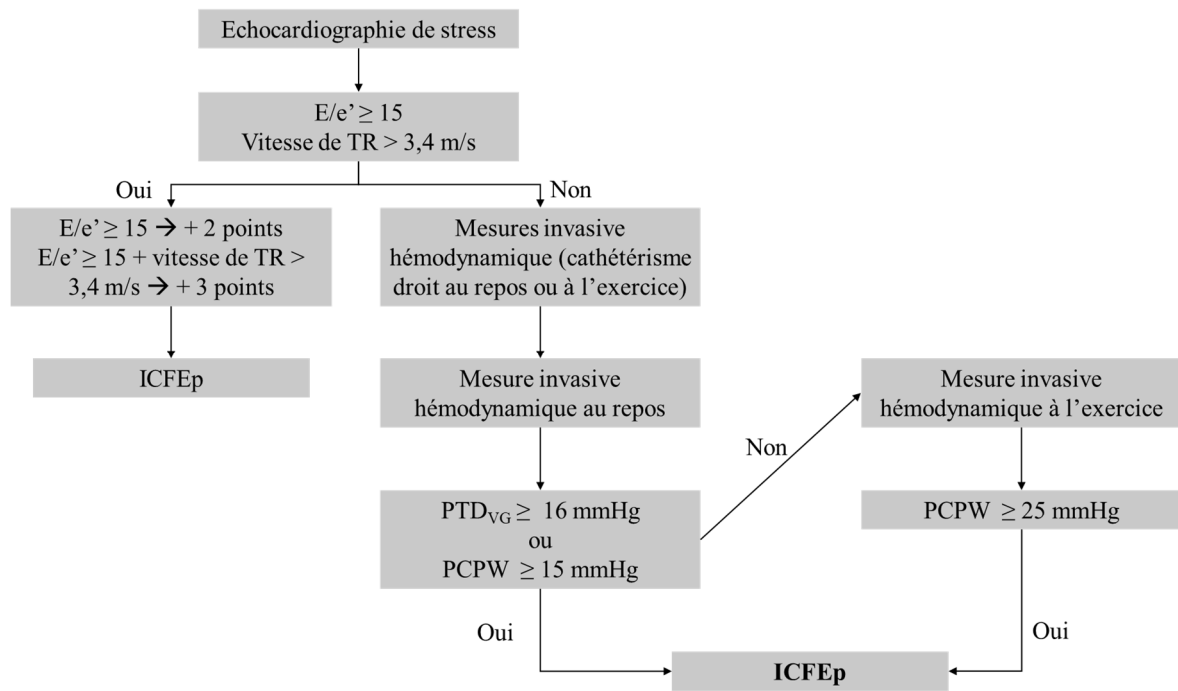


Figure 14 : Tests fonctionnels en cas de diagnostic incertain

Adapté de Pieske *et al.*, 2019 (Pieske et al., 2019). E/e' : ratio de l'onde E sur l'onde e' ; TR : *tricuspid regurgitation* ou régurgitation tricuspide ; PCPW : *pulmonary capillary wedge pressure* ou pression capillaire pulmonaire ; PTD_{VG} : pression télédiastolique du ventricule gauche ; ICFep : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

L'étape F1 est donc nécessaire pour les patients dont le diagnostic n'est pas confirmé à l'étape E (Figure 12). Généralement, les patients sont âgés et présentent de nombreuses comorbidités associées ou non à des anomalies cardiaques structurelles et/ou fonctionnelles. Afin de confirmer le diagnostic, il faut réaliser des tests invasifs. Si les résultats de ces tests montrent une augmentation de la pression de remplissage du VG avec une pression en fin de diastole ou pression télédiastolique du VG ($PTD_{VG} \geq 16$ mmHg) ou une pression capillaire pulmonaire ou *pulmonary capillary wedge pressure* (PCWP) ≥ 15 mmHg au repos, alors le diagnostic est confirmé (Figure 14).

L'étape F2 correspond à la recherche de l'étiologie associée à l'ICFEp (Figure 14). L'identification de l'étiologie permet une meilleure classification des patients et de mieux cibler les thérapies. On peut retrouver des maladies spécifiques du myocarde avec le phénotype de l'ICFEp (cardiomyopathies, myocardite, inflammation, génétique...) mais il existe aussi des étiologies plus rares comme les intoxications aux drogues (alcool, cocaïne...), aux métaux lourds ou aux radiations ainsi que les causes métaboliques (Pieske et al., 2019; Seferović et al., 2019). Généralement pour trouver l'étiologie associée, on procède à des analyses complémentaires :

- dans un premier temps un exercice de tolérance au stress pour identifier possiblement les ischémies cardiaques, l'HTA ou une altération chronotrope, c'est-à-dire un trouble rythmique. Si le patient présente une HTA alors le traitement consistera au contrôle de la pression artérielle,
- dans un second temps, si les premiers tests ne sont pas concluants alors une IRM cardiaque peut être réalisée. Cela permet de déterminer précisément les volumes des oreillettes et des ventricules ainsi que leur masse. La détermination d'une cicatrice myocardique liée à une ischémie cardiaque induite par une coronaropathie ou une dysfonction microvasculaire est également possible.

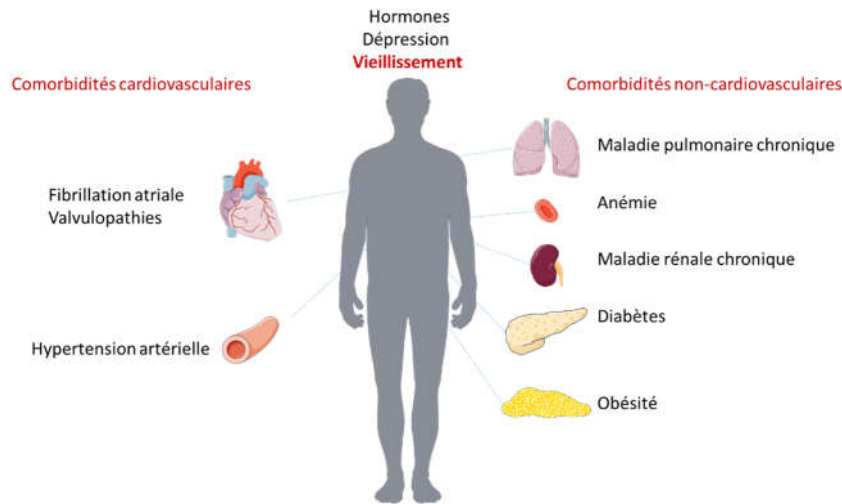


Figure 15 : Les comorbidités dans l'ICFep

Adapté de Vaduganathan *et al.*, 2017 (Vaduganathan et al., 2017). ICFep : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

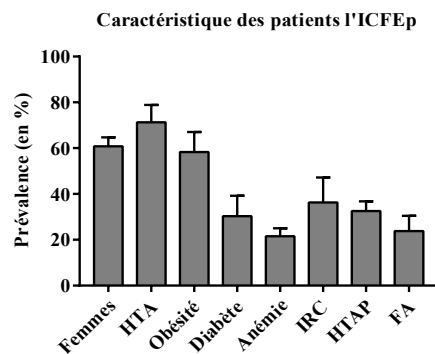


Figure 16 : Caractéristiques des patients ICFep

Adapté de Shah *et al.*, 2016 (Shah et al., 2016). HTA : hypertension artérielle ; IRC : insuffisance rénale chronique ; HTAP : hypertension artérielle pulmonaire ; FA : fibrillation atriale ; ICFep : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

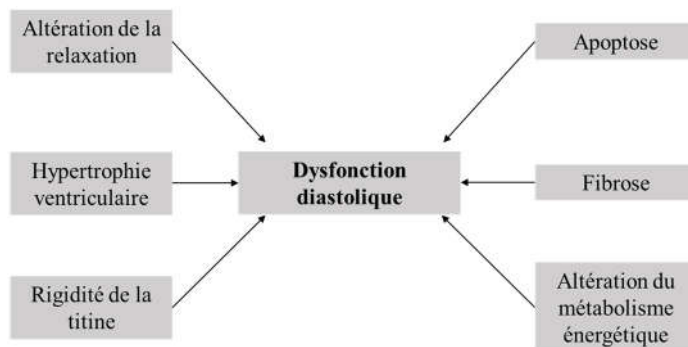


Figure 17 : Mécanismes de la dysfonction diastolique

4.3. Les comorbidités

Généralement, les patients souffrants d'ICFEP sont des patients multi-pathologiques qui présentent une ou plusieurs comorbidités. L'ICFEP est fréquemment associée à l'HTA, l'obésité, le diabète, l'anémie, la FA, la maladie pulmonaire obstructive chronique ou la maladie rénale chronique (Figure 15) (Ather et al., 2012; Chamberlain et al., 2015; Gevaert et al., 2019; Mentz et al., 2014). De plus, l'ICFEP concerne principalement les personnes âgées et les femmes.

La répartition de ces comorbidités est variable en fonction des cohortes des études, mais majoritairement on retrouve une forte prévalence de l'HTA chez les patients souffrant d'ICFEP (Dhingra et al., 2014; Shah et al., 2016) (Figure 16).

D'après l'étude de Franssen *et al.*, en 2016, les comorbidités associées à l'ICFEP joueraient un rôle dans l'établissement d'une inflammation locale et majoritairement endothéliale qui entrainerait par la suite l'activation des mécanismes physiopathologiques de l'ICFEP (Franssen et al., 2016a, 2016b) et notamment l'établissement d'une dysfonction diastolique (Figure 17).

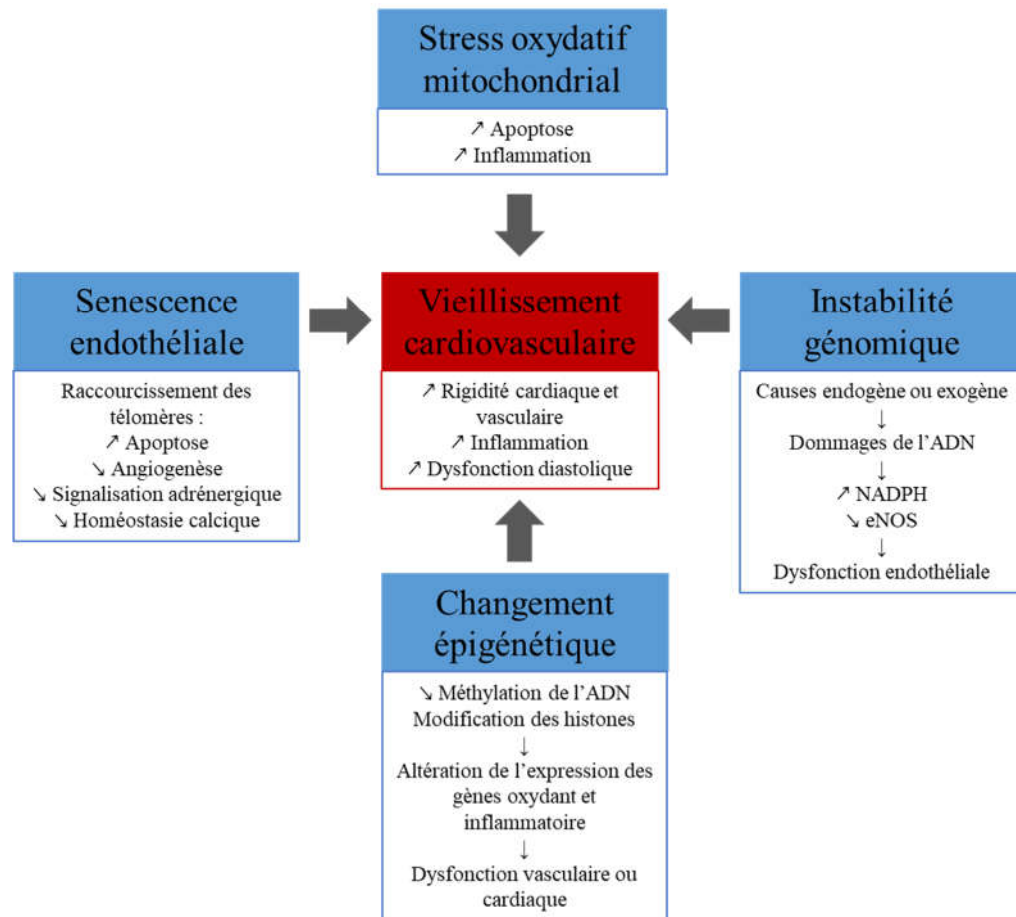


Figure 18 : Mécanismes moléculaires participant au vieillissement cardiovasculaire

D'après Paneni *et al.*, 2007 (Paneni et al., 2017). ADN : acide désoxyribonucléique ; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; eNOS : synthase endothéliale de monoxyde d'azote.

4.3.1. Le vieillissement

Le vieillissement est considéré comme un facteur de risque majeur des maladies cardiovasculaires. Comme décrit précédemment, la prévalence de l'ICFEp augmente avec l'âge (Dunlay et al., 2017). Le vieillissement induit une augmentation de la prévalence des autres comorbidités liées à l'ICFEp et influence aussi directement les mécanismes physiopathologiques de l'ICFEp. Le vieillissement est à l'origine de la sénescence cellulaire (Burton, 2009). Ce phénomène est caractérisé par une altération du cycle et de la prolifération cellulaire. Il existe deux types de sénescence : la sénescence physiologique qui permet de limiter le risque oncogénique (Bischof et al., 2009) et la sénescence pathologique induite par le stress qui accélère le développement des maladies chroniques comme l'ICFEp (Serrano and Blasco, 2001).

La sénescence cellulaire est un facteur majeur dans le déclin de la fonction cardiovasculaire liée à l'âge (Huang et al., 1998). Elle se traduit par de nombreux mécanismes comme une augmentation de l'inflammation, de l'apoptose et la diminution de l'activité de nombreuses voies de signalisation dépendante du Ca^{2+} ou du système adrénergique. La longueur des télomères est raccourcie lors de la sénescence cellulaire. Lorsque ce raccourcissement des télomères est important alors la mitose de la cellule s'arrête avec l'activation de p53 et l'augmentation de p21 qui est un inhibiteur du cycle cellulaire. Au cours de la sénescence, les cellules subissent un remodelage morphologique et fonctionnel. La cellule va alors produire et sécréter des protéines capables d'influencer l'environnement tissulaire, on parle de sécrétome associé à la sénescence (Tchkonia et al., 2013). Parmi les protéines sécrétées on retrouve des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires, des protéases de la MEC, ou des facteurs de croissance. Ce sécrétome est complexe et il accélère la progression de la sénescence cellulaire (Campisi et al., 2011; Rodier et al., 2009). Parmi les différents types de stress induisant un vieillissement pathologique on retrouve le stress oxydatif mitochondrial, la sénescence cellulaire, l'instabilité génomique et les changements épigénétiques (Figure 18) (Paneni et al., 2017).

L'augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) au niveau mitochondrial va contribuer à la sénescence cellulaire du myocarde (Camici et al., 2015). Les ROS agissent sur des régulateurs de la fonction et de la dynamique mitochondriale. L'acide désoxyribonucléique (ADN) mitochondrial (ADNmt) peut être oxydé par les ROS ce qui provoque des mutations de l'ADN, une inflammation et une augmentation de l'apoptose (Kornfeld et al., 2015). Ces mutations entraînent une altération de la fonction mitochondriale principalement au niveau du métabolisme énergétique. Ces altérations provoquent des dommages irréversibles qui ont pour conséquence une accélération du processus de sénescence. Une étude a montré que des souris portant des mutations de l'ADNmt présentent un vieillissement accéléré, une dilatation du VG, une fibrose cardiaque et une IC, le tout associé à une présence de stress oxydatif (Trifunovic et al., 2004). La dynamique mitochondriale joue un rôle important dans la sénescence cardiaque et dans la dysfonction diastolique.

L'accumulation de dommages génétiques au cours de la vie va contribuer de manière importante au vieillissement en entraînant une sénescence cellulaire et des dysfonctionnements des organes (Vijg and Suh, 2013). Les ROS vont notamment induire des mutations de l'ADN et de l'ADNmt. Ces mutations peuvent conduire à un changement d'expression de nombreuses protéines et induire des dysfonctionnements fonctionnels.

Les modifications de la chromatine, avec notamment la diminution de la méthylation de l'ADN, entraînent des modifications de l'expression génétique de certains gènes. Ces modifications épigénétiques sont impliquées dans le stress oxydant, l'inflammation, l'angiogenèse ou le métabolisme cellulaire (Costantino and Cosentino, 2015). Une étude a mis en évidence que la rigidité du VG augmente proportionnellement avec l'âge et de façon plus marquée chez les femmes (Redfield et al., 2005). Cette augmentation de la rigidité ventriculaire a pour conséquence directe une altération de la fonction cardiaque avec une perte de la compliance. Le myocarde se contracte et se relâche moins. On a donc une augmentation de la prévalence de la dysfonction diastolique au cours du vieillissement (Redfield et al., 2003). Le vieillissement entraîne aussi une rigidité artérielle et une réduction de la vasodilatation dépendante de l'endothélium (Celermajer et al., 1994; El Assar et al., 2012; Redfield et al., 2005). La sénescence cellulaire joue donc un rôle sur les mécanismes de la dysfonction diastolique.

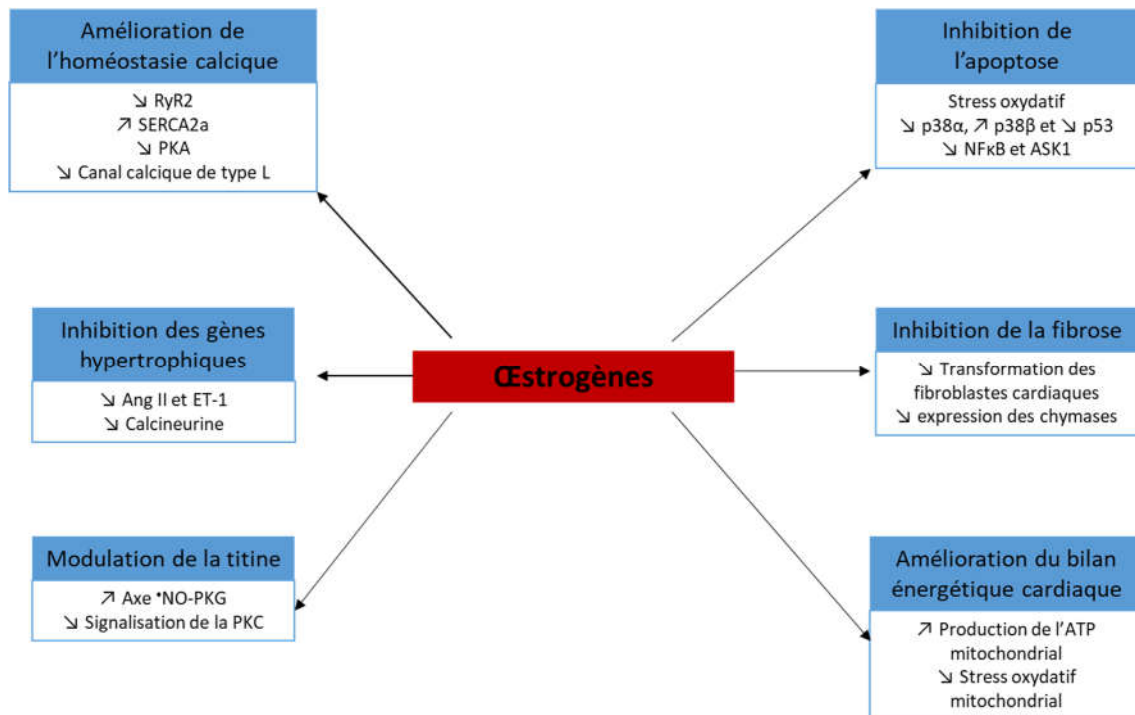


Figure 19 : Rôles des œstrogènes

D'après Maslov *et al.*, 2019 (Maslov et al., 2019) ; RyR2 : récepteur de la ryanodine de type 2 ; SERCA2a : calcium-adenosine triphosphatase de type 2a du réticulum sarco/endoplasmique ; PKA : protéine kinase A ; ang II : angiotensine II ; ET-1 : endothéline-1 ; *NO : monoxyde d'azote ; PKG : protéine kinase G ; PKC : protéine kinase C ; NFκB : facteur nucléaire κB ; ASK1 : *apoptosis signal-regulating kinase 1* ou kinase 1 régulant le signal d'apoptose ; ATP : adénosine triphosphate.

Une étude a montré qu'un modèle de souris vieillissante conduit à une dysfonction diastolique précoce. L'établissement de l'ICFEp est observé lors de l'ajout d'un régime riche en graisse et en sel, ce qui entraîne une inflammation et l'activation des différents mécanismes physiopathologiques de l'ICFEp (Gevaert et al., 2017). Dans l'ICFEp, le phénotype sécrétoire associé à la sénescence pourrait être le lien entre le vieillissement et l'inflammation endothéliale (Gevaert et al., 2017).

4.3.2. Les œstrogènes

De nombreuses études épidémiologiques ont montré que les patients atteints d'ICFEp sont majoritairement des femmes âgées (40 – 84 %) (Lam et al., 2011; Oktay et al., 2013). Les variations de pourcentage de femmes observées dans les études cliniques ou épidémiologiques sont dépendantes des études et des populations étudiées. Les femmes post-ménopausées semblent donc présenter un risque plus élevé de développer une ICFEp. L'une des hypothèses serait la diminution drastique des œstrogènes liée à la ménopause qui entrainerait le développement d'une dysfonction diastolique (Regitz-Zagrosek et al., 2010; Shah et al., 2009). Il est important de noter que le développement de l'ICFEp est majoritairement observé vers 70-80 ans. Etant donné que la ménopause arrive vers 50 ans, il semblerait que les faibles niveaux d'œstrogènes sur le long terme augmentent le risque de développer des maladies cardiovasculaires et notamment l'ICFEp.

Les œstrogènes sont décrits comme ayant une action cardioprotectrice par leurs actions sur leurs récepteurs (Figure 19) (Maslov et al., 2019). L'une des premières manifestations de la dysfonction diastolique est l'altération de la relaxation. La fonction du cardiomyocyte est liée à l'homéostasie du Ca^{2+} . Les œstrogènes modulent directement un certain nombre de molécules impliquées dans l'homéostasie du Ca^{2+} (Johnson et al., 1997).

L'hormone, l'œstrogène, régule directement l'expression de l'activité des principaux canaux ioniques cardiaques et les protéines régulatrices de l'homéostasie du Ca^{2+} : les canaux calciques de type L, RyR2, SERCA2a et la PKA. L'action des œstrogènes sur ces protéines va stabiliser les niveaux de Ca^{2+} dans la cellule et améliorer la relaxation du cardiomyocyte. En effet, on observe une réabsorption du Ca^{2+} au niveau du RS par l'activation de la protéine SERCA2a et par l'inhibition de la PKA. L'inhibition de la PKA va empêcher l'activation du récepteur RyR2 et des canaux calciques de type L (Li and Gupte, 2017).

La carence en œstrogènes dans les modèles animaux a montré une modification de l'activité des canaux calciques de type L et des récepteurs RyR2 ce qui entraîne une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire et une augmentation de l'excitabilité des cardiomyocytes (Kam et al., 2005).

L'augmentation de la rigidité myocardique qui affecte la diastole résulte de plusieurs facteurs : l'hypertrophie, la fibrose, l'apoptose et les altérations de la titine.

L'activation des récepteurs aux œstrogènes (α et β) inhibe les voies de signalisation de l'angiotensine II (ang II) et l'endotheline-1 (ET-1), deux facteurs hypertrophiques. Une autre action des œstrogènes est la diminution de la production de la calcineurine (Babiker et al., 2004; Jazbutyte et al., 2008).

Les œstrogènes et plus particulièrement l'activation du récepteur β bloque la fibrose cardiaque induite par ang II et ET-1 par l'activation de la PKA. La diminution de la production de la chymase myocardique, qui permet la conversion de l'ang I en ang II, participe à la cardioprotection (Li et al., 2015; Zhao et al., 2015).

La titine est une molécule géante du sarcomère qui détermine la tension passive du myocarde. Les œstrogènes jouent un rôle dans la modulation de la structure de la titine par la stimulation de la voie de relaxation dépendante du NO et de la PKG et par l'inhibition de la protéine kinase C (PKC). Ce sont deux actions qui vont favoriser la phosphorylation de la forme N2B de la titine qui permet la relaxation du myocarde (Krüger Martina et al., 2009).

Les œstrogènes inhibent p38 α et p53 qui sont pro-apoptotiques et activent le facteur de survie p38 β . Les mécanismes anti-apoptotiques des œstrogènes passent par l'inhibition du facteur nucléaire κ B (NF κ B) et l'inhibition de l'*apoptosis signal-regulating kinase 1* ou kinase 1 régulant le signal d'apoptose (ASK1) (Liu et al., 2011; Pelzer et al., 2001).

L'arrêt de production des œstrogènes en lien avec la ménopause entraîne une rigidité myocardique liée à l'augmentation de la fibrose, de l'hypertrophie cardiaque et de la rigidité de la titine. En plus, viennent s'ajouter des altérations au niveau du cycle du Ca²⁺, de l'apoptose et du métabolisme cardiaque. Toutes ces voies de signalisation sont impliquées dans la physiopathologie de la dysfonction diastolique, ce qui suggère que des mécanismes similaires pourraient être retrouvés dans l'ICFep.

Dans l'essai clinique *Treatment Of Preserved Cardiac function heart failure with an Aldosterone antagonist* (TOPCAT), les femmes ayant reçues le traitement, la spironolactone, présentent une amélioration de leur pronostic alors que les hommes non (Merrill et al., 2019). Il existe donc des mécanismes physiopathologiques différents entre les hommes et les femmes dans l'ICFep.

4.3.3. Hypertension artérielle

L'HTA concerne 60 à 80 % des patients souffrant d'ICFep (Dhingra et al., 2014). En pratique clinique, l'HTA se définit par une augmentation de la pression artérielle systolique (PAS) et de la pression artérielle diastolique (PAD).

D'après les recommandations Européennes publiées en 2018, les valeurs limites au-dessus desquelles on parle d'HTA sont de 140/90 mmHg (PAS/PAD) lorsqu'elle est mesurée en cabinet médical et de 135/85 mmHg (PAS/PAD) lorsqu'elle est mesurée à domicile en automesure (Williams et al., 2018). D'après les recommandations américaines, les valeurs limites sont de 130/80 mmHg (PAS/PAD) (Colantonio et al., 2018). Si l'on revient aux recommandations européennes, les valeurs limites au-dessus desquelles une PEC thérapeutique est nécessaire ne sont pas les mêmes. C'est-à-dire que lorsqu'un patient présente une pression artérielle élevée avec une PAS comprise entre 130 et 139 mmHg et une PAD comprise entre 85-89 mmHg la mise en place d'un traitement anti-hypertenseur est conseillé (Angeli et al., 2019; Williams et al., 2018).

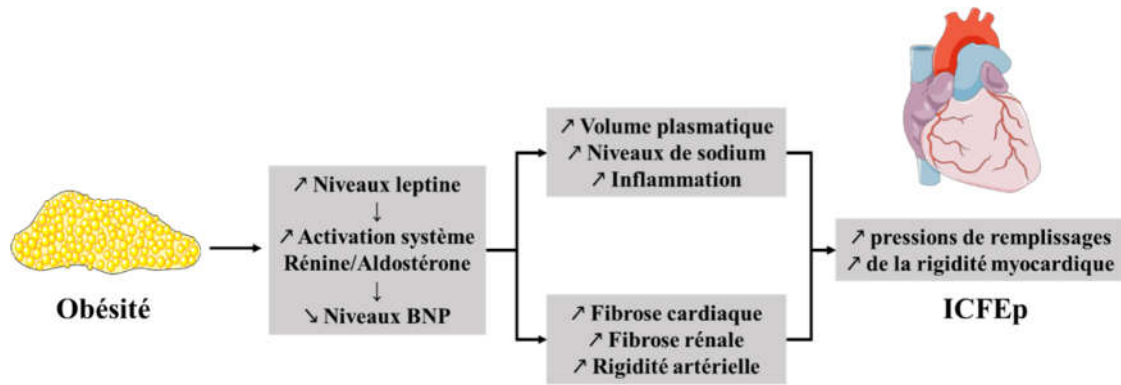


Figure 20 : Mécanismes par lesquels l'obésité peut contribuer à l'ICFep

Adapté de Pandey *et al.*, 2018 (Pandey et al., 2018). BNP : *brain natriuretic peptide* ou peptide natriurétique de type B ; ICFep : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

De manière générale l'HTA touche 30 % des adultes compris entre 18 et 74 ans, et la prévalence de cette pathologie augmente avec l'âge.

L'augmentation de la pression artérielle entraîne un accroissement de la postcharge qui va induire un remodelage morphologique et fonctionnel cardiaque, avec stimulation des voies de signalisations pro-hypertrophique et pro-fibrotique (Borlaug, 2014). L'HTA étant souvent une pathologie chronique, elle induit un remodelage vasculaire important donc une rigidité artérielle qui joue un rôle dans la physiopathologie de l'ICFEP (Redfield et al., 2005).

4.3.4. Obésité

Environ 50 % des personnes souffrants d'ICFEP sont atteintes d'obésité (Haass et al., 2011). Le diagnostic d'obésité est basé sur l'indice de masse corporelle (IMC). Lorsque cet indice est supérieur à 30 kg/m² alors le diagnostic d'obésité est confirmé.

Tout comme l'HTA, l'obésité est un facteur de risque indépendant des maladies cardiovasculaires. L'obésité peut induire la survenue d'une HTA, d'un diabète ou d'une insuffisance cardiaque.

L'obésité joue un rôle important dans l'inflammation par stimulation de la sécrétion de cytokines inflammatoires par le tissu adipeux (Berg and Scherer, 2005). Il est décrit que les patients obèses atteints d'une ICFEP présentent une augmentation du volume plasmatique qui corrèle avec l'augmentation de la pression en fin de diastole et serait donc un facteur aggravant de la dysfonction diastolique (Obokata et al., 2017) mais aussi de l'intolérance à l'effort (Carbone et al., 2016).

De plus l'obésité va induire une augmentation des niveaux de leptine, une activation du système rénine-angiotensine (Boustany et al., 2004) et une diminution des niveaux de BNP. Ces voies de signalisation vont favoriser les œdèmes périphériques induisant une augmentation des pressions de remplissage. L'augmentation de la fibrose cardiaque, rénale et artérielle va entraîner une rigidité myocardique (Abd El-Aziz et al., 2012; Hall et al., 2015) (Figure 20).

4.3.5. Le diabète

Le diabète de type 2 est retrouvé chez 45 % des patients souffrants d'ICFEP (Ather et al., 2012; Dhingra et al., 2014). Le diabète est un désordre métabolique caractérisé par une hyperglycémie, une hyper-insulinémie et une insulino-résistance. Le diabète est associé à une inflammation systémique, au stress oxydant, à une dysfonction microvasculaire et à l'hypertrophie du ventricule gauche. En l'absence de diabète, l'énergie nécessaire à la contractilité cardiaque provient du métabolisme des acides gras libres (~70 %) et du glucose (~25 %). Dans le diabète, l'utilisation du glucose par le myocarde est considérablement réduite et la production d'énergie passe par essentiellement la β -oxydation des acides gras libres (Rodrigues et al., 1998).

Cette réduction de l'utilisation du glucose dans le myocarde diabétique résulte de l'épuisement des protéines de transport du glucose, les transporteurs de glucose 1 (GLUT1) et GLUT4. En outre, les acides gras libres inhibent la pyruvate déshydrogénase, ce qui altère la production d'énergie par le myocarde et entraîne l'accumulation d'intermédiaires glycolytiques et de céramides. L'accumulation des céramides va augmenter l'apoptose (Eckel and Reinauer, 1990; Liedtke A J et al., 1988).

De plus le métabolisme des acides gras libres pour la production d'énergie sous forme d'ATP nécessite de grandes quantités d'O₂. Des intermédiaires toxiques résultant du métabolisme des acides gras libres vont se former : on parle de lipotoxicité. L'hyperglycémie va induire une augmentation de la production des produits de glycation avancée. La réaction de glycation, aussi connue sous le nom de réaction de Maillard, consiste en la fixation non-enzymatique d'oses (comme le glucose) simples ou de leurs dérivés sur les groupements aminés des protéines (Jaisson and Gillery, 2018; Tessier, 2010). Les produits avancés de glycation vont altérer l'homéostasie du Ca²⁺ ou la contractilité du myocarde (Abe et al., 2002; Malhotra and Sanghi, 1997).

Les produits de glycation avancée peuvent également se lier aux membranes des cellules cardiaques, ce qui favorise d'autant plus les signaux pro-fibrotiques et pro-inflammatoires, et augmente l'expression des médiateurs du stress oxydatif eux-mêmes. Ainsi les produits de glycation avancée favorisent le remodelage de la MEC par l'augmentation de la fibrose favorisant ainsi le stress oxydatif (Borghetti et al., 2018).

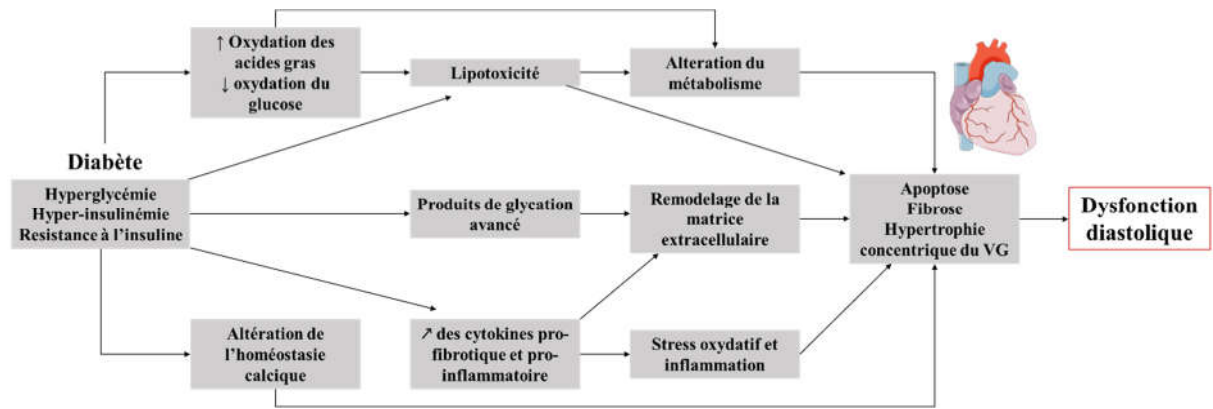


Figure 21 : Physiopathologie du diabète dans l'IC

Adapté de Borghetti *et al.*, 2018 (Borghetti et al., 2018). VG : ventricule gauche ; IC : insuffisance cardiaque.

En conséquence, le diabète conduit à une altération du métabolisme cardiaque avec une perte de la plasticité métabolique, à un remodelage structurel cardiaque et à une augmentation du stress oxydatif et de l'inflammation. Ces altérations se traduisent par une augmentation de l'apoptose, de la fibrose et une hypertrophie ventriculaire conduisant sur le long terme à la dysfonction diastolique et aussi à l'ICFEp (Figure 21).

4.3.6. L'anémie

L'anémie se caractérise par un taux d'hémoglobine inférieur à 120 g/L pour les femmes et 130 g/L pour les hommes. La carence en fer est l'une des causes majeures de l'anémie chez les patients atteints d'IC (Ather et al., 2012).

Parmi tous les patients souffrants d'IC, entre 10 et 49 % sont anémiques. La proportion de patients IC souffrants d'anémie est identique entre l'ICFEp et l'ICFEr. Les altérations hémodynamiques liées à la baisse de perfusion rénale, à la destruction des globules rouges ou à la congestion hépatique sont des conséquences de l'anémie qui peuvent conduire à des altérations de la fonction cardiaque comme l'IC (Anand, 2008). La carence en fer avec ou sans anémie entraîne des modifications de nombreuses voies de signalisation cellulaire comme le métabolisme mitochondrial ou encore la consommation énergétique des cardiomyocytes (Jankowska et al., 2013). L'anémie et la carence en fer sont des signes prédictifs de la mortalité mais les preuves de la contribution directe de l'anémie dans l'ICFEp sont rares (Okonko et al., 2011; Paulus and Tschöpe, 2013a).

4.3.7. L'insuffisance rénale chronique

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est retrouvée chez 30 à 40 % des patients souffrant d'IC (Ather et al., 2012). Les fonctions cardiaques et rénales étant étroitement liées, on parle de syndrome cardio-rénal en situation pathologique (Ronco et al., 2008). Il est difficile de savoir si l'atteinte rénale est la cause ou la conséquence de la pathologie cardiaque. La dysfonction cardiaque entraîne néanmoins une altération du fonctionnement du système rénine-angiotensine et une hypoperfusion rénale, donc sur le long terme une insuffisance rénale qui se traduit par une altération de la filtration glomérulaire et l'apparition de fibrose (Clark et al., 2014; Smith et al., 2013). La dysfonction rénale va participer au remodelage du cœur et le développement d'une dysfonction cardiaque.

4.3.8. Hypertension artérielle pulmonaire

Dans l'ICFep, l'augmentation des pressions en fin de diastole dans le VG va entraîner une augmentation de pression dans l'oreillette gauche, qui va se répercuter aussi au niveau du système vasculaire pulmonaire (Thenappan et al., 2015). La conséquence première est l'apparition d'une hypertension pulmonaire post-capillaire, c'est à dire liée à l'altération de la fonction cardiaque. Il est estimé que 53 à 83 % des patients diagnostiqués avec de l'ICFep présentent une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) (Rosenkranz et al., 2019). Comme la majorité des autres comorbidités et facteurs de risque, l'HTAP est associée à une plus forte mortalité. D'un point de vue physiopathologique, il est décrit une altération de la fonction et de la perméabilité endothéliale pouvant entraîner la formation d'œdème pulmonaire (Guazzi et al., 2015).

4.3.9. La fibrillation atriale

La FA se définit comme une activation non contrôlée des oreillettes. Ce trouble du rythme est un facteur aggravant de la dysfonction diastolique et plus particulièrement chez les patients atteints d'ICFep. Cette comorbidité est retrouvée chez 20 à 40 % des patients ICFep (Gabet et al., 2019).

L'oreillette gauche agit comme un sas entre le réseau vasculaire pulmonaire et le VG mais elle sert aussi à protéger les vaisseaux pulmonaires contre les changements de pression du ventricule gauche. Lors de la diastole 70 % du remplissage est lié au ventricule et les 30 % restants sont liés à la contraction atriale. Comme expliqué dans le paragraphe sur la dysfonction diastolique, la contraction atriale joue un rôle important dans les premières phases de la dysfonction pour maintenir un remplissage adéquat.

Le remodelage et la dysfonction de l'oreillette gauche sont secondaires à une augmentation des pressions de remplissage. L'oreillette gauche se dilate entraînant une perte de la réserve contractile de l'oreillette (Melduni and Cullen, 2012).

La dilatation devient de plus en plus importante en période de stress et en cas de FA. Le remodelage de l'oreillette gauche est un facteur prédictif du développement d'une ICFep. De plus, la dysfonction contractile de l'oreillette est associée à une augmentation de la mortalité (Habibi et al., 2014). Les mesures du volume de l'oreillette gauche sont un point important dans le diagnostic des patients (Gupta et al., 2013).

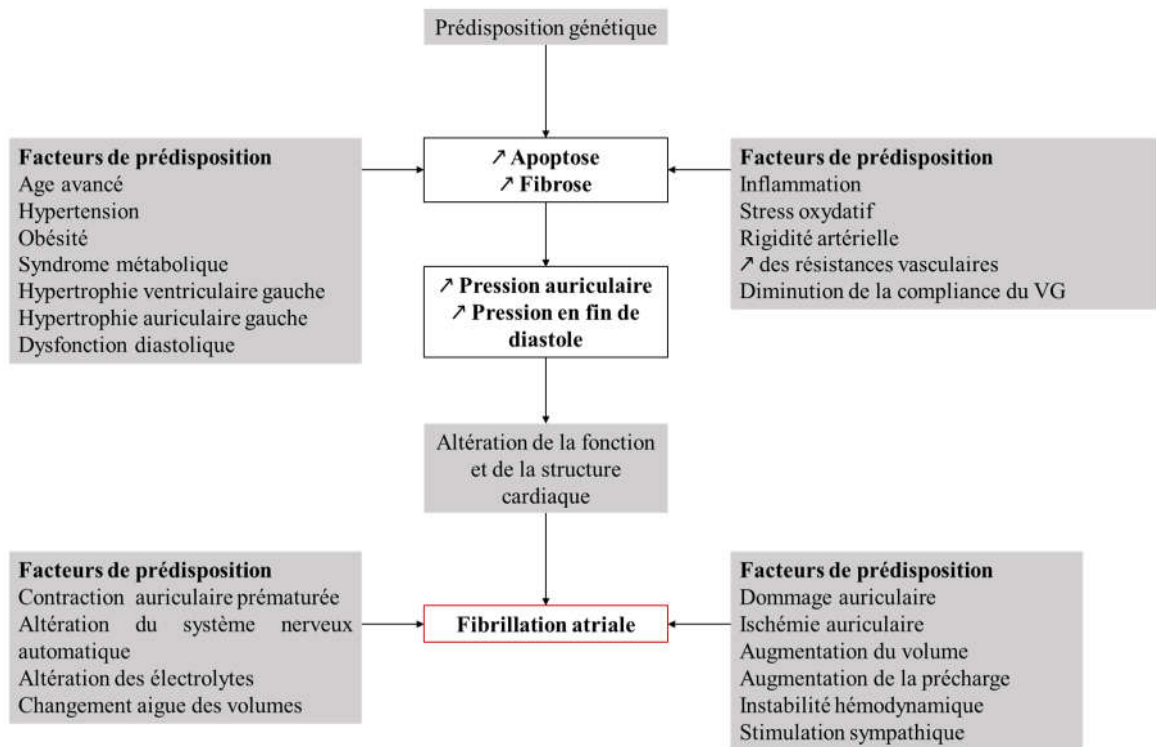
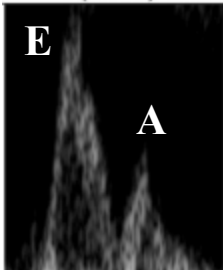
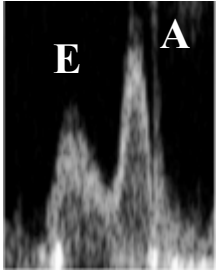
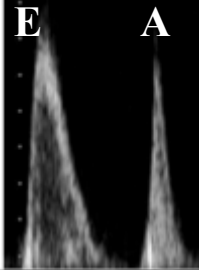
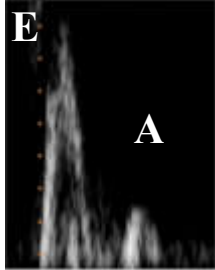
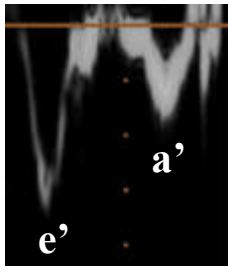
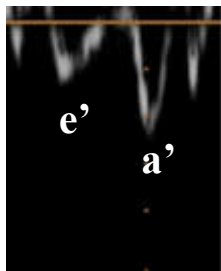
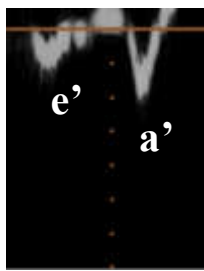


Figure 22 : La fibrillation atriale

Adapté de Melduni and Cullen, 2012. (Melduni and Cullen, 2012). VG : ventricule gauche

De nombreux facteurs peuvent être à l'origine d'une FA (Figure 22). La dysfonction diastolique est un facteur de prédisposition à la FA. La FA est elle-même un facteur aggravant de la dysfonction diastolique. Les oreillettes peuvent donc jouer un rôle important dans les mécanismes physiopathologiques mis en place dans l'ICFEp (Kotecha et al., 2016).

Tableau 9 : Classification de la dysfonction diastolique

	Normal	Altération de la relaxation (type 1)	Pseudo-normal (type 2)	Profil restrictif (type 3)
Flux mitral				
E/A	<0,8	<0,8	0,8 – 1,5	>2
TDE	160 – 240 ms	>240 ms	160 – 240 ms	<160 ms
TRIV	70 – 120 ms	>120 ms	70 – 120 ms	<70 ms
Doppler tissulaire				
E/e'	<9	<9	9 – 12	>15
Relaxation du VG	Normal	↓	↓↓	↓↓↓
Rigidité du VG	Normal	↑	↑↑	↑↑↑
Pression de remplissage	Normal	= ou ↑	↑↑	↑↑↑

Adapté de Brown *et al.*, 2012, Schober *et al.*, 2015 et Obokata *et al.*, 2020 (Brown *et al.*, 2012; Obokata *et al.*, 2020; Schober and Chetboul, 2015). VG : ventricule gauche ; TRIV : temps de relaxation isovolumique ; TDE : temps de décélération de l'onde E ; E/A : ratio de l'onde E sur l'onde A ; E/e' : ratio de l'onde E sur l'onde e'.

5. Physiopathologie de l'ICFEP

La complexité de la physiopathologie s'explique en partie par les nombreuses étiologies et comorbidités associées à l'ICFEP. Malgré ces diverses étiologies, les mécanismes physiopathologiques induisant une ICFEP semblent partager une base commune. Cette partie va s'attacher à détailler les dysfonctions fonctionnelles, les anomalies structurelles ainsi que les anomalies cellulaires et moléculaires.

5.1. Altérations fonctionnelles dans l'ICFEP

5.1.1. Dysfonction diastolique

La dysfonction diastolique se définit par une anomalie du remplissage cardiaque due à un ralentissement de la relaxation ventriculaire ou à une altération de la compliance entraînant une augmentation des pressions de remplissage. Elle est retrouvée chez une grande majorité des patients atteints d'ICFEP. Des études ont mis en évidence que la dysfonction diastolique est asymptomatique dans les premières phases de la pathologie, et devient symptomatique lors de l'aggravation de la dysfonction. En se basant sur les analyses échocardiographiques, on peut distinguer trois stades de dysfonction diastolique que l'on classifie en fonction du profil mitral analysé par doppler pulsé (Tableau 9) (Brown et al., 2012) :

- le type 1 correspond à un trouble de la relaxation. Le cœur présente une altération du remplissage caractérisée par une augmentation du remplissage actif. Cela s'observe par une onde A supérieure à l'onde E et donc par un ratio $E/A < 1$. A ce stade, les pressions de remplissage restent normales, on peut noter un début d'anomalie de la relaxation avec une valeur de TDE augmentée,
- le type 2 correspond à un profil de remplissage pseudo-normal. Le profil mitral revient à un stade « normal » ou « pseudo-normal » car l'augmentation des pressions de remplissage rétablissent le remplissage actif ventriculaire. On a donc une onde E qui est supérieure à l'onde A, et le TDE et le TRIV sont normaux,
- le type 3 correspond au profil restrictif. A ce stade le cœur présente une élévation extrême des pressions de remplissage associée à des valeurs de TRIV et de TDE très abaissées. On a donc un défaut de compliance majeure. Le VG étant très peu extensible, la contraction auriculaire est quasiment inefficace ce qui se traduit par un ratio E/A augmenté (> 2).

Anomalies de la dysfonction diastolique chez les patients ICFEp

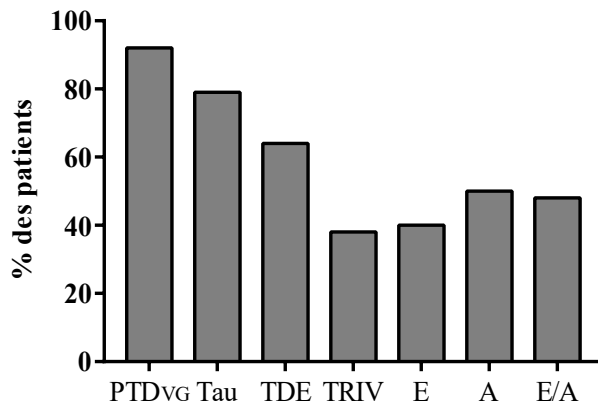


Figure 23 : Répartitions des anomalies de la dysfonction diastolique chez les patients ICFEp

Adapté de Zile *et al.*, 2001 (Zile Michael R. et al., 2001). PTD_{VG} : pression télédiastolique du ventricule gauche ; Tau : constante de relaxation ; TDE : temps de décélération de l'onde E ; TRIV : temps de relaxation isovolumique ; E/A : ratio de l'onde E sur l'onde A ; ICFEp : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

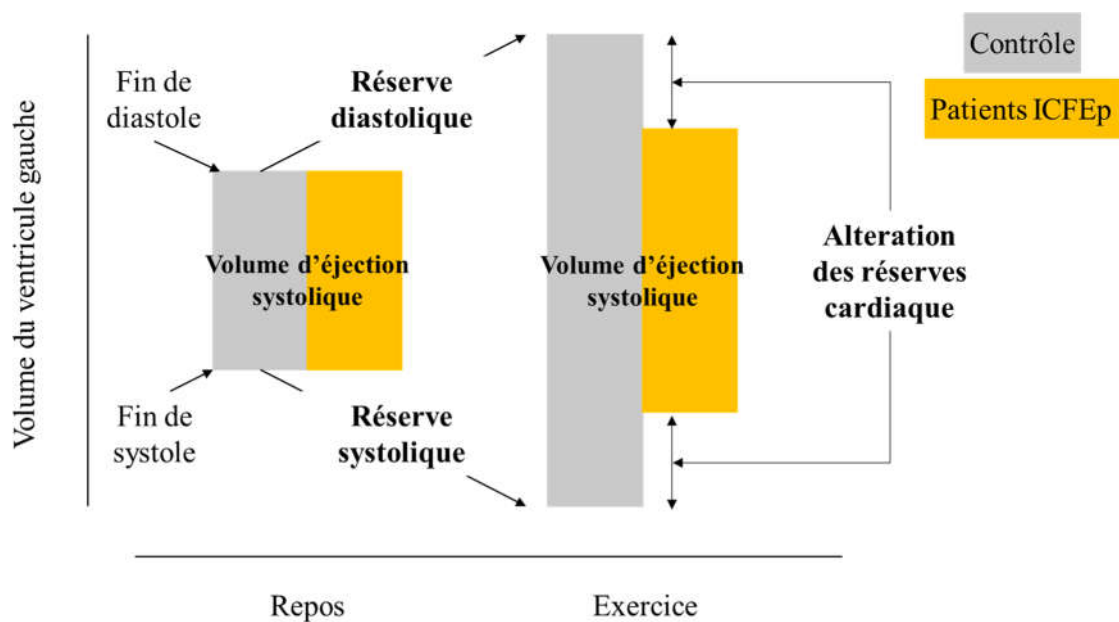


Figure 24 : Altérations des réserves cardiaques dans l'ICFEP

D'après Borlaug et Paulus, 2011 (Borlaug and Paulus, 2011). ICFEp : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

Selon une étude de Zile *et al.*, les patients souffrant d'ICFEP ont des profils divers de dysfonction diastolique (Figure 23). Cette étude, réalisée sur 63 patients, montre qu'uniquement 50 % des patients présentent une altération du ratio E/A. Majoritairement les patients ICFEP présentent une augmentation de la PTD_{VG} (92 % des patients) et une augmentation de la constante de relaxation (Tau) (79 % des patients) (Zile Michael R. et al., 2001, 2011).

5.1.2. Dysfonction systolique

Bien que la FE soit dite « préservée » au repos chez les patients souffrant d'ICFEP, il est maintenant admis que la fonction systolique du VG est altérée. L'évaluation par doppler tissulaire montre une diminution de la contractilité du myocarde en coupe longitudinale avec une diminution de l'onde s'. Il est important de noter que ces anomalies sont difficiles à détecter au repos. En condition d'exercice, les patients souffrant d'ICFEP présentent une diminution du débit cardiaque mais aussi des altérations au niveau des réserves cardiaques systolique et diastolique (Figure 24) (Borlaug and Paulus, 2011). Des études cliniques ont mis en évidence que l'altération systolique retrouvée chez les patients ICFEP est associée à une augmentation de la mortalité (Borlaug and Kass, 2009; Borlaug et al., 2009, 2016).

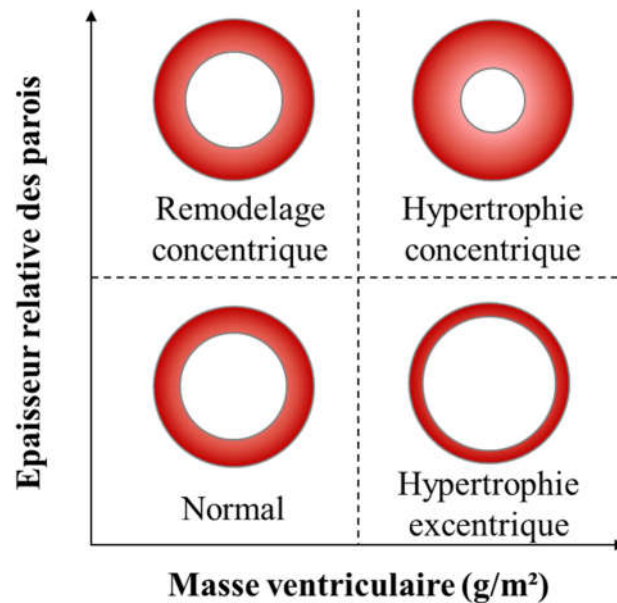


Figure 25 : Classification de la géométrie du VG

Adapté de Shah and Pfeffer, 2012. (Shah and Pfeffer, 2012). L'hypertrophie excentrique se caractérise par une augmentation de la masse ventriculaire sans changement de l'épaisseur relative des parois. A l'inverse, le remodelage concentrique se caractérise par une augmentation de l'épaisseur relative des parois sans changement de la masse ventriculaire. L'hypertrophie concentrique se caractérise par une augmentation de l'épaisseur des parois et de la masse ventriculaire. VG : ventricule gauche.

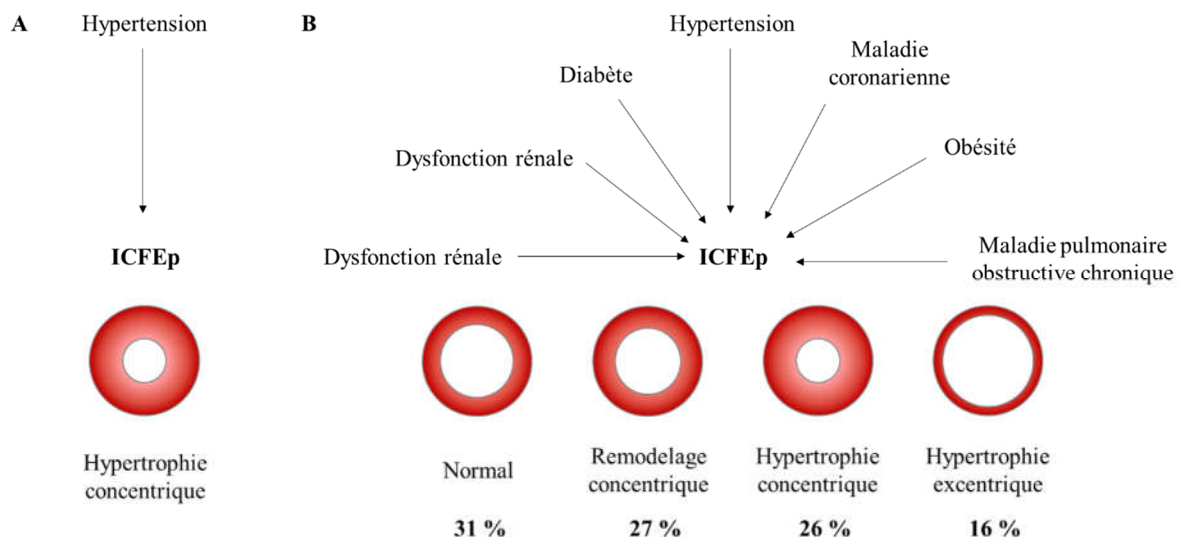


Figure 26 : Remodelage ventriculaire dans l'ICFEP

Adapté de Shah and Pfeffer, 2012 (Shah and Pfeffer, 2012). A : Théorie initiale indiquant que les patients atteints d'ICFEP présentent uniquement une hypertrophie concentrique. B : Proportion des types de remodelage observés chez les patients souffrant d'ICFEP. ICFEP : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

5.2. Altérations structurelles dans l'ICFEP

5.2.1. Hypertrophie du ventricule gauche

La géométrie du VG peut être décrite en fonction de sa masse et de l'épaisseur relative de la paroi. Il existe plusieurs types de remodelage ventriculaire (Figure 25) (Nakamura and Sadoshima, 2018) :

- le remodelage concentrique : la masse du ventricule est normale avec une épaisseur relative de la paroi qui est augmentée,
- l'hypertrophie excentrique : la masse du ventricule est augmentée avec une épaisseur relative de la paroi qui est réduite,
- l'hypertrophie concentrique : la masse du ventricule et l'épaisseur relative de la paroi sont augmentées. Ce type d'hypertrophie a pour conséquence une diminution des volumes ventriculaires ce qui entraîne des anomalies de la relaxation, du remplissage et de l'éjection du sang.

L'hypertrophie ventriculaire gauche a longtemps été considérée comme ayant un rôle central dans la genèse de la dysfonction ventriculaire gauche dans l'ICFEP. Cette hypothèse a longtemps été considérée car les premières études descriptives de l'ICFEP ont suggéré que tous les patients souffrants d'ICFEP présentaient une hypertrophie ventriculaire gauche en réponse à l'élévation de la pression artérielle systémique.

Depuis 2007, l'hypertrophie ventriculaire gauche n'est plus considérée comme ayant un rôle central dans l'ICFEP car des études ont montré que les patients souffrants d'ICFEP peuvent présenter un remodelage ventriculaire concentrique sans hypertrophie ou une géométrie normale du ventricule gauche (Lam Carolyn S.P. et al., 2007). La dysfonction diastolique n'est pas liée à la présence ou à la sévérité de l'hypertrophie (Figure 26).

5.2.2. **Fibrose cardiaque**

Dans l'ICFEP, une fibrose est observée. Par définition, la fibrose est un dépôt excessif de MEC, notamment les collagènes de type I et III. Ces dépôts s'accumulent de manière diffuse au niveau de l'espace interstitiel (Collier et al., 2012; Mohammed et al., 2015; Zile et al., 2015). La formation des dépôts fibreux est expliquée par un déséquilibre de la balance entre la production et la dégradation du collagène.

La gélatinase A ou la métalloprotéinase matricielle-2 (MMP-2) et l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases de type 1 (TIMP-1) sont des enzymes permettant la formation du collagène au niveau de la MEC. Dans l'ICFEP leur expression est augmentée dans le cas de fibrose (Kanagala et al., 2020; Kobusiak-Prokopowicz et al., 2018; Yim et al., 2018). A l'inverse, une diminution de l'expression de la collagénase MMP-1, qui permet la dégradation des fibres de collagène, est décrite (Franssen et al., 2016b).

En plus des dépôts de collagène, des études ont identifié des dépôts amyloïdes dans la MEC de patients atteints d'ICFEP. Les dépôts amyloïdes comme la transthyrétine, sont des éléments protéiques, insolubles, résistant à l'action des protéases et organisés en feuillets β -plissés. Du fait de leur insolubilité et de leur dégradation impossible par les protéases, les dépôts amyloïdes conduisent à une augmentation de la rigidité tissulaire myocardique (González-López et al., 2015; Mohammed et al., 2014).

D'un point de vue clinique, la fibrose et l'amyloïdose sont une cause importante de la rigidification du myocarde observée chez les patients ICFEP. Cependant, cette augmentation de la rigidité cardiaque n'est pas systématique dans le tableau clinique des patients. C'est dans les stades les plus avancés de l'ICFEP que l'on observe une augmentation de la rigidité cardiaque. La fibrose est donc un signe de sévérité aggravée mais pas forcément nécessaire pour le diagnostic.

5.2.3. Anomalies structurelles et fonctionnelles de l'oreillette gauche

L'hypertrophie de l'oreillette gauche est fréquemment retrouvée chez les patients ICFEP. L'oreillette gauche se dilate en réponse à une diminution de la compliance du VG et à une augmentation des pressions diastoliques du VG.

La dilatation de l'oreillette gauche induit une augmentation de la systole auriculaire lors du remplissage du VG par le mécanisme de Frank-Starling (Melenovsky et al., 2015). Dans les premières phases de la dysfonction diastolique et de l'ICFEP, l'augmentation du volume de l'oreillette et de sa contractilité sont des mécanismes adaptatifs pour assurer une fonction cardiaque stable. Cependant, l'augmentation compensatoire de la contractilité de l'oreillette gauche diminue au fur et à mesure de l'aggravation de la dysfonction diastolique. L'augmentation croissante de la post-charge de l'oreillette gauche provoque sa dilatation, les myofilaments s'étirent de plus en plus jusqu'à une longueur maximale à partir de laquelle l'oreillette gauche ne peut plus se contracter normalement (Payne et al., 1971).

Aux stades avancés de l'ICFEP, la fonction contractile de l'oreillette gauche est altérée et ne peut plus contribuer activement à la pré-charge du VG lors de la systole auriculaire (Pagel et al., 2003; Phan et al., 2009; Prioli et al., 1998). Le dysfonctionnement de l'oreillette gauche se produit dans les deux formes d'IC, l'ICFEP et l'ICFEP, mais cette anomalie est majoritairement observée dans l'ICFEP (Santos et al., 2014; Zakeri et al., 2016), et représente le facteur limitant lors du test de tolérance à l'exercice chez les patients (Freed Benjamin H. et al., 2016; Tan et al., 2010).

La dilatation de l'oreillette gauche est également une cause primaire de FA, qui est présente chez deux tiers des patients atteints d'ICFEp et constitue une cause majeure de morbidité (Zakeri Rosita et al., 2013). Lorsque la compliance du VG est diminuée, l'apparition d'une FA précipite souvent les signes et les symptômes d'une décompensation aiguë. La perte de contraction de l'oreillette gauche et la réduction du temps diastolique causée par la tachycardie entraînent un remplissage du VG et un débit cardiaque inadéquats (Fung et al., 2007). Les patients souffrants d'ICFEp et de FA présentent une plus grande intolérance à l'effort, une moindre qualité de vie, un taux de réadmission à l'hôpital accru et une mortalité plus élevée que les patients souffrants d'ICFEp en rythme sinusal (Zakeri Rosita et al., 2014).

5.2.4. Rigidité macro et micro vasculaire

Il existe des atteintes microvasculaires coronariennes dans le développement de l'ICFEp. Les anomalies vasculaires ne se limitent pas à la microcirculation puisqu'il est aussi décrit des altérations au niveau de la macrocirculation et plus particulièrement au niveau de l'aorte. Ces anomalies vasculaires se caractérisent par des altérations anatomiques, fonctionnelles avec une augmentation de la rigidité chez les patients souffrants d'ICFEp. L'augmentation de la rigidité vasculaire a pour conséquence une réduction de la distensibilité aortique et une diminution de la capacité d'exercice majorant la postcharge et donc le travail cardiaque (Hundley et al., 2001). L'augmentation de la vitesse de l'onde de pouls carotido-fémorale observée au repos chez ces patients est le reflet d'une augmentation de la rigidité artérielle (Desai et al., 2009). Et l'élévation de la pression artérielle centrale à l'effort est corrélée avec les pressions de remplissages ventriculaires (Reddy et al., 2017). Le couplage de la rigidité ventriculaire et artérielle conduit à une plus grande labilité de la pression artérielle.

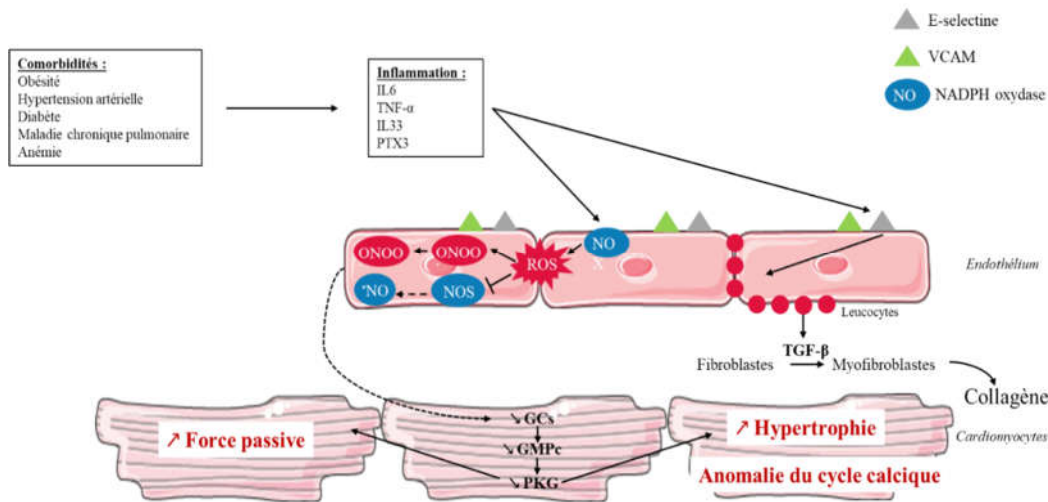


Figure 27 : Rôle des comorbidités dans les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'ICFEP

Adapté de Paulus and Tschöpe, 2013 (Paulus and Tschöpe, 2013a). Les comorbidités par l'augmentation de l'inflammation qu'elles engendrent, entraînent un remodelage cardiaque dans l'ICFEP. ICFEP : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée ; PKG : protéine kinase G ; GMPc : guanosine monophosphate cyclique ; GCs : guanylate cyclase soluble ; TGF-β : *transforming growth factor* - β ; NO : monoxyde d'azote ; NOS : synthase de monoxyde d'azote ; ONOO⁻ : peroxynitrite ; NOX : NADPH oxydase ; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; VCAM : protéine d'adhésion aux cellules vasculaires ; IL-6 : interleukine – 6 ; TNF-α : *tumor necrosis factor* α ; PTX3 : pentraxin 3.

L'augmentation de la labilité de la pression artérielle se traduit par une amplification des variations de la pression artérielle pour toute altération de la précharge ou de la postcharge. En cas de stress, l'augmentation de la pression artérielle conduit à une augmentation importante des pressions de remplissage et à une altération de la relaxation.

5.3. Anomalies cellulaires et moléculaires

L'inflammation causée par les comorbidités, serait à l'origine des dysfonctions fonctionnelles observées dans l'ICFEp. Au niveau cellulaire, de nombreuses études ont permis de démontrer qu'il existait des altérations de l'expression et/ou fonction de différentes protéines.

Dans les paragraphes qui suivent, nous allons nous intéresser aux anomalies fonctionnelles et moléculaires au niveau des cardiomyocytes, des cellules endothéliales et des fibroblastes (Figure 27).

5.3.1. Les anomalies du cytosquelette

D'une manière générale, les cardiomyocytes d'un cœur souffrant d'ICFEp, ont une force passive (F_{passive}) fortement augmentée. Cela se traduit au niveau fonctionnel par une augmentation de la rigidité ou compliance du cœur et de nombreuses protéines structurelles du sarcomère sont impliquées. Les altérations retrouvées sur ces protéines entraînent généralement une augmentation de la F_{passive} et impactent la fonction contractile.

L'augmentation de la F_{passive} , par un switch d'isoforme, ou par l'hypo-phosphorylation de la titine est à la base de l'augmentation de la rigidité du VG dans l'ICFEp (Hamdani et al., 2013; van Heerebeek et al., 2012; Zile et al., 2015).

Ainsi, l'augmentation de l'expression de l'isoforme N2BA est généralement retrouvée dans le cœur de patients en phase terminale d'ICFEr. L'augmentation de l'isoforme N2BA entraîne une diminution de la F_{passive} du cardiomyocyte. A l'inverse, dans le cas de l'ICFEp, la F_{passive} est augmentée via l'augmentation de l'isoforme N2B.

Par ailleurs, la titine a de nombreux sites de phosphorylation. Elle est phosphorylée sur le domaine N2B par la PKG, la PKA, la CaMKII et la PKC (Hamdani Nazha et al., 2013a; LeWinter and Granzier, 2013).

Une hypo-phosphorylation du domaine N2B entraîne une augmentation de la F_{passive} (Borbély et al., 2009; Hamdani Nazha et al., 2013b, 2013a; Hidalgo et al., 2009; Krüger and Linke, 2009; Krüger Martina et al., 2009; Zile et al., 2015). Des études ont démontré que l'hypo-phosphorylation de l'isoforme N2B joue un rôle important dans la physiopathologie de l'ICFEp. En effet, sur un modèle de chien souffrant d'ICFEp, l'administration *ex vivo* de PKG et de GMPc corrige le déficit de phosphorylation sur la titine et cela a pour conséquence une diminution de la F_{passive} améliorant ainsi la fonction diastolique. Des résultats similaires ont été observés avec l'administration de PKA (Bishu et al., 2011; Hamdani et al., 2013; Krüger et al., 2009).

Comme pour la titine, des modifications post-traductionnelles ont été découvertes sur d'autres protéines du sarcomère précédemment comme la troponine. Il a été montré que la phosphorylation de la troponine I par la PKG augmente la distensibilité du cardiomyocyte (Takimoto, 2012).

La MyBPC (*myosin binding protein C*) est une protéine soupçonnée de réduire la compliance myocardique. Elle se lie aux filaments épais de myosine et joue un rôle structural en facilitant l'assemblage des molécules de myosine. Elle limite aussi les interactions entre les têtes de myosine et les filaments d'actine. Une étude chez la souris a montré que l'état de phosphorylation de la MyBPC influait significativement sur la fonction diastolique. Ainsi, les auteurs ont montré qu'un déficit en phosphorylation sur des sites spécifiques de PKA provoquait un dysfonctionnement diastolique grave (Rosas et al., 2015).

5.3.2. Anomalies du cycle du calcium

Le cycle du Ca^{2+} est un déterminant essentiel de la relaxation active du cardiomyocyte. En condition pathologique, et notamment dans l'IC, le cycle du Ca^{2+} est souvent altéré ce qui entraîne des modifications de la capacité contractile du cardiomyocyte. Chez l'homme, il a été montré une augmentation de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire dans l'IC (Perreault et al., 1990).

On peut schématiquement diviser les altérations calciques en deux mécanismes.

5.3.2.1. Les anomalies de la libération du calcium

Ce point concerne principalement le fonctionnement de RyR2. Le RyR2 a été décrit comme étant hyper-phosphorylé dans l'IC, par la PKA et la CaMKII, favorisant ainsi son ouverture (Ai et al., 2005; Marx et al., 2000). Il en résulte des fuites diastoliques de Ca^{2+} (Ca^{2+} leaks), asynchrones, trop localisées pour entraîner une contraction. Ces fuites diastoliques diminuent la charge calcique du RS disponible pour la contraction suivante, diminuant ainsi l'inotropisme et provoquant une relaxation incomplète. Les fuites calciques, ainsi que la moins bonne recapture du Ca^{2+} par SERCA2a, entraînent une augmentation de la concentration calcique cytosolique en diastole. L'échangeur NCX voit son expression et son activité augmentées afin d'excréter ce surplus de Ca^{2+} . L'entrée de sodium qui en résulte entraîne une diminution de la polarisation membranaire en diastole ce qui favorise la genèse des arythmies retrouvées dans l'IC avancée (Chelu and Wehrens, 2007; Mattiello et al., 1998). Il a aussi été démontré que la diminution de la stimulation β -adrénergique, dans les cœurs âgés et atteints d'IC, se traduit par une réduction de la phosphorylation du RyR2 et du PLB par la PKA (Chu et al., 2000). Les anomalies observées sur le RyR2 sont à l'origine d'une altération de la libération du Ca^{2+} , alors que les anomalies observées sur le PLB et la PKA engendrent des altérations de la recapture du Ca^{2+} . Les anomalies calciques sont présentes au moment de la systole, lors de la libération du Ca^{2+} , mais aussi lors de la diastole, c'est-à-dire pendant la recapture du Ca^{2+} .

5.3.2.2. Les anomalies de la recapture du calcium

Des préparations de myocarde provenant de modèles *in vivo* présentant une dysfonction diastolique ont montré une diminution de la recapture du Ca^{2+} intracellulaire (Hohendanner Felix et al., 2013; Janczewski and Lakatta, 2010). Le lien entre l'altération des flux calciques et l'altération de la relaxation a été étudié dans un modèle de rats hypertendus développant une ICFep (Primessnig et al., 2016). Le défaut de recapture du Ca^{2+} entraîne une augmentation de la durée du transitoire calcique et donc un ralentissement de la relaxation.

D'autres altérations ont été mises en évidence comme la corrélation inverse de l'expression et l'activité de SERCA2a avec l'âge (Cain et al., 1998; Mercadier et al., 1990). Une étude sur un modèle de souris sénescence a mis en évidence que la diminution de l'activité de la SERCA2a n'est pas associée à une diminution de son expression mais à une accumulation de dommage oxydatif sur cette protéine (Babušíková et al., 2012). Il a été démontré que le ratio SERCA2a/PLB est quant à lui diminué dans l'IC. Le rétablissement de l'équilibre de SERCA2a/PLB par un transfert de gènes améliore la dysfonction diastolique liée à l'âge (Meyer and Dillmann, 1998; Schmidt et al., 2000).

6. Traitements dans l'ICFEP

Comme il n'existe aucun traitement spécifique et efficace pour traiter l'ICFEP, les sociétés savantes recommandent de traiter les comorbidités présentes chez les patients par :

- l'usage de β -bloquant, d'inhibiteur de l'IEC ou d'antagoniste de l'angiotensine pour la PEC de l'hypertension artérielle,
- l'utilisation de diurétique en cas d'œdème,
- en cas de signe d'ischémie cardiaque, la revascularisation coronaire est encouragée,
- la PEC du diabète.

De nombreux essais cliniques ont été menés pour trouver un traitement adapté (Henning, 2020) qui ciblent différents mécanismes :

6.1. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion

Les bénéfices des IEC dans le traitement de l'ICFEP ont été évalués dans une grande étude nommée PEP-CHF (Cleland et al., 2006). Cette étude, menée sur 207 patients pendant un an, a permis de mettre en avant que le périndopril augmente la résistance à l'effort des patients mais sans diminution de la mortalité. De façon étonnante, le périndopril *versus* placebo permettait de réduire le nombre d'hospitalisations secondaires à l'ICFEP à un an mais pas à trois ans.

6.2. Les antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II

L'ang II est l'une des principales hormones vasoactives du système rénine-angiotensine-aldostérone qui joue un rôle dans la physiopathologie de l'HTA et de l'IC. En condition physiopathologique, l'ang II induit une vasoconstriction via son action sur les récepteurs de type 1 (AT1). Dans le cas de l'HTA et l'IC, la stratégie thérapeutique consiste à diminuer la vasoconstriction et notamment en inhibant l'action de l'ang II sur les récepteurs AT1.

Les antagonistes des récepteurs à l'ang II ont principalement été étudiés lors de grands essais cliniques :

- *Candesartan in Heart failure: Assessment of Reduction in Mortality and morbidity – in patients with chronic heart failure and Preserved ventricular ejection fraction* (CHARM – Preserved) avec le candésartan (Yusuf et al., 2003). Le candésartan est sélectif des récepteurs AT1, avec une forte liaison et une dissociation lente du récepteur. Cette étude réalisée sur 3 023 patients pendant 37 mois a mis en évidence que le candésartan permet de diminuer le nombre d'hospitalisation mais ne permet pas de diminuer la mortalité,
- *Irbesartan in patients with heart failure and PRESERVED ejection fraction* (I-PRESERVE) avec l'irbesartan sur 4 563 patients pendant 24 mois (Massie et al., 2008). L'utilisation de l'irbesartan n'a pas permis d'améliorer le nombre d'hospitalisations ou la mortalité. Comme le candésartan, l'irbesartan est un antagoniste des récepteurs AT1.

6.3. Les antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II associés aux inhibiteurs à la néphrilylase

La néphrilylase est une endopeptidase neutre qui hydrolyse et inactive divers peptides, dont les peptides natriurétiques, ainsi son inhibition empêche la dégradation des peptides natriurétiques. L'effet de l'association d'un antagoniste des récepteurs AT1, le valsartan, avec un inhibiteur à la néphrilylase, le sacubitril, a été étudié dans deux études :

- l'étude *Prospective comparison of ARni with Arb on Management Of heart failUre with preserved ejectionN fracTion* (PARAMOUNT) (Solomon et al., 2012). Dans cette étude, il a été mis en évidence une diminution significative du NT-proBNP chez les patients ICFEP ayant eu le traitement associant le valsartan et le sacubitril *versus* les patients ayant eu le valsartan seul. Cette étude a été réalisée sur 301 patients pendant 9 mois,
- l'étude *Prospective comparison of ARni with Arb Global Outcomes iN HF with preserved ejection fraction* (PARAGON-HF) (Solomon et al., 2017). Cette étude de plus grande envergure, a été réalisée sur 4 300 patients pendant 57 mois. L'association de ces deux molécules sur le long terme n'a pas permis de réduire la mortalité, ni le nombre d'hospitalisation.

6.4. Les β -bloquants

Les mécanismes d'action des β -bloquants incluent le ralentissement de la fréquence cardiaque (FC) et l'augmentation du temps de remplissage diastolique. Beaucoup d'études ont évalué l'impact des β -bloquants dans l'ICFEP :

- le carvedilol a été utilisé dans l'étude *SWEdish Doppler-echocardiographIC study* (SWEDIC) (Bergström et al., 2004) sur 97 patients. Les auteurs rapportent une amélioration du ratio E/A,
- le carvedilol a aussi été utilisé dans l'étude *Japanese Diastolic Heart Failure study* (J-DHF) (Yamamoto et al., 2013) sur 245 patients. Les auteurs indiquent dans leur conclusion que le carvedilol induit une réduction de la mortalité et du nombre d'hospitalisations,
- le carvedilol a enfin été utilisé dans l'étude *Carvedilol HEart failure REgistry* (COHERE) (Massie et al., 2007) sur 4 280 patients. Cette étude démontre que le carvedilol n'a pas d'effet bénéfique sur la mortalité mais permet la réduction du nombre d'hospitalisation,
- le nebivolol a été utilisé dans l'étude *Effects of the Long-term Administration of Nebivolol on the clinical symptoms, exercise capacity, and left ventricular function of patients with Diastolic Dysfunction* (ELANDD) (Conraads et al., 2012) sur 116 patients. Cette étude a permis de démontrer une amélioration de la morbi-mortalité des patients âgés de plus de 70 ans,
- la comparaison du bisoprolol et du carvedilol a été étudiée dans l'étude *Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study in ELDerly* (CIBIS-ELD) sur 250 patients (Edelmann et al., 2016). Le bisoprolol et le carvedilol n'ont eu aucun effet sur les marqueurs établis et pronostiques de la fonction diastolique,
- la comparaison de différents β -bloquants dans l'étude d'El-Refai *et al.*, a montré que l'utilisation des β -bloquants permet de réduire la mortalité et les hospitalisations (El-Refai et al., 2013),
- le metoprolol a été utilisé dans l'étude *β -blocker in heart failure with PRESERVED left ventricular ejection fraction* (β -PRESERVE),
- différents β -bloquants ont été comparés dans l'étude OPTIMIZE-HF (Hernandez et al., 2009).

6.5. Les bloqueurs des canaux calciques

L'utilisation du verapamil a été analysée dans deux études de Setaro *et al.*, et de Hung *et al.*, (Hung et al., 2002; Setaro et al., 1990). Le verapamil a un effet positif sur la résistance à l'exercice et a également un effet bénéfique sur la fonction diastolique.

6.6. Les antagonistes du récepteur minéralocorticoïde

L'aldostérone est produite et sécrétée par l'action de l'ang II. Son effet sur le récepteur minéralocorticoïde permet la réabsorption de Na⁺ au niveau du tubule rénal distal et de sécréter le potassium dans l'urine afin de maintenir la volémie et la tension artérielle dans les limites physiologiques. Les études sur les antagonistes de l'aldostérone dans les essais cliniques *Randomized Aldosterone Antagonism in heart failure with Preserved Ejection Fraction* (RAAM-PEF) (Deswal et al., 2011), *ALDOsterone receptor blockade in Diastolic Heart Failure* (ALDO-DHF) (Edelmann et al., 2013) et TOPCAT (Shah et al., 2014) n'ont pas montré d'amélioration du pronostic vital des patients.

6.7. L'ivabradine

L'ivabradine agit en réduisant la FC, par inhibition sélective et spécifique du courant pacemaker qui contrôle la dépolarisation diastolique spontanée au niveau du noeud sinusal. L'étude utilisant l'ivabradine dans *the prEserved left ventricular ejection Fraction chronic heart failure with ivabradine study* (EDIFY) (Komajda et al., 2017) n'a pas montré d'amélioration de la PEC des patients.

6.8. Les nitrates

L'utilisation des dérivés nitrés permet d'améliorer la vasodilatation en augmentant les niveaux de NO. Deux études ont évalué l'utilisation des nitrates comme traitement de l'ICFEP. Les conclusions sont identiques pour les deux études, à savoir que l'apport d'un dérivé nitré ne permet pas d'améliorer la PEC des patients :

- *Nitrate's Effect on Activity Tolerance in Heart Failure with preserved Ejection Fraction* (NEAT-HFpEF) (Redfield et al., 2015),
- *Inorganic Nitrite Delivery to Improve Exercise capacity in Heart Failure with preserved Ejection Fraction* (INDIE-HFpEF) (Borlaug et al., 2018).

7. Modèles animaux dans l'ICFEP

Du fait de l'absence de solution thérapeutique et en raison de l'accès difficile aux biopsies cardiaques chez les patients ICFEP, de nombreux modèles animaux ont donc été développés. Cependant, ces modèles ne reproduisent que très partiellement les caractéristiques de la pathologie humaine, du fait de sa complexité.

La plupart des modèles s'appuient sur les comorbidités associées/à l'origine de l'ICFEP (Tableau 10) :

- modèles d'HTA induit génétiquement, par un composé pharmacologique ou par chirurgie. Ces animaux présentent l'inconvénient de développer une HTA très sévère, une ICFEP survenant à un jeune âge, souvent rapidement suivie d'une dysfonction systolique, ce qui diffère de la pathologie humaine,
- modèles d'obésité ou diabétiques. Ces animaux sont souvent génétiquement modifiés, ils développent bien un phénotype proche de l'ICFEP mais généralement une grande variation de phénotype est observée entre les mâles et les femelles,
- modèles de syndrome métabolique. Généralement c'est une combinaison de différentes comorbidités : HTA, obésité et/ou diabète avec parmi les plus utilisés le rat ZSF1 qui exprime un phénotype proche de l'ICFEP,
- modèles de sénescence accélérée (Gevaert et al., 2017) ou soumis à une radiation cardiaque par *single photon emission tomography/computed tomography* (SPECT/CT). Ceux-ci sont prometteurs (Saiki et al., 2017), ils offrent la possibilité d'étudier les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la dysfonction diastolique sur le long terme, mais le phénotype exprimé est plus subtil.

Tableau 10 : Les différents modèles d'ICFEP

Modèle	Type	Espèce	↓ FE	Hypertension/ hypertrophie	Risque métabolique	Vieillessement	Fonction cardiaque	Dysfonction endothéliale	Intolérance à l'effort	Références
Dahl Salt Sensitive	G	Rat	Oui	Oui	Oui, IR	Oui	↓ Relaxation, ↑ PTD _{VG} , fibrose	Oui	↑ Lung weight, ↑ BNP	(Adams et al., 2015; Doi et al., 2000; Klotz et al., 2006)
DOCA-Salt + nephrectomie	P/C	Rat Souris Porc	Non	Oui, hypertrophie rapide	Non	Non	↓ Relaxation, ↑ PTD _{VG} , fibrose	Oui	ND	(Ogata et al., 2004; Schwarzl et al., 2015; Silberman et al., 2010; Yao et al., 2020)
Angiotensine II	P/C	Rat Souris Porc	Oui	Oui	Non	Non	↓ Relaxation, ↑ PTD _{VG} , fibrose	ND	↑ BNP	(Regan et al., 2015; Zhang et al., 2019)
Constriction aortique	C	Rat Souris Chat Porc	Oui	Oui, hypertrophie rapide	Non	Non	↓ Relaxation, ↑ PTD _{VG} , fibrose	Oui	Congestion pulmonaire	(Bikou et al., 2018; Hiemstra et al., 2018; Moens et al., 2008; Nguyen et al., 2018; Wallner et al., 2017)
mRen2.Lewis + OVX	G/C	Rat	Non	Oui	Non	Non	↑ E/E', fibrose	ND	ND	(Groban et al., 2008)
SHR	G	Rat	Oui	Oui	Non	Oui	↓ Relaxation, ↑ PTD _{VG} , fibrose	ND	↑ BNP	(Marzak et al., 2014)
db/db	G	Souris	Oui	Non	Oui, obésité, IR, DT2	Oui	↓ Relaxation, ↑ PTD _{VG} , fibrose	ND	Remodelage pulmonaire	(Alex et al., 2018; Reil et al., 2013)
ob/ob	G	Souris	Oui	Non	Oui, obésité, IR, DT2	Oui	↓ E/A	ND	ND	(Sartori et al., 2017)
ZDF	G	Rat	Non	Non	Oui, obésité, IR, DT2	Oui	↓ Relaxation, ↑ PTD _{VG} , fibrose	Oui	↓ force fibres musculaire	(Koliijn et al., 2020; Mátyás et al., 2017)
OETF	G	Rat	Non	Non HTA, Oui hypertrophie	Oui, obésité, DT2	Oui	↓ Relaxation, ↑ PTD _{VG} , fibrose	ND	ND	(Kim et al., 2003; Makino et al., 2015)
Dahl Salt Sensitive / obèse	G	Rat	Oui	Oui	Oui, obésité, IR	Non	↓ Relaxation, fibrose	Oui	↑ BNP	(Murase et al., 2012)
ZSF1	G	Rat	Non	Oui	Oui, obésité, DT2	Oui	↓ Relaxation, ↑ PTD _{VG}	Oui	↑ Lung weight, ↑ BNP, ↓ tolérance effort	(Nguyen et al., 2020; Salah et al., 2018; Schauer et al., 2020; Schmederer et al., 2018)
SHR-obèse	G	Rat	Non	Oui	Oui, obésité	Oui	Fibrose	Oui	↑ BNP	(Linz et al., 2015)
SHHF	G	Rat	Oui	Oui	Non	Non	Fibrose	ND	ND	(Gómez-Garre et al., 2010)

INTRODUCTION – Modèles animaux dans l'ICFep

Modèle	Type	Espèce	↓ FE	Hypertension/ hypertrophie	Risque métabolique	Vieillessement	Fonction cardiaque	Dysfonction endothéliale	Intolérance à l'effort	Références
5/6 nephrectomie	C	Rat	Non	Oui	Oui	Oui	↓ Relaxation, ↑ PTD _{VG} , fibrose	ND	↑ Lung weight, ↑ BNP	(Primessnig et al., 2016)
HFD+L- NAME	P	Souris	Non	Oui	Oui, obésité	Oui	↓ Relaxation, ↑ PTD _{VG} , fibrose	Oui	↑ Lung weight, ↑ BNP, ↓ tolérance effort	(Schiattarella et al., 2019)
FVB/N	G	Souris	ND	Non HTA, Oui hypertrophie	ND	Oui (+++)	↓ Relaxation	ND	ND	(Cao et al., 2015; Koch et al., 2013)
SAMP8	G	Souris	Non	Non	Non	Oui (+++)	↓ Relaxation, ↑ PTD _{VG} , fibrose	ND	ND	(Reed et al., 2011)
Fischer 344	G	Rat	Non	Non HTA, Oui hypertrophie	ND	Oui (+++)	↓ Relaxation, ↑ PTD _{VG}	ND	ND	(Curl et al., 2018)
RAD	P	Rat	Non	Non	ND	Oui	↓ Relaxation	ND	ND	(Saiki et al., 2017)

Adapté de Conceição et al., 2016 (Conceição et al., 2016).

DOCA : *deoxycorticosterone acetate* ou acétate de désoxycorticostérone ; PTD_{VG} : pression télédiastolique du ventricule gauche ; HTA : hypertension artérielle ; ND : non déterminé ; DT2 : diabète de type 2 ; IR : insulino-résistance ; FE : fraction d'éjection ; G : génétique ; P : pharmacologique ; C : chirurgical ; L-NAME : N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester ; HFD : high fat diet ; BNP : *brain natriuretic peptide* ou peptide natriurétique de type B ; SAMP8 : *senescence accelerated mouse-prone 8* ; SHHF : *spontaneously hypertensive heart failure* ; SHR : *spontaneous hypertensive rat* ; OLETF : *otsuka long-evans tokushima fatty rat* ; ZDF : *zucker diabetic fatty* ; ICFep : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

7.1. Modèles animaux d'hypertension artérielle

L'HTA représente un risque majeur de développement d'ICFEP, il n'est donc pas surprenant que de nombreux modèles d'ICFEP se base sur une augmentation de la postcharge et de l'hypertrophie concentrique du VG qui en découle. Ces altérations sont induites par une constriction aortique transversale ou par une HTA constitutive.

7.1.1. Le rat Dahl salt-sensitive

Le rat Dahl salt-sensitive, caractérisé par une hypersensibilité au sodium, est un modèle d'ICFEP très utilisé (Kamimura et al., 2012; Klotz et al., 2006; Koshizuka et al., 2013; Omori et al., 2012). A partir de sept semaines, l'ajout d'une alimentation riche en sel (8 % NaCl) induit une IRC, une HTA et une hypertrophie du VG. A partir de la 12^{ème} semaine, les animaux sont considérés comme étant ICFEP avec une dysfonction diastolique caractérisée par une augmentation de la PTD_{VG} . Cependant, à partir de la 16^{ème} semaine des altérations de la fonction systolique sont de plus en plus marquées jusqu'à l'apparition d'une ICFEr. Il semble que des différences subtiles dans l'environnement expérimental, telles que la provenance des animaux (différents fournisseurs) ou les conditions du laboratoire incluant le régime alimentaire, peuvent avoir un impact important sur le phénotype cardiovasculaire du Dahl salt-sensitive.

7.1.2. Le rat DOCA

Le modèle de rat induit par le sel d'acétate de désoxycorticostérone (DOCA) représente un modèle d'hypertension induite chirurgicalement et pharmacologiquement. Le DOCA est administré par injection intrapéritonéale ou sous-cutanée à l'âge de sept semaines, une semaine après une néphrectomie unilatérale. Cette combinaison entraîne une HTA, une hypertrophie rénale et cardiaque. Le rat hypertendu DOCA développe une inflammation du myocarde, un stress oxydatif, une fibrose et un dysfonctionnement diastolique. Le dysfonctionnement diastolique a été confirmé par une relaxation altérée (augmentation du ratio E/e' et la constante Tau) et une rigidité accrue (augmentation de la PTD_{VG}) (Silberman et al., 2010).

7.1.3. Les modèles hypertendus induits par l'angiotensine II

Les rongeurs traités à l'ang II présentent des signes d'HTA, d'hypertrophie du VG et de fibrose. Ceci entraîne un dysfonctionnement diastolique confirmé par l'augmentation du TRIV, de la constante Tau, de la PTD_{VG} , du ratio E/e' ainsi que de la diminution du ratio E/A . L'utilisation d'agents pro-hypertrophiques tels que l'ang II ou l'isoprénaline sont aussi utilisés comme modèle de dysfonctionnement systolique.

7.1.4. Les modèles hypertendus induits par constriction aortique

La constriction aortique transverse est une technique chirurgicale bien établie pour induire une surcharge et une hypertrophie chronique de la pression ventriculaire gauche chez les rongeurs. Une constriction aortique transverse modérée imposée à un jeune âge déclenche une hypertrophie concentrique du VG avec des anomalies marquées de remplissage diastolique (Litwin Sheldon E. et al., 1995; Weinberg E O et al., 1994). Le profil du flux de transmission a montré un schéma de remplissage "restrictif" avec des vitesses de remplissage accrues, un diamètre auriculaire gauche et E/e' augmentés. Ces anomalies sont visibles à partir de 12 semaines et représentent ainsi un modèle potentiel pour l'étude de l'ICFEp.

L'une des principales limites de l'utilisation de ces modèles hypertendus est qu'il est fort probable que l'hypertension ne soit pas la cause de l'ICFEp. En effet, la majorité des patients atteints d'ICFEp continuent à présenter des symptômes d'IC même lorsque la PAS et la PAD sont contrôlés. À l'inverse, moins de 50 % des patients atteints de ICFEp présentent une hypertrophie du VG et ne présentent le plus souvent aucun signe de dilatation ventriculaire. Les modèles précliniques actuels sont donc discutables car ils ne sont représentatifs que d'une partie seulement de la population des patients ICFEp.

7.2. Modèles de diabète et d'obésité

La dysfonction diastolique est une manifestation cardiaque précoce des effets délétères du diabète de type 2. L'insulinorésistance et l'hyperinsulinémie exercent un certain nombre d'effets néfastes sur le myocarde, notamment la stimulation de l'hypertrophie, l'augmentation du stress oxydatif et des effets pro-inflammatoires / pro-fibrotiques. Ces altérations peuvent induire des changements délétères sur la fonction des cardiomyocytes ainsi qu'au niveau de la MEC.

De nombreux modèles de diabète récapitulent les caractéristiques des patients atteints d'ICFEP, notamment les souris ob/ob et les souris db/db. Les souris diabétiques, db/db, développent une hypertrophie cardiaque, comme en témoigne l'augmentation de la masse et de l'épaisseur de la paroi du VG dès l'âge de 9 semaines. La progression de la cardiomyopathie diabétique s'accompagne d'une production accrue de ROS et d'une fibrose. Les souris âgées de cinq mois présentent des altérations hémodynamiques telles qu'une élévation de la PTD_{VG} et une relaxation prolongée. À cet âge, la fonction systolique est préservée, avec une augmentation du TRIV et une diminution du ratio E/A, indiquant clairement une dysfonction diastolique.

La souris, obèse, ob/ob est un modèle animal d'obésité et de diabète qui montre des signes de dysfonctionnement diastolique probablement dû à une accumulation de lipides cardiaques. De nombreux autres modèles d'obésité sont également disponibles. Ces modèles sont généralement associés à d'autres facteurs de risque, notamment l'HTA et/ou le diabète :

- les rats Zucker ont été initialement créés par croisement entre des rattes Zucker diabétiques obèses et des rats *spontaneously hypertensive heart failure* (SHHF) pour être un modèle d'obésité et d'HTA. Le rat Zucker obèse (OZR) présente une augmentation constante de la masse du VG et un dysfonctionnement diastolique précoce. En revanche, le rat Zucker obèse et diabétique (ZDF) ne présente pas d'augmentation de la masse du VG, malgré une HTA et une dysfonction diastolique (Kolijn et al., 2020; Nguyen et al., 2020; Salah et al., 2018),
- le rat *Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty* (OLETF) est utilisé comme modèle de cardiomyopathie diabétique et présente des signes de dysfonctionnement diastolique dès l'âge de 20 semaines, observés par une augmentation du TDE et par la diminution du ratio E/A (Makino et al., 2015).

7.3. Modèles avec un syndrome cardiométabolique

Les rats Dahl/SS/obèses, issus du croisement Dahl/SS et Zucker, ont été récemment établis comme un nouveau modèle de syndrome métabolique. À l'âge de 15 semaines, les rats femelles Dahl/SS/obèses présentent un dysfonctionnement diastolique du VG, une hypertrophie et une fibrose du VG marquées, associés à un stress oxydatif cardiaque accru et à une inflammation.

Le rat ZSF1 a été généré en croisant des rats gras diabétiques Zucker femelles non hypertendus et maigres avec des rats mâles maigres spontanément hypertendus et sujets à l'IC, partageant un fond génétique commun avec les rats Wistar Kyoto. Les animaux ZSF1 maigres et obèses présentent une HTA modérée. Le rat ZSF1 obèse âgé de 20 semaines représente un modèle robuste de syndrome métabolique puisqu'il présente une HTA, une obésité, un diabète, une résistance à l'insuline, une hyperinsulinémie, une hypertriglycémie et une hypercholestérolémie. Ce modèle qui associe plusieurs facteurs de risque cardiométabolique développe un dysfonctionnement diastolique avec une augmentation de la constante Tau, de la PTD_{VG} et de la rigidité vasculaire. En plus, les rats ZSF1 obèses présentent une tolérance à l'effort réduite, caractéristique diagnostique d'ICFEP chez l'homme. En parallèle, on observe une hypertrophie du VG et une dilatation de l'oreillette gauche, sans signe d'IRC à l'âge de 20 semaines (Hamdani Nazha et al., 2013b, 2013a).

7.4. Vieillesse

La prévalence de l'ICFEP augmente avec l'âge et est plus élevée chez les femmes. Les modèles de vieillissement sont donc importants pour comprendre la pathophysiologie du dysfonctionnement diastolique lié à l'âge.

La souris *Senescence Accelerated Mouse-Prone 8* (SAMP8) offre un bon modèle de dysfonctionnement cardiaque associé au vieillissement. À l'âge de six mois, ce modèle animal montre une réduction significative des rapports E/A, et E'/A', de E' ainsi qu'une augmentation de la PTD_{VG}, de la fibrose et du TGF- β par rapport au groupe contrôle (SAMR1). Aucune différence dans la fonction systolique ou la PAM n'a été signalée chez les souris SAMP8 (Reed et al., 2011).

La souris FVB/N est une souche consanguine robuste, et les mâles présentent un dysfonctionnement diastolique à 12 mois, avec un E/A < 1 alors que, chez les femelles, ce phénotype n'est pas observé. En revanche, les rats Fischer 344 vieillissants présentent une hypertrophie du VG et un dysfonctionnement diastolique plus importants chez les femelles que chez les mâles.

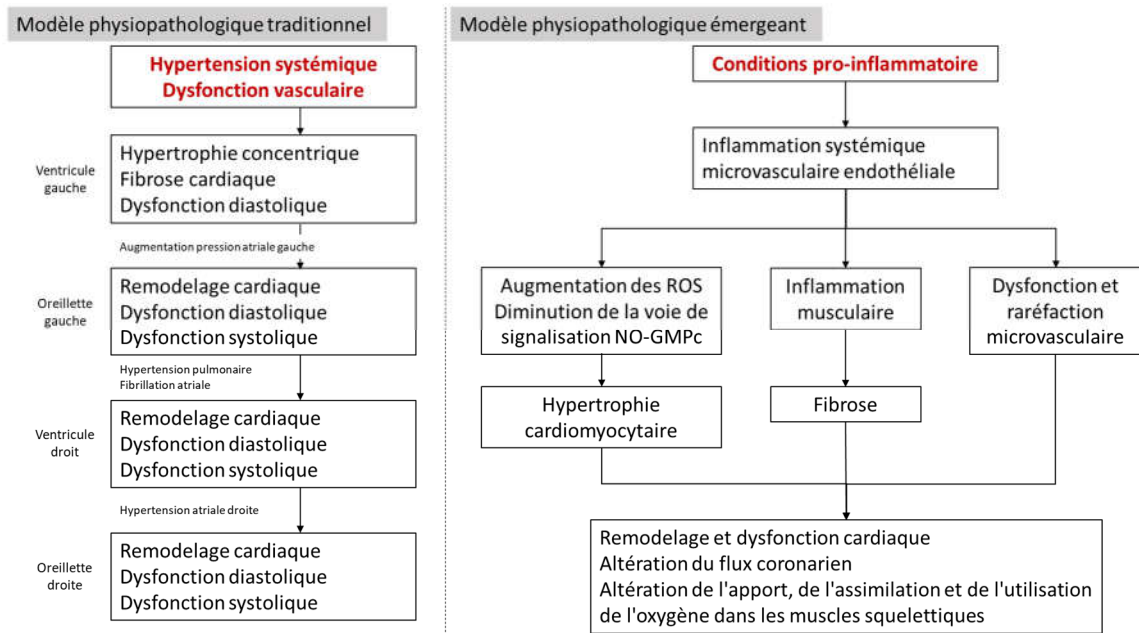


Figure 28 : Modèles physiopathologiques de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

D'après Redfield, 2016. (Redfield, 2016). ROS : espèces réactives de l'oxygène ; NO : monoxyde d'azote ; GMPc : guanosine monophosphate cyclique.

8. Nouveau paradigme de l'ICFEP

Depuis une vingtaine d'années, le développement de nombreux modèles animaux et les études cliniques ont permis d'améliorer les connaissances dans les mécanismes physiopathologiques de l'ICFEP. Depuis 2013, il est admis que le vieillissement et les comorbidités présents chez les patients ICFEP créent un état pro-inflammatoire systémique (Gladden et al., 2014; Redfield, 2016) (Figure 28) qui serait à l'origine des mécanismes physiopathologiques de l'ICFEP. En plus de l'inflammation, la forte prévalence de l'obésité et du diabète chez les patients souffrant d'ICFEP suggère fortement que le métabolisme cardiaque jouerait un rôle important dans les mécanismes de l'ICFEP. Dans la suite de ce manuscrit nous développerons plus en détails les pistes actuellement décrites comme étant à l'origine de l'ICFEP

8.1. Les altérations du métabolisme cardiaque

Les changements qui surviennent dans le métabolisme énergétique en cas d'IC sont complexes et dépendent non seulement de la gravité et du type d'IC présent, mais aussi de la coexistence de comorbidités communes telles que l'obésité et le diabète de type 2.

Il est décrit des altérations au niveau des trois fonctions nécessaires à la production et à l'utilisation de l'énergie sous forme d'ATP entraînant des altérations de la fonction cardiaque (Nascimben et al., 1996; Ide et al., 2001; Chandler et al., 2004; Stanley et al., 2005) :

- l'utilisation des substrats à partir de la glycolyse (glucides) et de la β -oxydation (lipides) (Neubauer, 2007),
- la production de l'énergie avec la phosphorylation oxydative au niveau de la mitochondrie permettant la production de l'ATP (Neubauer, 2007),
- le transport de l'énergie avec le transfert de l'ATP aux sites utilisateurs (Bessman and Geiger, 1981; Ingwall, 2002).

Dans le cas de l'ICFEP, il a été mis en évidence les altérations suivantes :

- la capacité d'oxydation des mitochondries est diminuée,
- l'oxydation des acides gras est augmentée,
- l'oxydation du glucose est diminuée,
- la présence d'un découplage entre l'absorption et l'oxydation du glucose ce qui entraîne une augmentation du taux de glycolyse.

Dans le cas de l'ICFEP le métabolisme cardiaque jouerait un rôle important mais des études complémentaires devront être menées pour comprendre ces altérations au même titre que les altérations de la fonction mitochondriale.

8.2. L'inflammation bas grade

L'inflammation bas grade est une inflammation chronique et systémique. Cette inflammation induite par le vieillissement et les comorbidités n'est pas liée à une infection. Plus précisément, l'inflammation est observée en cas de dysfonction mitochondriale, d'une altération du système immunitaire ou lors de changements hormonaux (Shirazi et al., 2017). Chez des patients âgés, les patients obèses, les patients diabétiques ou hypertendus, des études montrent une augmentation des cytokines pro-inflammatoires : IL-6, IL-1 β et le TNF- α (Abernethy et al., 2018; Assar et al., 2016; Burhans et al., 2018; Gholami et al., 2019; Reho and Rahmouni, 2017). Les cytokines inflammatoires sont sécrétées par des cellules immunitaires comme les leucocytes afin de réguler la fonction et l'activité d'autres cellules.

L'inflammation bas grade a été confirmée chez des patients ICFEP (Franssen et al., 2016b; Kalogeropoulos et al., 2016; Shah et al., 2016; Westermann et al., 2011) ainsi que dans de nombreux modèles animaux (Franssen et al., 2016b; Schiattarella et al., 2019).

8.3. Dysfonction endothéliale

L'inflammation bas grade est décrite comme étant à l'origine d'une dysfonction endothéliale. Elle se caractérise par différents mécanismes. Il est notamment décrit une altération des protéines au niveau des jonctions des cellules endothéliales et au niveau des protéines d'adhésion cellulaire. Ces altérations ont pour conséquence une désorganisation de la barrière endothéliale permettant l'infiltration des cellules immunitaires dans l'espace sous endothéliale et les tissus sous-jacents (Franssen et al., 2016b). Du fait de l'inflammation, les cellules immunitaires sont actives ce qui induit des altérations au niveau des organes. Les conséquences de l'inflammation systémique sur l'endothélium sont :

- la propagation de l'inflammation au niveau des micros vaisseaux,
- l'augmentation de la production de matrice,
- l'altération des voies de communication paracrine entre les cellules endothéliales et les cardiomyocytes.

Dans le cas de l'ICFEP, la dysfonction endothéliale est associée à une raréfaction capillaire. Une diminution de la densité coronarienne a ainsi été observée, ce qui conduit à une réduction des apports en oxygène au myocarde. D'après plusieurs études, la dysfonction des micro-vaisseaux est corrélée à la dysfonction diastolique, cette dysfonction est donc devenue un marqueur de sévérité dans l'ICFEP (Kato et al., 2016; Srivaratharajah et al., 2016).

8.4. Le stress oxydant

La production de l'énergie nécessaire au fonctionnement de la cellule et de l'organisme se déroule au niveau de la mitochondrie sous forme d'ATP. Cette production nécessite l'utilisation de l'O₂ au niveau de la chaîne mitochondriale. Cependant, la production de l'énergie via l'O₂ induit la production de ROS : l'anion superoxyde (O₂⁻), qui est un radical libre. Un radical libre est un atome ou une molécule possédant un (ou plusieurs) électron(s) non pairé(s) dans son orbite externe. Cette propriété confère au radical la capacité de soustraire un ou plusieurs électrons à d'autres atomes ou molécules afin d'apparier son (ses) électron(s) célibataire(s), ce processus correspondant à un phénomène d'oxydation (Commoner et al., 1954).

En condition physiologique, l' $O_2^{\bullet-}$ est pris en charge par un système antioxydant constitué, entre autres, de superoxydes dismutases (SOD) afin de former du peroxyde d'hydrogène. L' $O_2^{\bullet-}$ est aussi capable d'interagir avec le $\bullet NO$ induisant la formation du peroxynitrite ($ONOO^-$) une espèce réactive de l'azote (Wang et al., 2018). Normalement, la production de l' $O_2^{\bullet-}$ est majoritairement induite par la mitochondrie mais en condition pathologique, s'ajoute la production de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase. Il en résulte généralement un déséquilibre entre la production de l' $O_2^{\bullet-}$ et les capacités antioxydantes des systèmes de défense qui sont saturés. Ces espèces sont très réactives et interagissent avec des protéines qui seront oxydées ou nitrosylées, induisant une altération de leur fonction. Le $ONOO^-$ est un oxydant biologique puissant formé par la réaction de deux radicaux libres : l' $O_2^{\bullet-}$ et le $\bullet NO$ (Pacher et al., 2007). Il inflige des dommages sévères à la plupart des biomolécules, protéines, lipides et acides nucléiques, par des processus d'oxydation directe ou par la génération secondaire de radicaux libres très réactifs. Lorsque ces dommages atteignent un seuil critique, ils entraînent la mort cellulaire par nécrose ou apoptose.

L'augmentation du stress oxydant est également retrouvée chez les patients ICFEP car l'inflammation, provoquée par l'obésité ou le vieillissement, a pour conséquence une production excessive de ROS au niveau de la cellule endothéliale (Laina et al., 2018; Maaten et al., 2016; Reho and Rahmouni, 2017). Comme chez les patients, les modèles animaux d'ICFEP présentent une augmentation du stress oxydatif caractérisé par une augmentation de la production de l' $O_2^{\bullet-}$ (Franssen et al., 2016b).

8.5. La dysfonction de la voie du monoxyde d'azote dans l'ICFEP

L'augmentation de l'inflammation entraîne donc un accroissement du stress oxydant avec une augmentation de l' $O_2^{\bullet-}$ et de $ONOO^-$ dans l'ICFEP. L'augmentation de la production de $ONOO^-$ suggère donc que la production du $\bullet NO$ joue un rôle dans l'ICFEP (Gholami et al., 2019; Shah et al., 2018).

Selon l'hypothèse développée pour la première fois en 2013 par Paulus, la dysfonction endothéliale observée dans l'ICFEp s'accompagne bien d'une réduction de la biodisponibilité du NO . Ce phénomène serait un élément majeur dans le développement de l'ICFEp (Paulus and Tschöpe, 2013a). La diminution du NO entraîne une diminution de l'activité de la PKG ce qui participe à une augmentation de la rigidité du cardiomyocyte. De plus, il a été mis en évidence une relation entre la diminution de l'activité de PKG et l'apparition d'une hypertrophie que l'on retrouve chez certains patients ICFEp (van Heerebeek et al., 2012). Les études de cette voie, que ce soit chez les patients ou des modèles animaux d'ICFEp, se multiplient. Toutes s'accordent à montrer une diminution de l'activité de la PKG liée à une diminution du GMPc (Franssen et al., 2016a, 2016b; Mátyás et al., 2017; Saiki et al., 2017; Sala et al., 2017). Selon Franssen *et al.*, en 2016, la diminution de la forme active de la eNOS est responsable de la baisse de production de NO et donc de la dégradation de toute la voie de signalisation (Franssen et al., 2016b)

L'inflammation et donc le stress oxydatif dans l'ICFEp sont responsables de la diminution de la production du NO et donc de l'altération de la voie GCs/GMPc/PKG (Münzel et al., 2005). En effet, le stress oxydatif va notamment provoquer une oxydation de la BH4 (Landmesser et al., 2003). Lorsque la BH4 est oxydée cela entraîne un découplage du complexe NOS-BH4 provoquant la synthèse par les NOS de $\text{O}_2^{\bullet-}$, à la place du NO . $\text{O}_2^{\bullet-}$, en se couplant au NO , va induire la production de ONOO^- , qui est plus délétère que $\text{O}_2^{\bullet-}$, ce qui accentue le stress oxydatif et donc le découplage NOS-BH4. Un tel découplage, à l'origine d'une dysfonction diastolique, a été mis en évidence dans un modèle de souris hypertendues présentant une réduction des niveaux en BH4 (Silberman et al., 2010).

En résumé, une corrélation a été établie entre ICFEp et dysfonction endothéliale, avec une forte suspicion pour un lien de causalité (Akiyama et al., 2012, 2020). Il est important de souligner que la dysfonction endothéliale n'est pas présente uniquement au niveau coronaire mais est également retrouvée dans les artères périphériques des patients ICFEp. Elle est aussi suspectée de participer au déconditionnement musculaire périphérique qui majore l'intolérance à l'effort (Borlaug et al., 2010, 2010; Borlaug Barry A. et al., 2006).

L'endothélium micro-vasculaire de patients atteints d'ICFEp présente une altération de la voie NO avec, entre autres, une diminution de l'expression de la eNOS (Franssen et al., 2016b). Il a été décrit qu'une altération de la voie du NO -GCs-GMPc-PKG participe à la rigidification du myocarde (van Heerebeek et al., 2012; Lam and Brutsaert, 2012) suggérant le rôle important de cette voie de signalisation dans les mécanismes physiopathologiques de l'ICFEp. Ces résultats font suspecter un lien de causalité, suggérant un rôle central de la fonction endothéliale dans l'apparition de l'ICFEp.

Cette voie étant activée par le récepteur β_3 -adrénergique (β_3 -AR) au niveau de l'endothélium, et sachant que l'expression de ce récepteur est augmentée dans l'IC, il serait intéressant d'étudier le rôle de ce récepteur dans l'ICFEp (Moens et al., 2010).

9. Le système adrénergique

Les variations hémodynamiques au sein de l'organisme sont finement régulées par le système nerveux autonome (SNA). Le SNA est responsable des fonctions non soumises au contrôle volontaire. Il régule la fonction de nombreux organes permettant l'adaptation de l'organisme face aux différents stress. On distingue trois systèmes nerveux différents au sein du SNA :

- le système nerveux entérique (SNE), qui contrôle le système digestif,
- le système nerveux sympathique (SNS), qui contrôle un grand nombre d'activités automatiques de l'organisme. Ce système conditionne la réponse de l'organisme face à une situation de stress via l'action de catécholamines : noradrénaline ou adrénaline,
- le système nerveux parasympathique (SNP), qui régule lui aussi les activités automatiques de l'organisme conjointement au SNS. A la différence du SNS, le SNP utilise l'acétylcholine déclenchant alors des réponses antagonistes au SNS.

La libération de catécholamines, lors de l'activation du SNS, va permettre l'activation des récepteurs adrénergiques (AR). Les catécholamines endogènes les plus courantes sont :

- la dopamine, agissant comme un neurotransmetteur, est synthétisée dans les neurones à partir de la tyrosine mais est aussi le précurseur de l'adrénaline et de la noradrénaline,
- l'adrénaline, agissant comme un neurotransmetteur et neuromodulateur, est libérée par les neurones et par la glande médullosurrénale,
- la noradrénaline, agissant comme un neurotransmetteur, est libérée par les terminaisons nerveuses sympathiques.

Il existe aussi des catécholamines synthétiques : isoprénaline ou dobutamine.

Les catécholamines ont des actions physiologiques diverses et régulent notamment les fonctions cardiovasculaires, respiratoires et métaboliques.

C'est en 1906 que Dale *et al.*, ont émis l'hypothèse de la présence de deux types de AR. Son argumentation se base sur une inversion des effets de l'adrénaline par certaines substances (Dale, 1906).

C'est en 1948 qu'Ahlquist, confirme l'hypothèse de la présence de deux types de récepteurs adrénergiques (Ahlquist, 1966). En utilisant différentes catécholamines, il a observé des effets opposés en fonction des organes. Il distingue alors les récepteurs α -adrénergiques (α -AR) et les récepteurs β -adrénergiques (β -AR) (Dixon et al., 1986; Emorine et al., 1989; Frielle et al., 1987). Les récepteurs α -AR sont responsables de l'effet « constricteur » (sauf au niveau de l'intestin) et les récepteurs β -AR sont responsables de l'effet « relaxant » (sauf au niveau cardiaque). Cette étude a aussi permis de classer les catécholamines selon leur ordre de puissance en fonction du type de récepteur AR.

Pour les récepteurs α -AR : adrénaline > noradrénaline > isoprénaline.

Pour les récepteurs β -AR : isoprénaline > adrénaline > noradrénaline.

Par la suite, les récepteurs AR ont été subdivisés en sous-famille : α_1 -AR, α_2 -AR, β_1 -AR, β_2 -AR et β_3 -AR. Le système β -adrénergique, acteur majeur de la régulation cardiovasculaire, est donc composé des trois sous-types de récepteurs : β_1 -AR, β_2 -AR et β_3 -AR. Les récepteurs β_1 -AR et β_2 -AR ont été les premiers découverts, et c'est seulement en 1989 que le récepteur β_3 -AR a été mis en évidence (Emorine et al., 1989). L'étude des récepteurs β -AR a suscité beaucoup d'intérêt du fait de leur pertinence clinique dans le traitement de nombreuses pathologies cardiovasculaires. Les des récepteurs β -AR jouent un rôle sur la force de contraction du cœur (effet inotrope), sur la FC (effet chronotrope), sur la relaxation du cœur (effet lusitrope), sur la conduction cardiaque (effet dromotrope) et sur l'excitabilité cardiaque (effet bathmotrope).

9.1. Les récepteurs β_1 -AR et β_2 -AR

Le récepteur β_1 -AR est prédominant dans les cardiomyocytes. Il est couplé à une protéine G stimulatrice (Gs) qui est responsable de l'activation de l'AC. L'AC va catalyser la formation de l'AMPc. En résulte l'activation de la PKA qui va phosphoryler de nombreuses protéines impliquées dans la fonction cardiaque. L'activation de la voie Gs-cAMP-PKA conduit à la phosphorylation des canaux Ca^{2+} de type L sur la membrane cellulaire, ce qui favorise l'afflux de Ca^{2+} et augmente ainsi la contraction du myocarde. En outre, l'activation de la voie Gs-AMPc-PKA induit également la phosphorylation du PLB (Defer et al., 2000; Dessauer, 2009). Ce processus suggère une amélioration de la relaxation diastolique et une augmentation du Ca^{2+} disponible pour le cycle cardiaque suivant.

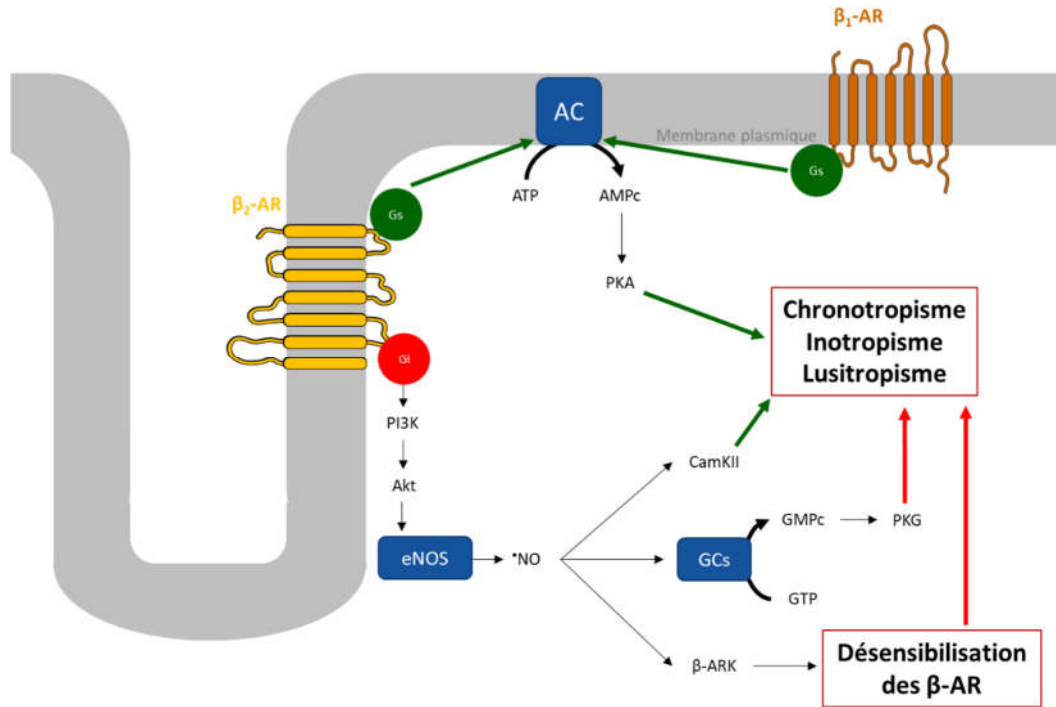


Figure 29 : Schématisation des voies de signalisation couplées aux récepteurs β_1 -AR et β_2 -AR au niveau cardiaque

Adapté de Cannavo and Koch, 2017 (Cannavo and Koch, 2017). β_1 -AR : récepteur β_1 adrénergique ; β_2 -AR : récepteur β_2 adrénergique ; AC : adénylate cyclase ; Gs : protéine G stimulatrice ; Gi : protéine G inhibitrice ; PKA : protéine kinase A ; GCs : guanylate cyclase soluble ; PKG : protéine kinase G ; eNOS : synthase endothéliale de monoxyde d'azote ; GMPc : guanosine monophosphate cyclique ; GTP : guanosine triphosphate ; CamKII : calmoduline kinase II ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; ATP : adénosine triphosphate ; PI3K : phosphatidyl inositol 3-kinase ; β -ARK : kinase du récepteur β adrénergique.

L'expression prédominante du récepteur β_1 -AR dans le myocarde va induire des effets inotropes, lusitropes, chronotropes, dromotropes et bathmotropes positifs respectivement (Kushnir and Marks, 2010).

Le récepteur β_2 -AR est, quant à lui, exprimé majoritairement au niveau des CML des vaisseaux. En plus d'un couplage avec une protéine Gs, ce type de récepteur est aussi décrit comme couplé à une protéine G inhibitrice (Gi). L'activation de la protéine Gi contrebalance les effets stimulants de la protéine Gs par l'activation de la voie du phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) - Akt. Le passage du couplage β_2 -AR de Gs à Gi, en réponse à une stimulation soutenue, est connu comme étant la cause de plusieurs troubles cardiovasculaires, tels que l'IC (Brodde and Michel, 1999; Daaka et al., 1997; Xiao, 2001) (Figure 29).

9.2. Le récepteur β_3 -AR

Le gène codant pour le récepteur β_3 -AR a été identifié et cloné pour de nombreuses espèces telles que l'homme, le singe, le chien, le bovin, la souris, le rat et le cobaye. Initialement découvert en 1989, ce n'est qu'en 1996 que ce récepteur a été décrit comme exprimé au niveau des cellules cardiaques (Gauthier et al., 1996). Il est également retrouvé au niveau des cellules atriales, des cardiomyocytes ventriculaires, des cellules endothéliales et des artères coronaires de résistance.

Il existe deux structures différentes du gène :

- la première structure avec deux exons et un intron,
- la seconde structure avec trois exons et deux introns.

La première structure, plus largement acceptée, code une protéine de 408 acides aminés. Chez d'autres espèces, telles que le chien et le singe, la structure de deux exons et d'un intron a également été décrite. Chez le rat et la souris, cependant, on sait que le gène contient trois exons et deux introns similaires à la seconde structure chez l'humain. Distincts des gènes codant pour β_1 -AR et β_2 -AR, les gènes codant pour le récepteur β_3 -ARs contiennent donc des introns, ce qui soulève la possibilité qu'ils puissent subir un épissage alternatif, générant ainsi des isoformes de récepteurs avec des propriétés pharmacologiques présumées distinctes.

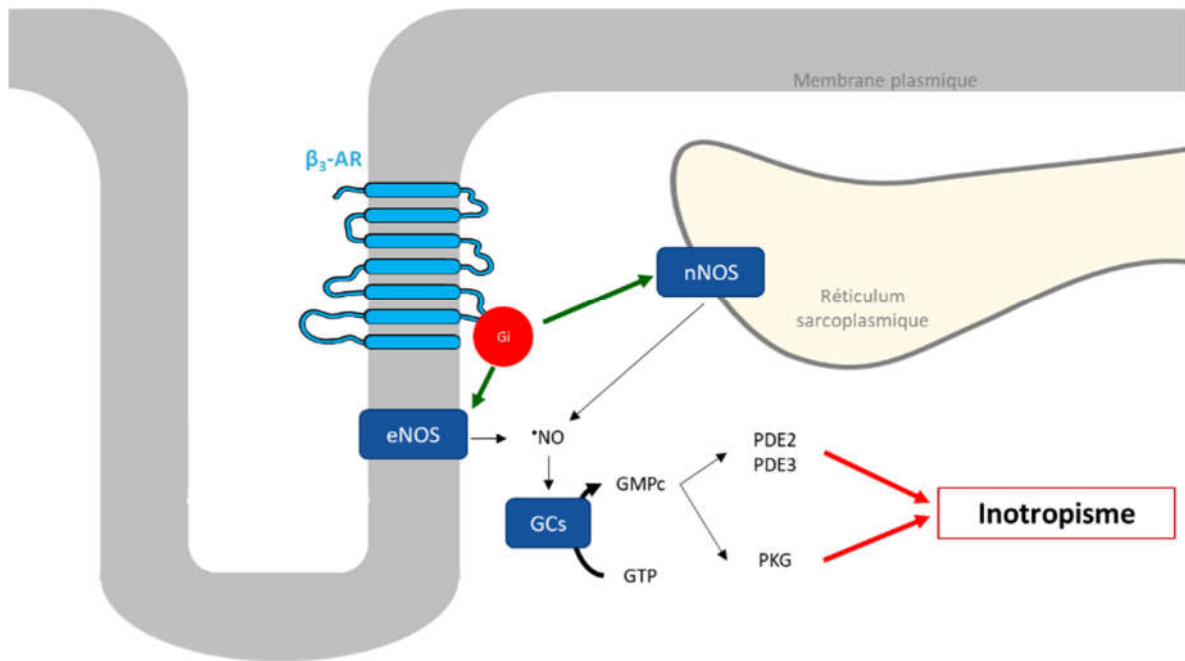


Figure 30 : Schématisation des voies de signalisation couplées aux récepteurs β_3 -AR au niveau cardiaque

Adapté de Cannavo and Koch, 2017 (Cannavo and Koch, 2017). β_3 -AR : récepteur β_3 adrénergique ; Gi : protéine G inhibitrice ; GCs : guanylate cyclase soluble ; PKG : protéine kinase G ; eNOS : synthase endothéliale de monoxyde d'azote ; nNOS : synthase neuronale de monoxyde d'azote ; GMPc : guanosine monophosphate cyclique ; GTP : guanosine triphosphate ; PDE : phosphodiésterase ; NO : monoxyde d'azote.

Au-delà de la structure génique, le récepteur β_3 -AR diffère des récepteurs β_1 -AR et β_2 -AR en termes de propriétés pharmacologiques (Gauthier et al., 2007) :

- certains antagonistes des récepteurs β_1 -AR et β_2 -AR, tels que le CGP 12177A, le bucindolol et le pindolol, se sont avérés être des agonistes partiels du récepteur β_3 -AR,
- plusieurs agonistes sélectifs du récepteur β_3 -AR, notamment le BRL 37344, le CL 316243 et le SR 58611A, ont une grande affinité et une grande puissance pour ce récepteur mais n'interagissent que faiblement avec les récepteurs β_1 -AR et β_2 -AR,
- l'absence de sites de phosphorylation aux protéines kinases GRK sur l'extrémité C-terminale du récepteur β_3 -AR suggère que ce récepteur pourrait ne pas subir de désensibilisation à court terme induite par les agonistes,
- l'ordre de puissance des catécholamines pour le récepteur β_3 -AR diffère des deux autres types de récepteur β -AR. De plus le récepteur β_3 -AR est activé à des concentrations de catécholamines plus élevées que pour les récepteurs β_1 -AR et β_2 -AR. Par conséquent, la réponse médiée par β_3 -AR peut être préservée lorsque les réponses médiées par les récepteurs β_1 - et β_2 -AR sont diminuées.

L'ordre de puissance des catécholamines pour le récepteur β_3 -AR est :

isoprénaline $\geq$ noradrénaline > adrénaline.

Ce récepteur a des effets opposés au β_1 -AR au niveau cardiaque, à savoir un effet inotrope et lusitrope négatif. Au niveau des vaisseaux, le récepteur β_3 -AR a un effet vasodilatateur (Gauthier et al., 1998a). L'activation du récepteur induit une activation des NOS, principalement eNOS et nNOS, afin d'activer la production du NO . Le récepteur β_3 -AR est couplé à une protéine G_i au niveau cardiaque (Figure 30). L'activation de cette protéine G_i ne semble pas être responsable d'une inhibition de la production de l'AMPc mais plutôt une activation de la voie du NO via la eNOS (Angelone et al., 2008; Brixius et al., 2004) mais aussi la nNOS (Trappanese et al., 2015a). L'une des études appuyant ce fait porte sur une souris dépourvue du gène codant pour le récepteur β_3 -AR (β_3 -KO) qui développe une altération de la contractilité. Cependant, l'inhibition pharmacologique des NOS via le N^g-monométhyl-L-arginine monoacétate (L-NMMA), au préalable de la stimulation catécholaminergique, a permis d'empêcher l'augmentation de la contractilité du cœur chez ces souris. Cette étude suggère que la voie de signalisation β_3 -AR- NO agirait comme une boucle de régulation négative s'opposant aux effets inotropes positifs des catécholamines dans le cœur.

Le NO , ainsi produit, induit la cascade GC/GMPc/PKG. La PKG va phosphoryler différentes cibles, comme le PLB, la Troponine I et le canal calcique de type L (Simon et al., 2014). Le GMPc est aussi responsable de l'activation de la phosphodiesterase de type II qui conduit à la diminution de l'AMPc. L'activation des NOS par la stimulation du récepteur β_3 -AR est médiée par un couplage préférentiel du récepteur aux NOS.

Il est important de noter que l'action du récepteur β_3 -AR ne se limite pas au cœur. Son expression est aussi retrouvée au niveau des cellules endothéliales.

9.3. Implication du récepteur β_3 -AR dans l'insuffisance cardiaque

Dans l'IC, des niveaux élevés de catécholamines ont été décrits. La sur-activation du SNS par l'augmentation des niveaux de catécholamines permet à l'organisme de maintenir une performance cardiaque « normale ». Initialement bénéfique, la suractivation des récepteurs β_1 -AR et β_2 -AR va être diminuée à cause de la désensibilisation des récepteurs. Dans des modèles d'IC, il a été confirmé une diminution de l'expression des récepteurs β_1 -AR dans les situations d'IC avancée, alors que les récepteurs β_3 -AR étaient inchangés voire sur-exprimés, rendant leur action proportionnellement plus importante (Fischer et al., 2008; Moniotte et al., 2001). En ce qui concerne le récepteur β_2 -AR, il est décrit comme augmenté dans l'IC par rapport à l'expression du récepteur β_2 -AR. Chez l'homme, l'effet inotrope négatif induit par un agoniste β_3 -AR est diminué chez les patients souffrants d'IC malgré l'augmentation de l'expression. Or dans les modèles animaux la surexpression du récepteur β_3 -AR est corrélée à une augmentation de l'activité. Cette variabilité de réponse entre les espèces n'est pas expliquée mais il est possible que le type d'IC explique cette différence.

L'importance des récepteurs β_3 -AR dans le développement de l'IC s'appuie sur plusieurs faits :

- la protéine Gi est augmentée dans l'IC,
- le récepteur β_3 -AR est résistant à la désensibilisation,
- l'expression du récepteur est augmentée dans la phase terminale de la maladie.

La désensibilisation des récepteur β -AR est un phénomène qui permet de limiter les effets néfastes d'une stimulation sympathique excessive. La stimulation prolongée du récepteur par son agoniste conduit à son découplage et même à l'internalisation du récepteur. Les phénomènes d'internalisation et de séquestration composent la désensibilisation à court terme. La désensibilisation à long terme se produit lorsque la stimulation par l'agoniste persiste induisant une diminution de l'expression du récepteur. En ce qui concerne la désensibilisation à court terme elle se fait via la phosphorylation de l'extrémité C-terminale des récepteurs occupés, leur découplage puis leur internalisation. Ils sont ensuite conduits vers les endosomes où ils sont recyclés à la membrane ou dégradés par les lysosomes.

Les récepteurs β_1 -AR et β_2 -AR possèdent tous deux sur leur extrémité C-terminale des résidus sérine et thréonine qui sont des sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase des récepteurs β -AR (β -ARK). Le NO peut nitrosyler les résidus cystéine de la β -AR empêchant ainsi l'internalisation des récepteurs β_1 -AR et β_2 -AR. Le récepteur β_3 -ARK possède peu de résidus sérine et thréonine et aucun site de phosphorylation par la PKA en C-terminal, ce qui lui confère une résistance à la désensibilisation à court terme. Il semble donc que le récepteur β_3 -AR est bénéfique en condition de stress catécholaminergique car il n'est pas sujet à la désensibilisation sur le court terme. Cependant sur le long terme la question de la désensibilisation du récepteur β_3 -AR n'est pas déterminée.

Il est important de noter que l'activation ou la surexpression du récepteur β_3 -AR a été associée à un effet cardioprotecteur dans différentes situations d'agression cardiaque aiguë en limitant le remodelage hypertrophique. Les effets protecteurs pourraient résulter de la meilleure fonction diastolique dû à l'augmentation du NO , au maintien des stocks énergétiques et à l'effet vasodilatateur. Cependant à des stades ultimes d'IC, l'activation du β_3 -AR aggrave la fonction cardiaque. L'utilisation de β -bloquants dans le traitement de l'IC augmente la survie des patients souffrant d'ICFEr mais pas pour les patients présentant une ICFEp. Le rôle du récepteur β_3 -AR est donc encore peu connu et surtout son implication dans les situations pathologiques, pas totalement comprise, suscite de nombreuses questions. Le fait que ce récepteur soit impliqué dans des voies de signalisation décrites comme altérées dans l'ICFEp suggèrent un potentiel rôle de celui-ci dans la pathologie.

En conclusion de cette introduction il faut retenir que les cellules endothéliales et d'une manière plus générale la fonction endothéliale joue un rôle important dans l'établissement de l'ICFEp. Afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et d'améliorer la PEC des patients il est nécessaire de continuer la recherche fondamentale et cliniques pour améliorer les connaissances sur l'ICFEp. Avant de détailler les résultats de ma thèse, la prochaine partie est consacré au développement du médicament. .

INTRODUCTION – La place de la recherche dans le développement de nouveaux traitements



Figure 31 : Développement du médicament

Adapté de (Leem, 2017)

10. La place de la recherche dans le développement de nouveaux traitements

La recherche a permis le développement de médicaments qui ont amélioré la PEC des patients. Le développement d'un médicament est un processus long qui nécessite au minimum 15 années de travail. L'industrie pharmaceutique regroupe les activités de recherche, de fabrication et de commercialisation des médicaments pour la médecine humaine. Les entreprises pharmaceutiques consacrent des ressources considérables à la recherche et au développement. Toutes les activités des entreprises pharmaceutiques sont exercées dans un cadre réglementaire très strict fixé par le code de la santé publique. En outre, un médicament ne peut être commercialisé que s'il a reçu une autorisation de mise sur le marché de l'Agence Nationale française de Sécurité des Médicaments (ANSM) ou de l'*European Medicines Agency* ou Agence européenne du médicament (EMA), qui garantissent sa qualité, sa sécurité et son efficacité.

Le développement du médicament est divisé en plusieurs phases (Figure 31) :

- la recherche,
- le développement précoce du médicament,
- le développement avancé du médicament,
- et la commercialisation.

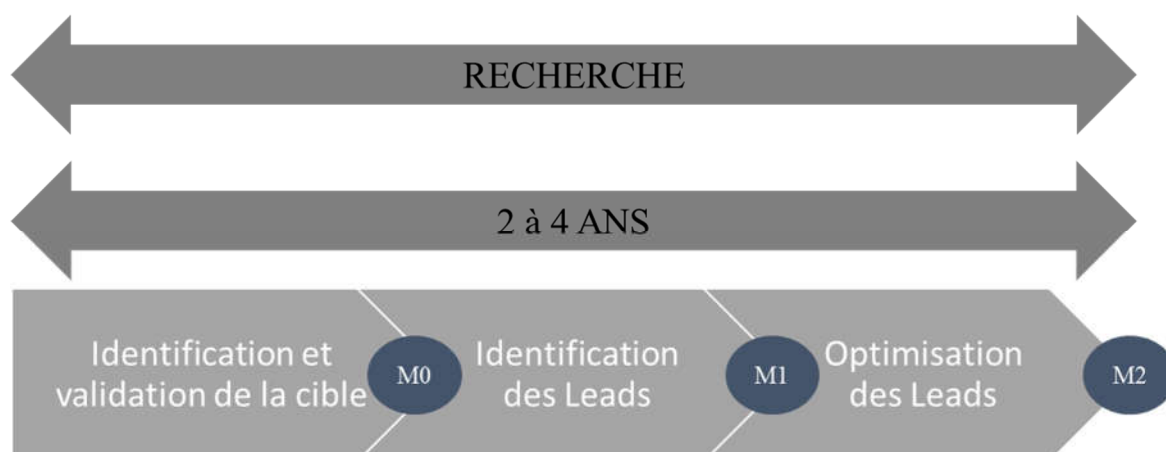


Figure 32 : Les différentes étapes de la recherche

M0, 1 ou 2 : milestones.

10.1. La recherche

Cette phase consiste à trouver des cibles ou des molécules présentant un intérêt thérapeutique. Cette étape qui dure entre 2 à 4 ans est sous-divisée en différentes parties (Figure 32) :

La première étape est une phase précoce qui vise à identifier et à valider la cible. Cette étape d'innovation se concentre sur une maladie. Afin d'identifier les cibles, il est important de comprendre la biologie et les mécanismes physiopathologiques liés à la maladie en question. Différentes études peuvent être menées en amont pour modéliser la pathologie, comme l'utilisation d'un modèle cellulaire ou animal. Cette étape est l'une des plus importantes car elle permet d'identifier une cible qui sera à la base d'un programme de recherche. Cette cible peut être une cible moléculaire (un récepteur, une enzyme...) ou une cible cellulaire (cellule tumorale, adipocytes...). L'identification de ces cibles peut se faire à partir de la littérature, d'une étude transcriptomique, protéomique ou génomique, ou d'une observation clinique. Outre l'identification de la cible, il est important de la valider et de confirmer son intérêt dans la pathologie. À cette fin, des modèles cellulaires et animaux seront générés. Par exemple, des modèles génétiquement modifiés seront développés pour augmenter, diminuer ou invalider l'expression des cibles afin de voir l'impact de cette modification sur le phénotype de la pathologie. La validation de cette étape correspond à la transition M0 (validation de la cible). Tout ce qui se passe en amont de l'identification de la cible est ce qu'on appelle l'étape "pré-M0".

La deuxième étape est appelée pré-programme et consiste à développer des tests de criblage moléculaire pour identifier des séries de molécules chimiques. Différents types de test de criblage existent : criblage biochimique, cellulaire, électrophysiologique, virtuel ou biophysique. Il existe également des tests de criblage à très haut débit et à débit moyen. Si des composés actifs de la chimiothèque sont identifiés à la suite du criblage, des investigations plus approfondies sont alors menées. Différents paramètres sont évalués : la sélectivité, l'activité fonctionnelle sur les tests cellulaires et la potentialité à devenir un candidat médicament : adéquation des propriétés physico-chimiques (règle des cinq Lipinski), absorption, métabolisme *in vitro*, originalité de la structure chimique et brevetabilité, faisabilité de la synthèse chimique, génotoxicité... Si tous les critères sont remplis, l'étape M1 est validée avec l'identification de produits actifs ou « leads ».

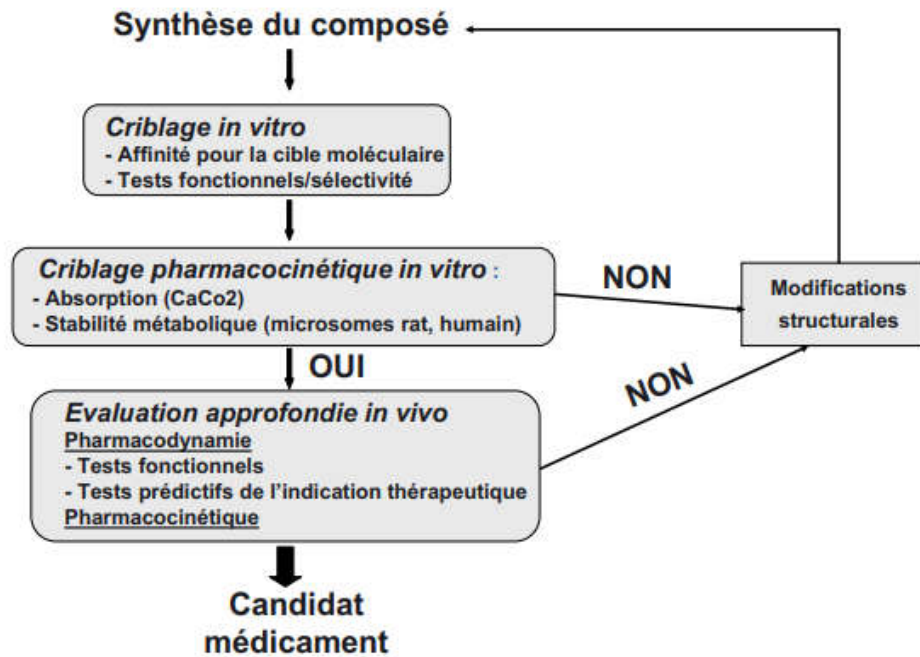


Figure 33 : Processus d'optimisation des têtes de série (leads)

D'après Scatton, 2009 (Scatton, 2009).

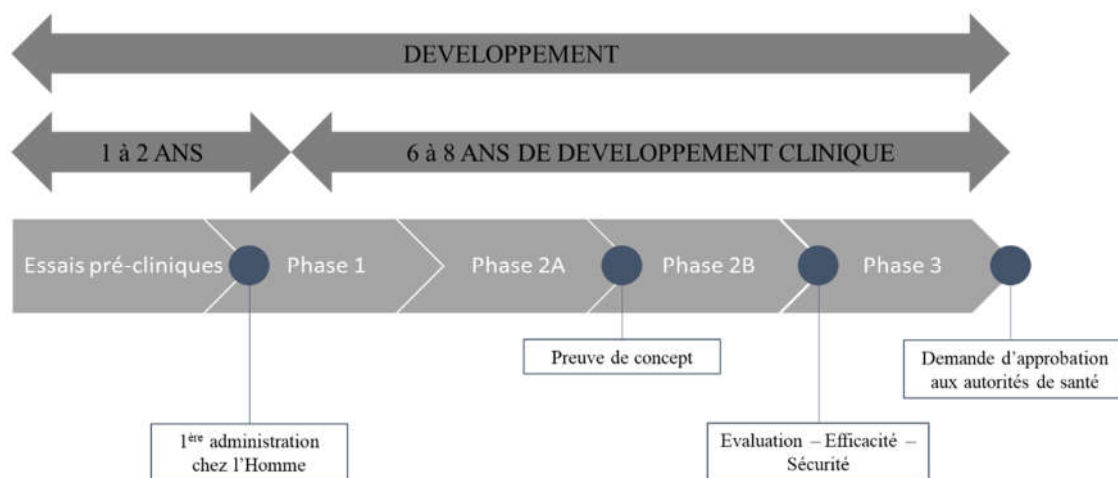


Figure 34 : Les différentes étapes du développement du médicament

La troisième étape est un programme de recherche qui vise à optimiser les "leads" en candidats au développement (Figure 33). Des tests de criblage moléculaire sont effectués afin d'identifier une centaine de molécules candidates présentant un intérêt thérapeutique potentiel sur la cible étudiée. Ces molécules seront ensuite optimisées chimiquement afin d'améliorer leurs propriétés pharmacologiques (ADME : absorption, distribution, métabolisme, élimination), leur spécificité sur la cible (limiter les effets hors cible), limiter leur toxicité, etc. Différents tests seront réalisés : tests *in vitro* pour évaluer l'affinité et la sélectivité ; tests fonctionnels sur la cible native ou sur organes isolés ; tests d'absorption ; tests de stabilité métabolique *in vivo* ; tests fonctionnels *in vivo* ; tests pharmacologiques *in vivo* prédictifs de l'indication thérapeutique ; tests de sécurité cardiovasculaire... L'optimisation des composés est souvent un processus complexe car il est nécessaire d'optimiser en parallèle de nombreux paramètres de nature physico-chimique, pharmacocinétique, pharmacologique, ou toxicologique avant de proposer un candidat final au développement. L'étape M2 correspond à la validation du candidat pour le développement préclinique du médicament.

10.2. Le développement du médicament

Après la sélection du candidat médicament, l'étape pré-clinique peut débuter. Elle comprend les études de sécurité (absence d'effets cardiovasculaires délétères, toxicité...) et de pharmacocinétique sur différentes espèces animales, ainsi que les essais de formulation et mécanismes d'administration (stylet d'injection...) le cas échéant, et la production / qualification des lots cliniques de la molécule qui seront utilisés pour la phase I (Figure 34).

Les essais cliniques sont ensuite divisés en plusieurs phases :

La phase I permet d'évaluer la tolérance du médicament sur un nombre limité de volontaires sains (ou patients dans certaines indications comme l'oncologie). Les objectifs de cette phase sont d'évaluer la sécurité du médicament, d'étudier son devenir dans l'organisme et de confirmer les niveaux d'exposition plasmatique prédits en fonction des doses administrées. La durée de cette première phase se compte en quelques jours ou mois sur un petit nombre de volontaires sains (20 à 80 volontaires). Environ 70 % des produits expérimentés en phase I passent en phase II.

INTRODUCTION – La place de la recherche dans le développement de nouveaux traitements

La phase II permet l'évaluation de l'efficacité du médicament sur des patients. Cette phase permet aussi de déterminer la posologie optimale du médicament. Elle est réalisée sur un petit groupe homogène de patients (entre 100 et 200 patients) se déroule sur une durée allant de quelques mois à 2 ans. Uniquement un tiers des produits testés passe en phase III.

La phase III permet l'étude du rapport efficacité/tolérance sur une large population de malade (entre 500 et 1 000 patients). Les bénéfices et les risques du nouveau traitement sont comparés à ceux apportés par un médicament de référence dans la pathologie. Cette phase dure entre 1 et 5 ans. Entre 70 et 90 % des médicaments entrant en phase III sont retenus pour une demande d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM).

A l'issue de la phase III les résultats peuvent être soumis à l'EMA pour une AMM en Europe et / ou à l'ANSM pour une AMM en France. Le dossier d'AMM passe en France devant la Commission de Transparence de la Haute Autorité de Santé (HAS) qui donne son avis sur le service médical rendu.

Une fois le dossier accepté, le prix du médicament est fixé par le Comité Economique des Produits de Santé (CEPS) et le taux de remboursement est fixé par l'Union National des Caisses d'Assurance Maladie (UNCAM). A partir de ce moment, le médicament est produit de façon industrielle et est mis à disposition des patients via les réseaux de santé (pharmacies, médecins et hôpitaux).

Le début de la commercialisation du médicament correspond à celui de la phase IV. Cette phase correspond à la pharmacovigilance dans le monde réel avec une utilisation du médicament à grande échelle. Cette étape permet une meilleure connaissance du médicament (efficacité et tolérance). L'objectif est de détecter les effets indésirables rares non détectés lors des autres phases.

Après l'expiration du brevet, qui dure 10 ans, la vie du médicament breveté continue sous sa marque et sous le nom de son générique. Une fois le médicament passé dans le domaine public suite à la fin du brevet, d'autres compagnies pharmaceutiques ont la possibilité de produire ce médicament.

OBJECTIFS DE LA THESE

L'ICFEp demeure un problème majeur de santé publique pour lequel aucun traitement efficace n'a été identifié. Les enjeux de la recherche sont de comprendre les mécanismes physiopathologiques afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et aussi de potentiels biomarqueurs. Toutefois, le manque de modèles animaux pertinents limite la compréhension des mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'ICFEp. A cela s'ajoute la difficulté à obtenir des biopsies cardiaques dans cette population de patients. En effet, les biopsies cardiaques, généralement réalisées lors de chirurgie ou de transplantation cardiaque, sont rares chez les patients ICFEp, en raison de leur âge avancé et de leur état multi-pathologique.

Ainsi, afin d'étudier cette pathologie en l'absence de biopsies cardiaques, il est nécessaire d'utiliser des modèles animaux.

C'est dans ce contexte, qu'à partir de 2010, l'équipe du laboratoire a développé un nouveau modèle animal d'ICFEp sur le rat. Pendant mes trois années de thèse, je me suis attachée à caractériser ce modèle animal qui surexprime le récepteur β_3 -AR au niveau des cellules endothéliales. Mon travail a consisté en l'identification de cibles thérapeutiques dans l'ICFEp, et il s'est articulé autour de trois axes.

Le premier objectif de ma thèse a été de comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'ICFEp et plus particulièrement au niveau de l'endothélium.

Le deuxième objectif a été d'identifier des biomarqueurs voir des cibles thérapeutiques.

Enfin le troisième objectif a été d'évaluer l'impact de l'alimentation sur l'expression du phénotype cardiaque dans notre modèle animal.

RESULTATS

1. Caractérisation d'un nouveau modèle d'ICFEp

1.1. Préambule

Au cours des deux dernières décennies, la proportion de patients présentant une ICFEp par rapport à une ICFeR est passée de 38 % à 54 % des cas d'IC (Oktay et al., 2013). La relation entre l'âge et la prévalence de l'ICFEp a été démontrée dans l'étude *Prevention of Renal and Vascular End-Stage Disease* (PREVEND), une étude épidémiologique communautaire menée en Europe (Brouwers et al., 2013). Les résultats de cette étude sont corroborés avec ceux de l'étude Framingham Heart Study (Lee et al., 2009). Cette proportion va continuer à augmenter en raison du vieillissement progressif de la population et de l'augmentation prévue de la prévalence de l'HTA, de l'obésité et du diabète (Dunlay et al., 2017; Mohammed et al., 2012; Savji et al., 2018; Shah et al., 2010). Bien que la prévalence de l'ICFEp augmente, il n'existe toujours pas de thérapie spécifique et efficace en raison d'un manque de compréhension de cette pathologie (Campbell et al., 2012; Redfield, 2016; Redfield et al., 2015). Ce manque de connaissances s'explique par le manque d'outils :

- absence de biopsies cardiaques de patients ICFEp car ils ne sont pas candidats à la transplantation, et les biopsies sont rarement pratiquées à cause de l'âge avancé des patients et de leurs états polyopathologiques,
- manque de modèles animaux représentatifs de la pathologie, et faisant consensus au sein de la communauté scientifique (Valero-Muñoz et al., 2017).

A ce jour, l'utilisation des modèles animaux reste l'une des seules options pour améliorer nos connaissances des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement de l'ICFEp.

La grande majorité des modèles animaux utilisés pour étudier de l'ICFEp sont des modèles souvent associés à une HTA sévère qui développent une insuffisance diastolique sur une courte période (Doggrell and Brown, 1998; Hicklin et al., 2020; Horgan et al., 2014). Cependant, malgré de nombreuses caractéristiques communes avec l'ICFEp, peu de patients souffrants d'ICFEp présentent une HTA aussi sévère et un développement aussi rapide de la pathologie.

Beaucoup d'autres modèles sont développés par l'association de comorbidités, décrite chez les patients souffrants d'ICFep, comme l'obésité, le diabète, le vieillissement ou une HTA modérée (Conceição et al., 2016; Horgan et al., 2014; Lourenço et al., 2018). Cependant très peu de modèles développent une ICFep en lien au vieillissement, alors que la prévalence de l'ICFep augmente fortement avec l'âge.

Ces dernières années, le rôle de l'inflammation au niveau de l'endothélium a été proposé comme un élément central dans la mise en place des mécanismes physiopathologiques induisant l'ICFep comme publié par Paulus et Tschöpe (Paulus and Tschöpe, 2013a). Des études plus approfondies ont mis en évidence l'implication de la voie NO/GMPc/PKG dans le développement de la dysfonction endothéliale et par conséquent de l'ICFep (Kovács, 2015).

Cette voie est activée par le récepteur $\beta_3\text{-AR}$ au niveau de l'endothélium. Il paraît dès lors intéressant d'étudier le rôle de ce récepteur dans l'ICFep (Moens et al., 2010; Yang and Tao, 2019). Et par ailleurs l'expression de ce récepteur est augmentée dans l'IC, appuyant d'autant plus l'intérêt d'étudier ce récepteur dans la pathologie.

C'est dans ce contexte que l'équipe UMR 1087 du Pr Chantal Gauthier a développé, dans le cadre du programme ANR (HFpEF-Beta3 ANR-13-BSV1-0003-01), un modèle de rat transgénique ($\text{Tg}\beta_3$) surexprimant le récepteur $\beta_3\text{-AR}$ humain ($\text{h}\beta_3\text{-AR}$) au niveau endothélial sous le promoteur *InterCellular Adhesion Molecule 2* ou molécule d'adhésion intercellulaire 2 (ICAM-2). La caractérisation hémodynamique préliminaire de ce modèle de rat a montré un phénotype cardiovasculaire proche de l'ICFep humaine. Ce modèle offre aussi la possibilité d'étudier l'impact de l'endothélium dans l'établissement de l'ICFep.

Afin de mieux compléter la caractérisation phénotypique du modèle plusieurs axes ont été empruntés :

(1) étudier les caractéristiques hémodynamiques à la fois *in vivo* (échocardiographie) et *ex vivo* (cœur isolé perfusé), pour déterminer l'influence du sexe, de l'évolution de la maladie avec le vieillissement et lors de tests d'effort,

(2) identifier les gènes impliqués dans l'établissement du phénotype cardiaque chez les animaux transgéniques par une étude transcriptomique au niveau cardiaque,

(3) explorer l'implication de l'endothélium cardiaque dans le développement de l'ICFEP et se concentrer sur les interactions entre le VG et l'endothélium cardiaque (ANR-ED-HFpEF). Nous déterminerons notamment le rôle du *NO et l'expression des différentes NOS au niveau cardiaque dans le développement de l'ICFEP.

1.2. Article 1 : La surexpression du récepteur β_3 – adrénergique induit une dysfonction diastolique chez le rat.

Les données complémentaires peuvent être trouvées en Annexe 1.

Overexpression of endothelial β_3 -adrenergic receptor induces diastolic dysfunction in rats

Justine Dhot^{1†}, Marine Ferron^{1†}, Valentine Prat^{1†}, Antoine Persello¹, David Roul¹, David Stévant¹, Damien Guijarro¹, Nicolas Piriou¹, Virginie Aillerie¹, Angélique Erraud¹, Gilles Toumaniantz¹, Morteza Erfanian¹, Angela Tesse¹, Amandine Grabherr¹, Laurent Tesson^{2,3}, Séverine Menoret^{2,3,4}, Ignacio Anegón^{2,3}, Jean-Noël Trochu¹, Marja Steenman¹, Michel De Waard^{1,5}, Bertrand Rozec¹, Benjamin Lauzier^{1*,‡} and Chantal Gauthier^{1†}

¹Université de Nantes, CHU Nantes, CNRS, INSERM, l'institut du thorax, Nantes, F-44000, France; ²Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR1064, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France; ³Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), CHU Nantes, Nantes, France; ⁴CNRS, SFR de Nantes, Nantes, France; ⁵LabEx 'Ion Channels, Science & Therapeutics', Nice, France

Abstract

Aims Diastolic dysfunction is common in cardiovascular diseases, particularly in the case of heart failure with preserved ejection fraction. The challenge is to develop adequate animal models to envision human therapies in the future. It has been hypothesized that this diastolic dysfunction is linked to alterations in the nitric oxide (*NO) pathway. To investigate this issue further, we investigated the cardiac functions of a transgenic rat model (Tg β_3) that overexpresses the human β_3 -adrenoceptor (h β_3 -AR) in the endothelium with the underlying rationale that the *NO pathway should be stimulated in the endothelium.

Methods and results Transgenic rats (Tg β_3) that express h β_3 -AR under the control of intercellular adhesion molecule 2 promoter were developed for a specific expression in endothelial cells. Transcriptomic analyses were performed on left ventricular tissue from 45-week-old rats. Among all altered genes, we focus on *NO synthase expression and endothelial function with arterial reactivity and evaluation of *NO and O₂^{•−} production. Cardiac function was characterized by echocardiography, invasive haemodynamic studies, and working heart studies. Transcriptome analyses illustrate that several key genes are regulated by the h β_3 -AR overexpression. Overexpression of h β_3 -AR leads to a reduction of Nos3 mRNA expression (−72%; $P < 0.05$) associated with a decrease in protein expression (−19%; $P < 0.05$). Concentration-dependent vasodilation to isoproterenol was significantly reduced in Tg β_3 aorta (−10%; $P < 0.05$), while *NO and O₂^{•−} production was increased. In the same time, Tg β_3 rats display progressively increasing diastolic dysfunction with age, as shown by an increase in the E/A filing ratio [1.15 ± 0.01 (wild type, WT) vs. 1.33 ± 0.04 (Tg β_3); $P < 0.05$] and in left ventricular end-diastolic pressure [5.57 ± 1.23 mmHg (WT) vs. 11.68 ± 1.11 mmHg (Tg β_3); $P < 0.05$]. In isolated working hearts, diastolic stress using increasing preload levels led to a 20% decrease in aortic flow [55.4 ± 1.9 mL/min (WT) vs. 45.8 ± 2.5 mL/min (Tg β_3); $P < 0.05$].

Conclusions The Tg β_3 rat model displays the expected increase in *NO production upon ageing and develops diastolic dysfunction. These findings provide a further link between endothelial and cardiac dysfunction. This rat model should be valuable for future preclinical evaluation of candidate drugs aimed at correcting diastolic dysfunction.

Keywords Diastolic dysfunction; Endothelium; Nitric oxide production; HFpEF; Transcriptome; β_3 -Adrenoceptor; Rat model

Received: 19 May 2020; Revised: 31 August 2020; Accepted: 15 September 2020

*Correspondence to: Benjamin Lauzier, Université de Nantes, l'institut du thorax, Inserm UMR 1087/CNRS UMR 6291, IRS-UN, 8 quai Moncousu, BP 70721, 44007 Nantes Cedex 1, France. Tel: +33 2 28 08 01 57. Email: benjamin.lauzier@univ-nantes.fr

[†]These authors contributed equally to this work.

^{**} These authors co-directed this work.

Introduction

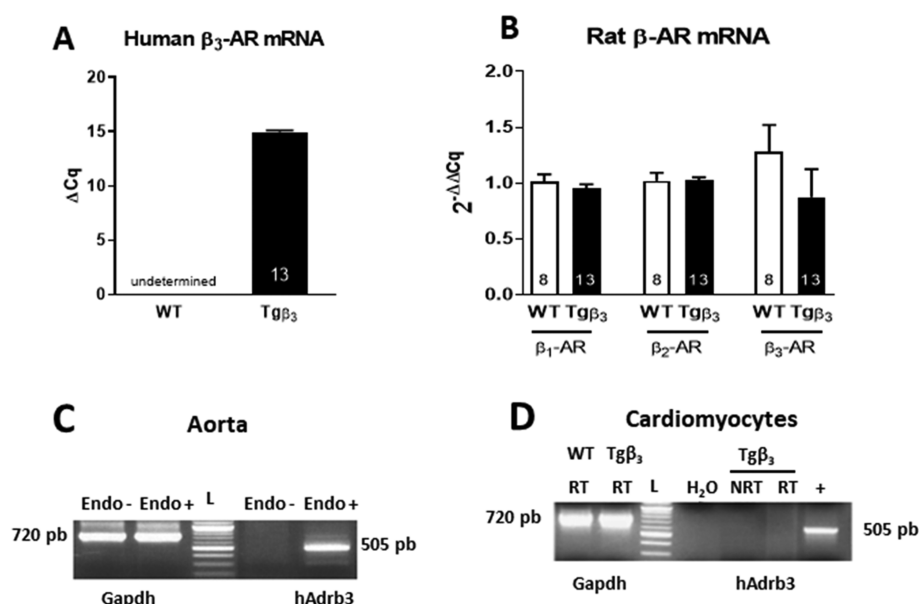
The high prevalence, mortality, and health costs associated with heart failure (HF) make it a major public health issue. Several terminologies exist to classify patients with HF according to their ejection fraction (EF).^{1,2} At present, patients with HF with preserved EF (HFpEF) are more difficult to manage clinically due to the complexity of the phenotypes underlying this pathology. Indeed, several co-morbidities are described in HFpEF patients, such as high blood pressure, obesity, diabetes, atrial fibrillation, ageing, and the influence of gender on the disease, all of which complicate diagnosis and the identification of effective therapeutic targets.³ The common feature of all HFpEF phenotypes is diastolic dysfunction with altered relaxation and increased filling pressures.⁴ The early phase of diastolic dysfunction is generally asymptomatic. When patients become symptomatic, they show a decrease in their tolerance to exercise or to stress conditions leading to cardiac decompensation.⁵ Because HFpEF remains a poorly understood pathology with no treatment to improve patient survival, it is important to develop animal models that best recapitulate the human phenotypes. Such HFpEF models may in turn help understand how diastolic dysfunction is generated over time within this pathology and provides hope for accelerated drug discovery. Basic and clinical studies have highlighted that the endothelium plays a role in the pathophysiology of HFpEF and the observed diastolic dysfunction.^{6,7} Endothelial cells may be a key factor in the development of the diastolic dysfunction with a significant involvement of nitric oxide (*NO) and *NO synthase (NOS).

Indeed, Schiattarella *et al.* showed that an increase in iNOS activity and expression can drive the diastolic dysfunction of HFpEF through an increase in *NO production.⁸ Considering the fact that *NO production is mainly due to Gαi-*NO-cGMP activation and that this pathway is coupled to the expression and activity of β₃-adrenergic receptors (β₃-AR),^{9,10} we decided to investigate how overexpression of this receptor in the endothelium may influence *NO production and whether it may lead to a new and original model of HFpEF. For that purpose, we have generated a rat model overexpressing the human β₃-AR (hβ₃-AR) within endothelial cells (Tgβ₃), and we evaluated how it impacted *NO production and myocardial function. We demonstrate that the excessive *NO production is indeed associated with a progressive alteration of diastolic function upon ageing.

Materials and methods

All animal experimental protocols were approved by the Pays de la Loire Ethical Committee and were performed in accordance with the French law on animal welfare, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Pub. No. 85-23, revised 2011), and the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. In functional protocols, both male and female animals were investigated. All experimental procedures performed are available in detail in the Supporting Information.

Figure 1 β-Adrenergic receptor transcript expression. Transcript levels of hβ₃-AR mRNA (A) and rat β₁-AR, β₂-AR, and β₃-AR mRNA (B), in wild-type (WT) (*n* = 8) and Tgβ₃ (*n* = 13) rats. Reverse transcription PCR assays were performed on whole heart, and de-endothelialized or intact aorta tissue extracts (C), and isolated cardiomyocytes (D). hAdrb3, human β₃-AR. Data are expressed as mean ± standard error of the mean, **P* < 0.05.



Results

Rat model overexpressing human β_3 -adrenoceptor in endothelial cells

To confirm cardiac $h\beta_3$ -AR expression in our model, quantitative reverse transcription PCR analyses were conducted on whole-heart extract samples. Our assays showed a high level of $h\beta_3$ -AR mRNA in Tg β_3 whole-heart samples (Figure 1A). Expression of the transgene did not impact the expression of endogenous β_1 -AR, β_2 -AR, and β_3 -AR (Figure 1B). To confirm endothelial expression of the inserted gene, reverse transcription PCR was performed on aortas and isolated cardiomyocytes. The presence of $h\beta_3$ -AR transcripts was confirmed in entire Tg β_3 aortas (Figure 1C), while it was not detected in wild-type (WT) aortic tissue nor in the aortas of Tg β_3 rats in which the endothelium was removed. Conversely, $h\beta_3$ -AR transcripts were absent in isolated cardiomyocytes (Figure 1D), confirming that $h\beta_3$ -AR mRNA could be expressed in the endothelial cells of Tg β_3 rats, but further study should be performed to confirm. These results agree with the use of the intercellular adhesion molecule 2 promoter that should restrict expression to the endothelium. Analyses of protein expression levels using a β_3 -AR-specific antibody illustrate that protein expression increased over time between 15 and 45 weeks of age (Supporting Information, Figure S1). Like many others, this antibody does not distinguish between the rat and human isoforms of β_3 -AR, but it is reasonable to assume that the increased level of protein expression is due to the transgene.

Transcriptomic analyses of transgenic rats

In order to investigate the impact of $h\beta_3$ -AR overexpression in the endothelium on cardiac gene expression, we turned towards transcriptomic analyses. Using significance analysis of microarrays with false discovery rate = 0.05, we identified 241 transcripts that were differentially expressed in Tg β_3 rats compared with WT rats (Supporting Information, '45wk males differential'). Among these genes, 15 of them were up-regulated, whereas 226 other ones were down-regulated (Figure 2A). The data indicate an up-regulation of several transcripts involved in collagen formation and in the regulation of the metabolism in Tg β_3 rats. The main down-regulated transcripts were involved in the reactive oxygen pathway and the immune system. Further analyses of the data by gene set enrichment analysis underlined these findings: when using all gene sets as input, 49 gene sets were significantly up-regulated in Tg β_3 rats and 78 gene sets were significantly down-regulated. Most of the up-regulated gene sets were associated with the extracellular matrix, indicating an activation of fibrotic pathways in the transgenic rats (Figure 2B and 2C) that display the most significant gene sets. To focus on the

*NO pathway, gene set enrichment analysis was also performed on endothelial NOS (eNOS)-associated and inducible NOS (iNOS)-associated gene sets only. When analysing eNOS-associated gene sets, a positive association was found with the CHEN_LVAD_OF_FAILING_FAILING_HEART_UP gene set (Figure 2D). Although this gene set does not contain eNOS, eNOS was found to be up-regulated in the corresponding study.¹¹ Analysis of iNOS-associated gene sets pointed towards the implication of reactive oxygen biosynthesis (Figure 2E). We decided to perform a more in-depth analysis of the eNOS pathways in this animal model.

Transgenic rats display a dysfunction in endothelial nitric oxide synthase pathways

Imbalance in nitric oxide synthase pathway

To investigate the potential physiopathological mechanism involved in our model, mRNA analyses of neuronal NOS (nNOS) (Nos1) and iNOS (Nos2) were performed on WT and Tg β_3 rats on the left ventricle. The analysis shows no significant alteration concerning the mRNA levels for Nos1 and Nos2 (Figure 3A and 3B), but we detected a significant decrease in eNOS (Nos3) mRNA expression in Tg β_3 rats (Figure 3C). Interestingly, the protein levels of nNOS and iNOS were significantly increased in Tg β_3 rats (Figure 3D and 3E). In contrast, the eNOS levels were decreased (Figure 3F), without an alteration of the phosphorylation level of eNOS (Figure 3G). We conclude that overexpression of $h\beta_3$ -AR should lead to a significant imbalance in NOS pathways.

Impairment of nitric oxide production and endothelial dysfunction

To confirm a possible endothelial dysfunction linked to these changes in NOS expression levels, we investigated the vascular function in response to aortic isoproterenol in Tg β_3 animals. We found that the response to isoproterenol was reduced in Tg β_3 animals (Figure 4A). This decrease in vasorelaxation is counterintuitively related to an increase in *NO and $O_2^{\cdot-}$ productions in these aortas (Figure 4B and 4C), suggesting that the balance of expression of NOS subtypes in the endothelium plays an important role.

All these contextual findings, at both the transcriptome and protein levels, represented strong incentives to carefully investigate potential cardiac pathologies in this rat model.

Transgenic rats develop a phenotype similar to age-related diastolic dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction models

General characteristics

To examine the impact of the overexpression of $h\beta_3$ -AR in the endothelium on the rat cardiac phenotype, echocardiography

Figure 2 Transcriptome analysis on the left ventricle. Hierarchical clustering of microarray data based on the 241 transcripts differentially expressed between $Tg\beta_3$ and wild-type (WT) rats (A). Gene expression is presented as a coloured matrix, where each row represents a gene and each column represents a sample. Green, black, and red correspond to lower values, median values, and higher values, respectively. (B–E) Gene set enrichment analysis enrichment plots and heat maps based on gene expression profiles from $Tg\beta_3$ and WT rats. Only genes from the gene set enrichment analysis core enrichment are displayed in the heat maps.

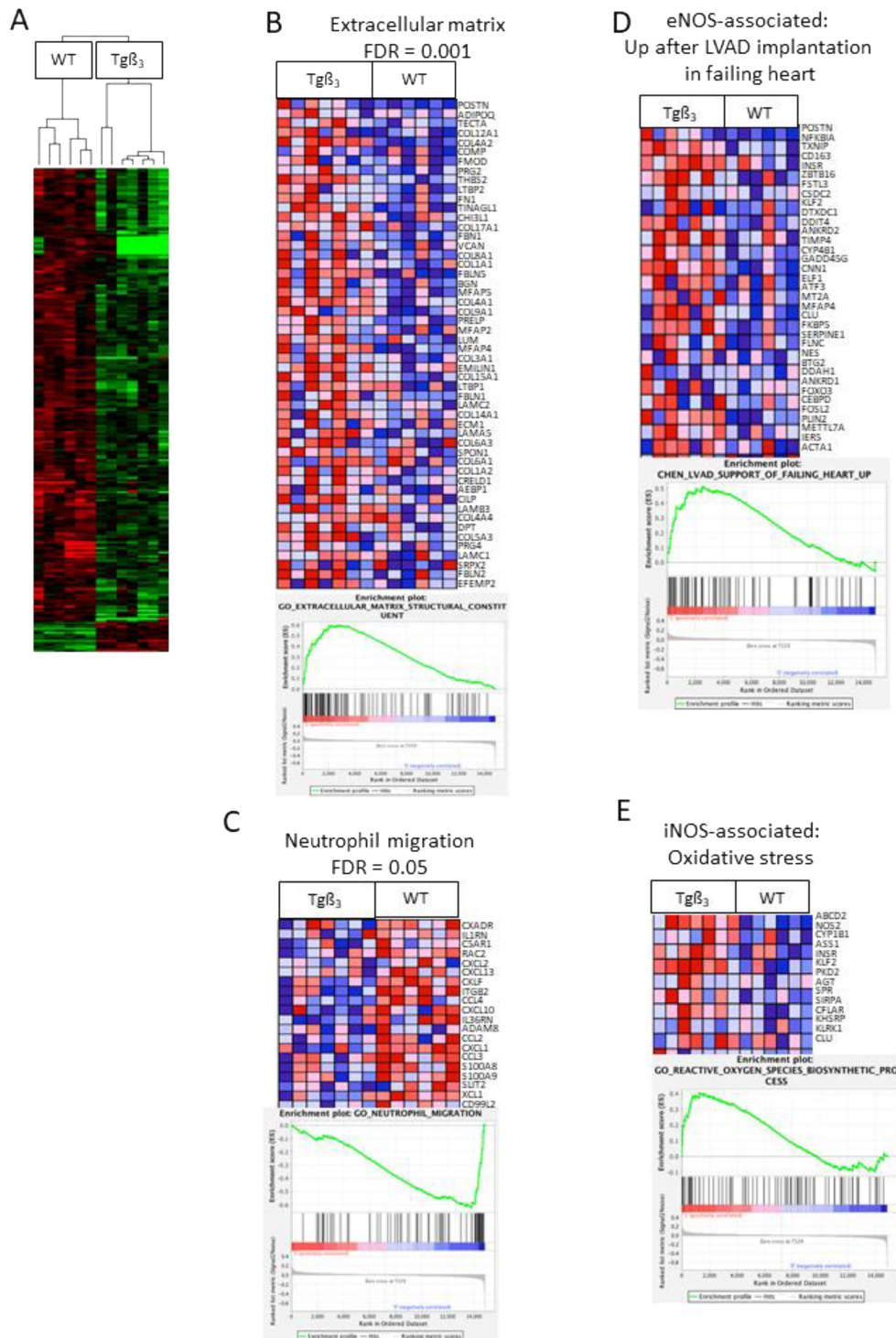
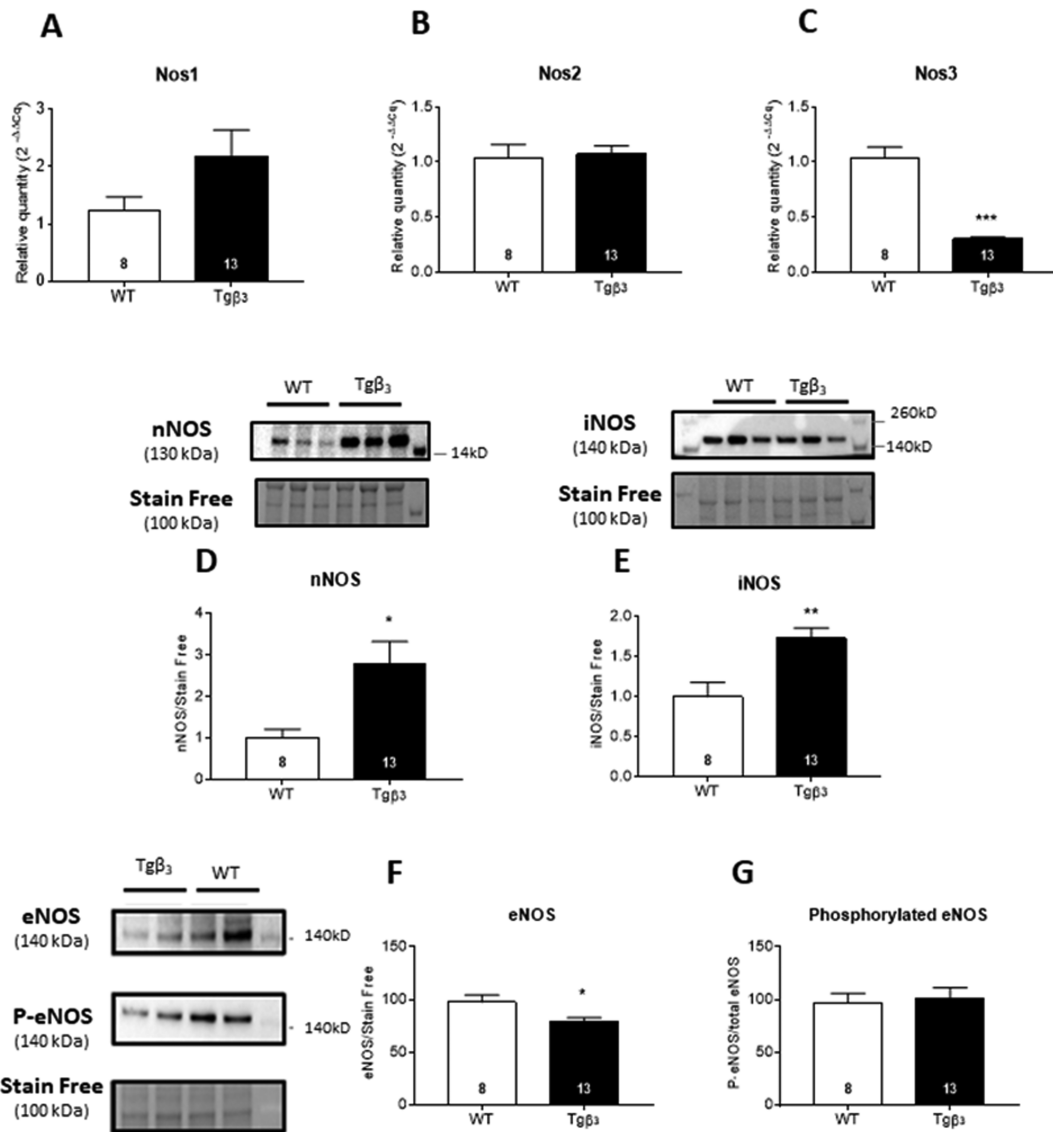


Figure 3 Changes in NOS transcripts and protein expression and phosphorylation on the left ventricle. nNOS (Nos1) (A), iNOS (Nos2) (B), and nNOS (Nos3) (C) mRNA levels in wild-type (WT) ($n = 8$) and $Tg\beta_3$ ($n = 13$) rats. Western blot analysis was performed to study total expression of nNOS (D), iNOS (E), and eNOS (F) and level of phosphorylated Ser1177 eNOS (G). Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. * $P < 0.05$.



was performed at 15, 30, and 45 weeks of age. This investigation was performed on animals of both sexes, as well as on WT animals. We also investigated ovariectomized (OVX) female rats. We observed that WT and $Tg\beta_3$ female rats—either OVX or non-OVX—display no alteration in their cardiac function during ageing (Supporting Information, *Tables S3* and *S4* and *Figure S2*). In contrast, $Tg\beta_3$ male rats do show a diastolic dysfunction that develops during ageing and that persists. Because of this sex difference in the manifestation of cardiac defects, we decided to focus our attention on male animals. Therefore, only data from male WT and $Tg\beta_3$ rats will be presented in this manuscript.

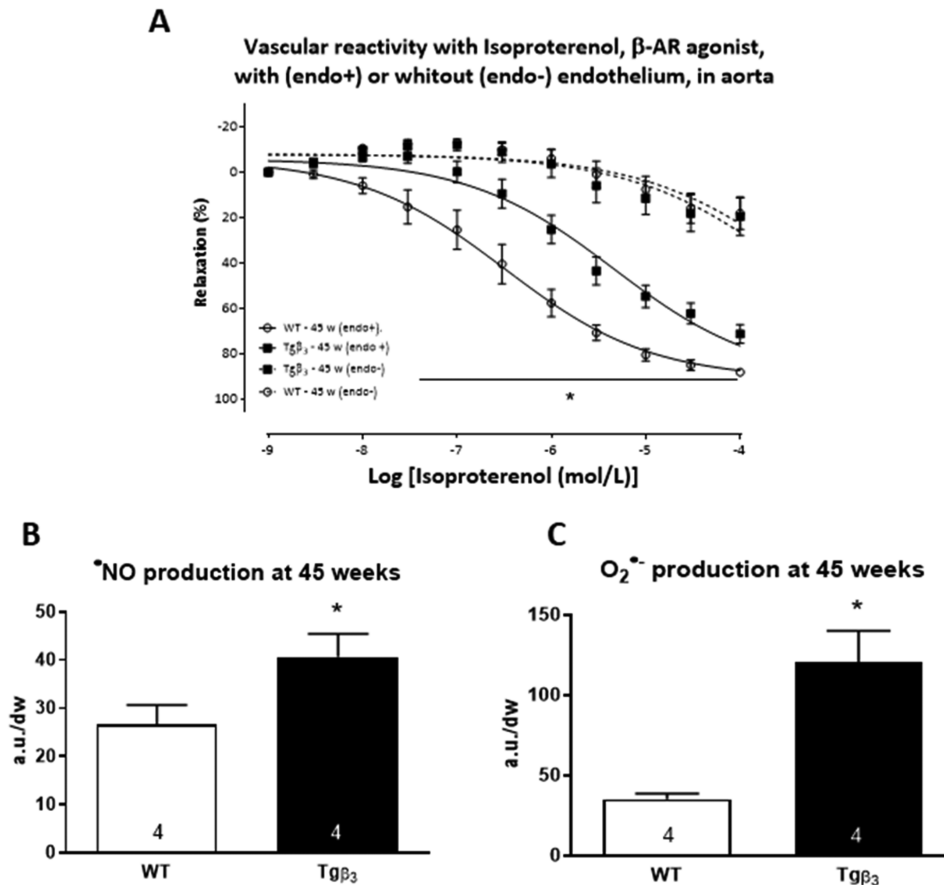
With regard to other physiological parameters, WT and $Tg\beta_3$ male rats at 45 weeks of age presented similar weight

and tibia length (Supporting Information, *Tables S5* and *S6*). Blood pressure assessment revealed that $Tg\beta_3$ male rats did not show any significant modification in systolic (136.3 ± 4.0 mmHg for WT vs. 133.4 ± 4.6 mmHg for $Tg\beta_3$), diastolic (95.3 ± 2.0 mmHg for WT vs. 92.7 ± 3.1 mmHg for $Tg\beta_3$), or mean arterial pressure (109.0 ± 2.6 mmHg for WT vs. 106.3 ± 3.5 mmHg for $Tg\beta_3$) (Supporting Information, *Table S7*).

In vivo investigation of cardiac function

Systolic function, evaluated by the calculated EF, remained normal in both WT and $Tg\beta_3$ rats regardless of age (*Figure 5A*). Repeated measurements over time of early-to-late filing ratios (E/A) revealed that diastolic dysfunction is exacerbated

Figure 4 Vascular reactivity analysis. Concentration–response curves to isoproterenol were obtained by measuring contractility of wild-type (WT) ($\circ$, $n = 4-5$) and $Tg\beta_3$ ($\blacksquare$, $n = 4-5$) aorta (A), in the presence (plain line) or absence (dotted line) of endothelium. *NO (B) and $O_2^{\bullet-}$ (C) production were evaluated by electron paramagnetic resonance spectroscopy in aorta at 45 weeks of age in WT ($n = 4$) and $Tg\beta_3$ ($n = 4$). Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. * $P < 0.05$.



with a restrictive filling pattern over age. Indeed, at 30 and 45 weeks of age, the E/A ratio was significantly increased in $Tg\beta_3$ rats (1.08 ± 0.04 for WT vs. 1.26 ± 0.05 for $Tg\beta_3$; $P < 0.05$ for 30 weeks; and 1.15 ± 0.01 for WT vs. 1.33 ± 0.04 for $Tg\beta_3$; $P < 0.05$ for 45 weeks) (Figure 5B). This increase in the E/A ratio was associated with the dilation of the left atrium (LA) (Figure 5C). Also, at 45 weeks of age, $Tg\beta_3$ rats showed a significant increase in left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) (5.57 ± 1.23 mmHg for WT vs. 11.68 ± 1.11 mmHg for $Tg\beta_3$; $P < 0.05$, Figure 5D). The E/A ratio is low: it is because the heart rhythm is high as a consequence of low anaesthesia, which favours fusion of E wave and A wave and artificially lowers the E/A ratio.

Ex vivo investigation of cardiac function

Intrinsic heart function was evaluated using an isolated working heart model. Under physiological conditions, $Tg\beta_3$ hearts showed a significantly higher LVEDP (+50%), an increase in heart rate (+8%), and a decrease in systolic pressure (−9%) compared with WT animals. *In vivo* blood pressure values did not differ between the groups. The difference between

in vivo and *ex vivo* results is explain by the devoid of any neurohormonal modulation in isolated heart, and one cannot exclude that some circulating factors may, *in vivo*, modulate the cardiac function. Diastolic function of $Tg\beta_3$ hearts was altered, as illustrated by the decrease in dp/dt_{min} (+10%), in relaxation time (+14%), and in diastolic filling period (−28%). The systolic function, systolic ejection period, and contraction time were not statistically different, while dp/dt_{max} was decreased (−10%) in $Tg\beta_3$ hearts. Altogether, these modifications were not associated with cardiac output and coronary flow modification in $Tg\beta_3$ hearts (Supporting Information, Table S8).

Ex vivo investigation of cardiac function under stress conditions

Response to β -adrenergic receptor stimulation

To study the β -adrenergic receptor stimulation occurring during stress-induced catecholamine release on cardiac function, the effect of increasing concentrations of isoproterenol was investigated on isolated WT and $Tg\beta_3$ working hearts. The

Figure 5 Cardiac function. Evolution of systolic function (A) and diastolic function (B) between 15 and 45 weeks measured by echocardiography. Evaluation of the area of the left atrium at 45 weeks by echocardiography (C). Left ventricular pressure measurements at 45 weeks of wild-type (WT) ($n = 7$) and $Tg\beta_3$ ($n = 8$) rats (D). Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. * $P < 0.05$.

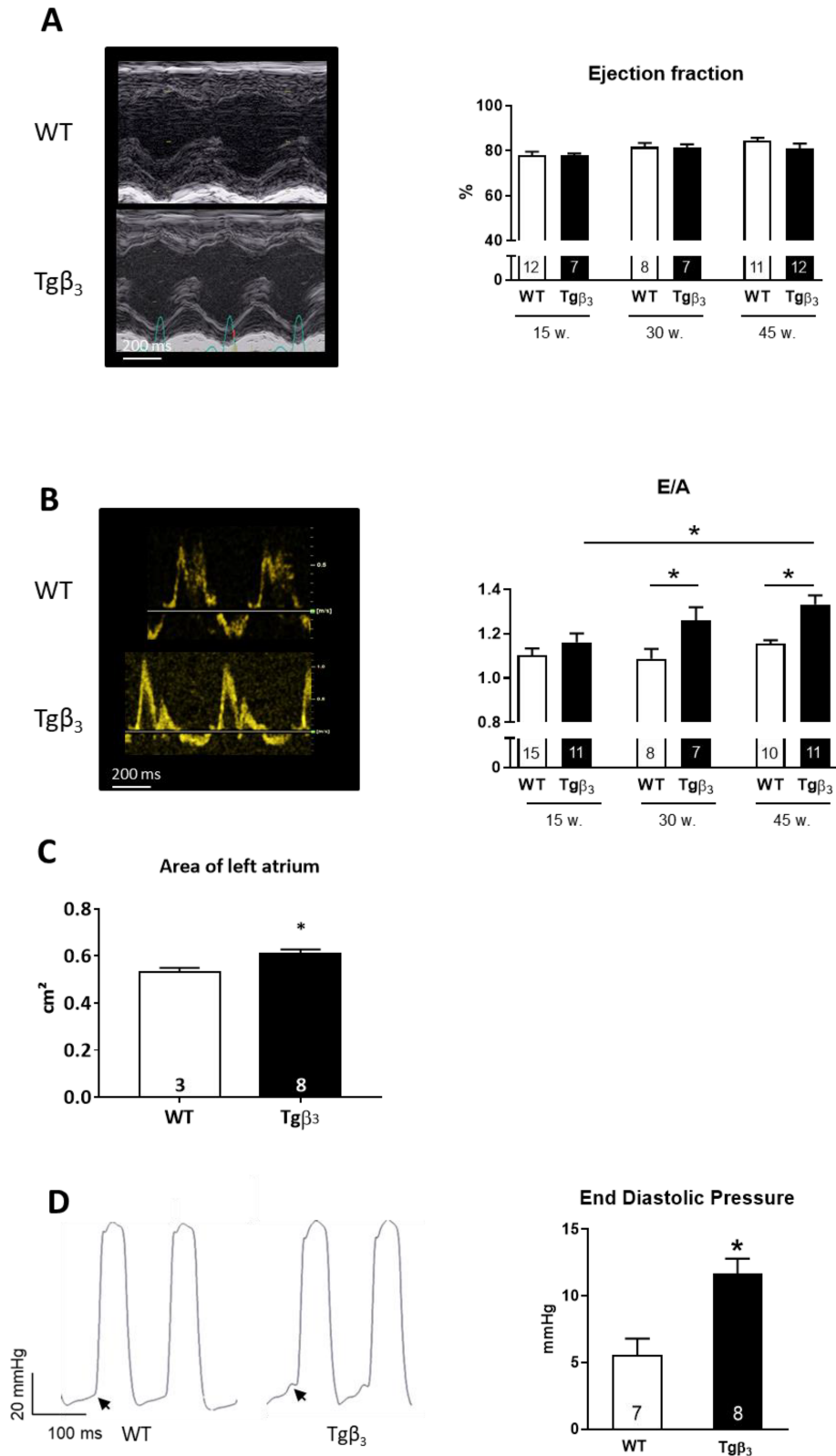
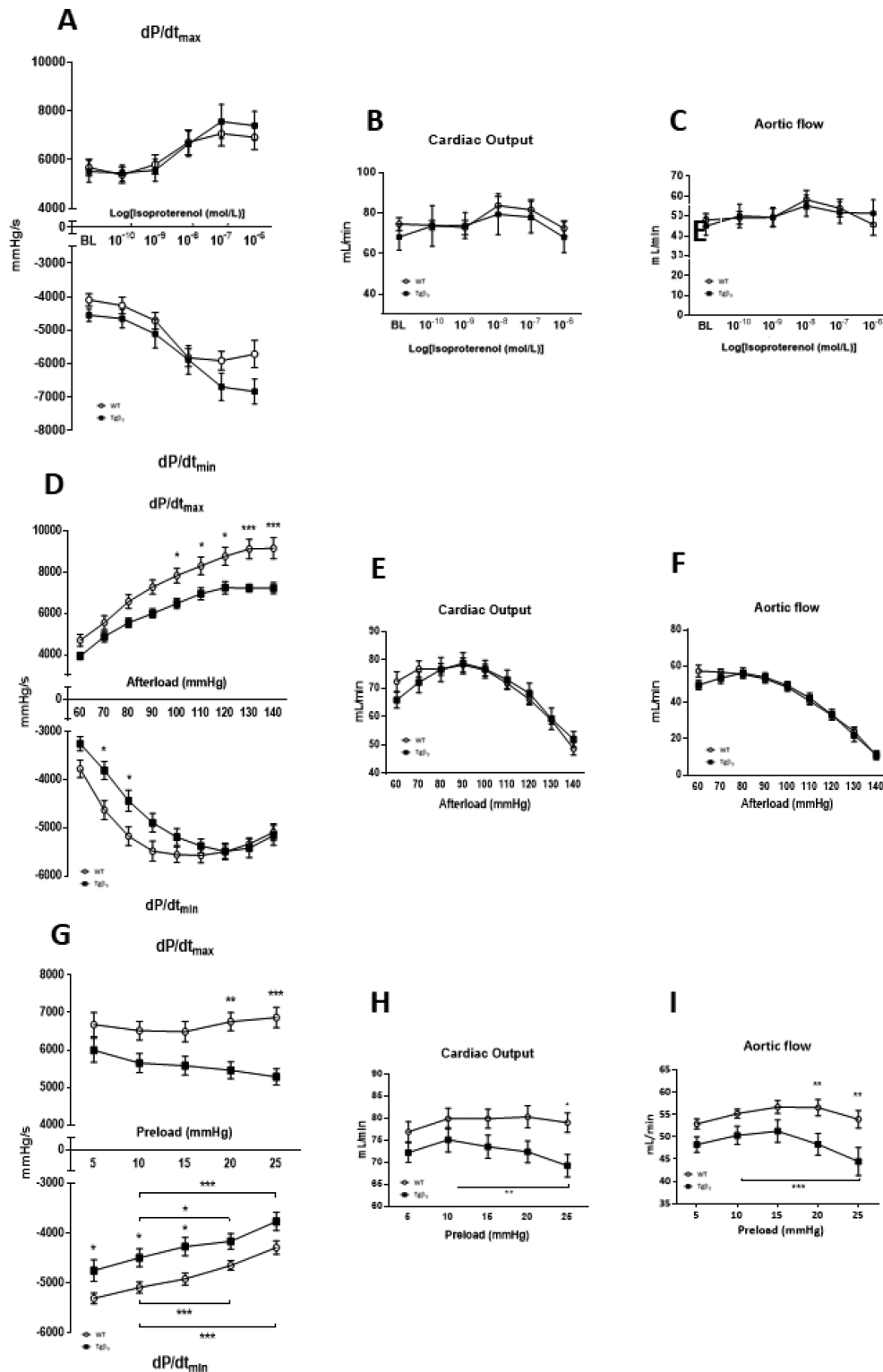


Figure 6 Isoproterenol concentration–response curve in isolated working heart. $dP/dt_{\max}$, $dP/dt_{\min}$ (A), cardiac output (B), and aortic flow (C) were measured on wild-type (WT) ($\circ$, $n = 8$) and $Tg\beta_3$ ($\blacksquare$, $n = 8$). The effects of an afterload increase on cardiac function of WT ($\circ$, $n = 8$) and $Tg\beta_3$ ($\blacksquare$, $n = 8$) rats were evaluated on $dP/dt_{\max}$ and $dP/dt_{\min}$ rate (D), cardiac output (E), and aortic flow (F). The effects of a preload increase on cardiac function of WT ($\circ$, $n = 12$) and $Tg\beta_3$ ($\blacksquare$, $n = 13$) rats were evaluated through the study of $dP/dt_{\max}$ and $dP/dt_{\min}$ rate (G), cardiac output (H), and aortic flow (I). BL, baseline. Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ for WT vs. $Tg\beta_3$.



effects of isoproterenol were similar in both Tg β_3 and WT hearts in terms of cardiac contraction and relaxation rate (Figure 6A), cardiac output (Figure 6B), and aortic flow (Figure 6C). These results are in agreement with the similar transcription levels of β_1 -AR and β_2 -AR expressed in both Tg β_3 and WT rats (Figure 1B).

Response to pressure variation

An afterload increase was applied to reproduce *ex vivo* increases in peripheral resistance and to stimulate the systolic adaptation. From 100 mmHg, adaptation in contractility of Tg β_3 hearts was impaired (for $dP/dt_{\max}$ at 14 mmHg: 9167 ± 510 mmHg/s for WT vs. 7234 ± 263 mmHg/s for Tg β_3 ; $P < 0.05$) (Figure 6D). Cardiac outputs and aortic flows were similar in WT and Tg β_3 hearts (Figure 6E and 6F). In another study, a diastolic stress was applied by gradually increasing the preload in order to mimic pulmonary arterial pressure increase or on venous return. The preload increase induced a significant $dP/dt_{\min}$ elevation in both WT and Tg β_3 . However, WT hearts showed significantly elevated contractility, while the adaptive response of Tg β_3 hearts was impaired (Figure 6G). In the presence of a high preload (25 mmHg), the ejection capacity of Tg β_3 hearts was significantly decreased. We observed a 14% decrease in cardiac output (79.0 ± 2.2 mL/min for WT vs. 69.2 ± 2.6 mL/min for Tg β_3 ; $P < 0.05$) (Figure 6H) and a decrease in aortic flow (Figure 6I). These results reveal that diastole duration and the heart capacity to work were blunted at the highest levels of preload in Tg β_3 hearts.

Discussion

Endothelial overexpression of h β_3 -AR in our model is associated with an endothelial dysfunction along with a slow development of diastolic function alteration, an impaired filling pattern, and an increase in LVEDP. *In vivo* blood pressure and body weight do not differ between the two groups, suggesting that the diastolic dysfunction is observed without the presence of co-morbidities (hypertension, obesity, etc.) contrary to many models that induce HFpEF. The subtle cardiac impairment was exacerbated during stress conditions, especially when the diastolic function was challenged. Our data suggest that this animal model, with endothelial-localized alterations in signalling, develops diastolic dysfunction and endothelial alteration. Tg β_3 rats display a progressive diastolic dysfunction, illustrated by the elevation of their E/A ratio with ageing, associated with an increased LVEDP. The slight but significant increase in collagen deposition (Supporting Information, Figure S3) observed in our model suggests that other parameters are implicated in left ventricular (LV) stiffness and diastolic dysfunction.¹² The absence of cardiac remodeling in male rats Tg β_3 may be surprising. Indeed, the study of Shah *et al.*¹³ have shown a high prevalence of hypertrophy of the left ventricle in HFpEF patient with diastolic dysfunction.

They also rely on the fact that hypertrophy of the LA is correlated with diastolic dysfunction. Ventricular hypertrophy is not associated with diastolic dysfunction in our model. But according to Figure 5C, hypertrophy of the LA is, however, well present in animals with diastolic dysfunction. In addition, other studies in animal models have shown that in the severe stages of diastolic dysfunction, an enlargement of the LA, potentially attributed to a LA–LV decoupling, has been observed.^{14,15} Our study suggests that, in the early development of diastolic dysfunction, the onset of left atrial enlargement may be anterior to ventricular hypertrophy. Indeed, at 60 weeks, a sign of LV hypertrophy was observed with an increase of LV anterior wall depth (Supporting Information, Figure S4A).

It has been described that patients with diastolic dysfunction become pathological when the heart is submitted to a chronic or acute stress. In order to evaluate whether diastolic dysfunction is worsened under stress conditions, we used the working heart technique. This technique allowed us to study the impact of stress specifically on the systolic function, with an increase in afterload, or on the diastolic function, with an increase in preload and a pharmacological stress with isoproterenol. Tg β_3 rat hearts displayed an alteration in contractility only when submitted to a high afterload level (130–140 mmHg). Alteration in contractility was not observed in echocardiographic study due to lower *in vivo* blood pressure (90–100 mmHg). These results suggest that if Tg β_3 rat had hypertension, then they probably would develop a systolic dysfunction. After an increase in preload, Tg β_3 hearts exhibit contractility and relaxation impairment, associated with a significant alteration of cardiac output. During exercise tolerance tests, HFpEF patients develop a strong LVEDP increase, and a decrease in stroke volume, indicating that diastolic function is severely worsened under stress conditions.¹⁶ These results are in accordance with John *et al.* showing that diastolic function in patients is sensitive to preload variations¹⁷ and indicate that heart function in these rats is altered specifically when diastolic function is evaluated.

The present study raises questions concerning the involvement of β_3 -AR in diastolic dysfunction development. In the literature, β_3 -AR has been reported to couple with NOS and to involve the $\text{G}\alpha\text{i}-^*\text{NO}-\text{cGMP}$ pathway,^{10,18,19} which are known to be cardioprotective,²⁰ at least at a physiological expression level of β_3 -AR. Earlier studies have indeed reported a beneficial effect of β_3 -AR stimulation when expressed in cardiomyocytes (not endothelial cells): in acute disorders or anti-hypertrophic effect at an early stage of HF.²¹ In acute disorders, it appears to produce a decrease in myocardial damage by decreasing mitochondrial permeability transition pore opening²² or an anti-hypertrophic effect at an early stage of HF.²¹ We report a deleterious effect of the long-term endothelial overexpression of β_3 -AR suggesting a potential cell-specific effect of this pathway. Conversely, however, an elevated expression of β_3 -AR, maybe associated to an increase in adrenergic stimulation, seems to be

detrimental. At the end-stage of HF, β_3 -AR overexpression is associated with cardiac dysfunction,^{23,24} suggesting that the cardiac effects of β_3 -AR are much more complex than initially thought. In atrial fibrillation, recent studies show that chronic stimulation of β_3 -AR may lead to iNOS uncoupling, leading to oxidative stress and atrial remodelling and atrial fibrillation.^{25–27} In this report, the specific endothelial overexpression of the transgene allows us to suggest that the endothelium acts as a critical actor in the development of diastolic dysfunction. We have shown that the long-term overexpression of β_3 -AR causes alterations in the $\bullet$ NO pathway and in calcium handling of endothelial cells. We have identified changes in NOS expression, in particular an increase in nNOS and iNOS levels occurring concomitantly with a decrease in eNOS expression level. The nNOS overexpression associated with β_3 -AR stimulation in stress condition has been already described.²⁸ The decrease in eNOS expression can tentatively be explained by the increase of inflammation and $O_2^{\bullet-}$ expression that leads to eNOS uncoupling.²⁹ We also investigated the expression levels of cyto/chemokines in plasma and did not observe fluctuations of the concentrations of IL-6 and IL-1 β . We observed a difference, but not significant, in the mean value of TNF- α , suggesting a potential low grade of inflammation at 45 weeks in Tg β_3 rats (Supporting Information, Figure S5). The hypothetic low grade of inflammation could explain the increase of iNOS expression observed at 45 weeks and the eNOS uncoupling leading to endothelial dysfunction over the time.³⁰ But considering our results on inflammation, we cannot confirm the increase of inflammation and further study needs to be performed. This change in expression balance between the different NOS subtypes is associated with a significant increase in $\bullet$ NO production in endothelial cells. This overproduction was not due to the increase in the aortic internal diameters (Supporting Information, Figure S6). β_3 -AR is believed to couple to eNOS and nNOS in endothelial cells, and an alteration in the relative expression levels of nNOS and eNOS in the β_3 -AR overstimulation condition can explain the overproduction of $\bullet$ NO.³¹ We postulate that, in the long run, the change in type of NOS coupling to β_3 -AR and/or the overproduction of $\bullet$ NO, as a result of this change or of the overexpression of β_3 -AR, is associated with a depletion in cellular energy store via different mechanisms such as the activation of poly-ADP ribose polymerase.³² iNOS increase overexpression via β_3 -AR could explain the endothelial dysfunction. Such a process may lead to a progressive alteration of the cardiac function. In addition, the overproduction of $\bullet$ NO has been associated with an increase in nitrosylation and reactive oxygen species production as supported by the increase in $O_2^{\bullet-}$ production in our model. Our results substantiate the involvement of the endothelium in the development of diastolic dysfunction as suggested earlier by Paulus and Tschöpe.⁷ Recently, several studies confirmed the implication of endothelial cells, in both preclinical and clinical studies.⁶ Indeed, Ebner *et al.*

demonstrated a diastolic dysfunction in a model of vascular eNOS dysfunction, suggesting that our animal model could be relevant to understand the pathophysiology underlying HFpEF.³³ Hence, we show that our rat model has important characteristics in common with HFpEF such as preserved EF, diastolic dysfunction, effort intolerance (*ex vivo* studies), age impact, and some structural anomalies as fibrosis, even though it lacks LV hypertension, and we did not observe alterations in renal or pulmonary vascular beds (Supporting Information, Figure S7). The transcriptomic study also confirmed interesting parallels between our model and HFpEF. We confirmed an alteration in the expression of the genes involved in collagen deposition, inflammation, metabolism, and calcium pathways (Supporting Information, Figure S8): a set of pathways also involved in the pathophysiology of diastolic dysfunction. The alteration in the $\bullet$ NO pathway, described in our model, might be linked potentially to other physiopathological mechanisms such as reactive oxygen production. The absence of cardiac dysfunction in female rats, including after ovariectomy, raises interesting questions regarding the implication of gender in our model. This issue was investigated in a recent study and concluded that in the HFpEF model with high-fat diet + N^G -nitro-L-arginine methyl ester, the female sex is protective.³⁴ Now the issue will be to understand the mechanisms involved in this protection of the female sex in preclinical models. In HFpEF, treatment response seems to be different between women and men confirming the importance to study female and male animal in preclinical models.^{35–37} The fact that only male rats develop the pathology is not fully understood in our study. Compared with other studies, we suppose that the addition of co-morbidities in female rats could increase the phenotype of diastolic dysfunction.

Even if Tg β_3 rats have some similarities with HFpEF in humans: diastolic dysfunction, preserved EF, *in vivo* exercise intolerance (Supporting Information, Figure S4B), and a sign of cardiac hypertrophy (Supporting Information, Figure S4A), Tg β_3 rats cannot be considered as a perfect HFpEF model because of the absence of pulmonary oedema (Supporting Information, Figure S4C) or more severe cardiac remodelling. However, the model remains valuable to understand the physiopathology of diastolic dysfunction and may become a greater model of HFpEF provided that other co-morbidities as hypertension or obesity are added to the phenotype.

In conclusion, the Tg β_3 rat is an animal model of diastolic dysfunction. The pathology develops with ageing with a progressive filling impairment at rest, associated with diffuse fibrosis. Moreover, our data demonstrated a similar cardiac response of Tg β_3 rats and HFpEF model when submitted to a stretch-induced stress, illustrating an altered adaptation to stress conditions. This new model confirms that an alteration of the physiology of endothelial cell signalling can lead to diastolic dysfunction. Our new rat model of diastolic dysfunction may help unravel part of the mechanisms involved

in diastolic dysfunction genesis. More importantly, it will help the pharmaceutical industry test some of their most promising leads for the prevention of the pathology.

Acknowledgements

We thank the Therassay platform for their technical assistance, Adrian Chess for careful English revision, and Corinne Mandin for secretarial assistance.

Conflict of interest

None declared.

Funding

This study was supported by 'Agence Nationale de la Recherche' (ANR-13-BSV1-0003, ANR-11-LABX-0015, Paris, France), 'Fédération Française de Cardiologie' (Paris, France), 'Fondation de l'Avenir pour la Recherche Médicale Appliquée' (Paris, France), 'Fondation de France' (Paris, France), 'Fondation Génavie' (Nantes, France), the 'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale' (Paris, France), and Fondation Progreffe (Nantes, France).

Supporting information

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

Figure S1. β_3 -AR antibody (A). Western-Blot of β_3 -AR protein at 15 and 45 weeks (B). β_3 -AR protein level at 15 (Tg β_3 ; n = 4) and 45 weeks (Tg β_3 ; n = 5) (C). Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Figure S2. LV pressure measurements of 45 weeks WT (n = 8) and Tg β_3 (n = 9) rats (A). Evolution of diastolic function between 15 and 45 weeks measured by echocardiography (B). Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Figure S3. Fibrosis quantification. (A) Cryosections were stained with picrosirius red and viewed under polarized light to distinguish type I (red) from type III (green) collagen. Representative views from WT and Tg β_3 samples are presented. (B) Changes in Col3a1 transcript in WT (n = 7) and Tg β_3

(n = 12) rats. (C) Changes in Col1a1 transcript in WT (n = 7) and Tg β_3 (n = 13) rats. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *: $P < 0.05$.

Figure S4. (A) Left ventricular anterior wall depth in diastole at 60 weeks. (B) Treadmill tolerance test with the evaluation of travelled distance. (C) Lung weight (wet/dry). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *: $P < 0.05$.

Figure S5: (A) Rat IL-1 β plasma concentration (B) Rat TNF- α plasma concentration (C) Rat IL-6 plasma concentration. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *: $P < 0.05$.

Figure S6. (A) Vascular density in myocardium (B) Mean area aorta. Representative views from WT and Tg β_3 samples are presented. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *: $P < 0.05$.

Figure S7. Vascular injuries of lungs and kidneys from WT (n = 8) and Tg β_3 (n = 9) rats. (A) Renal injuries were evaluated using the glomerular score (B). Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Figure S8. Protein expression of PLB (A), of serine 16 phosphorylated PLB (B), of SERCA2 (C), of RyR2 (D) and of serine 2,808 phosphorylated RyR2 (E) all evaluated on whole heart tissue extracts at 45 weeks in WT (n = 4–8) and Tg β_3 (n = 10). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *: $P < 0.05$.

Table S1. Primers used for RT-qPCR experiments.

Table S2. Antibodies used for Western-Blot analyses.

Table S3. Cardiovascular parameters of WT and Tg β_3 females at 45 weeks of age. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Table S4. Arterial blood pressure values measured for WT and Tg β_3 female rats at 45 weeks. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Table S5. Physiological and cardiovascular parameters recorded for WT and Tg β_3 males at 45 weeks of age. E/A: early-to-late filing ratio. Data are expressed as mean $\pm$ SEM *: $P < 0.05$.

Table S6. Cardiovascular parameters from WT and Tg β_3 males at 15 and 30 weeks of age. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Table S7. Arterial blood pressure values measured for WT and Tg β_3 male rats at 45 weeks of age measured by arterial catheterism. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Table S8. Characteristics of perfused isolated working hearts under physiological condition in WT and Tg β_3 male rats at 45 weeks of age. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Afterload was set at 80 mmHg and preload at 12.5 mmHg *: $P < 0.05$.

45wk males differential

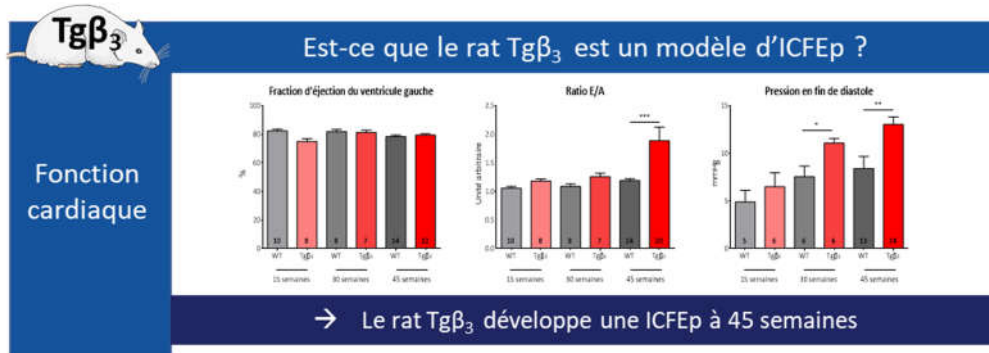
References

1. Dunlay SM, Roger VL, Redfield MM. Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol* 2017; **14**: 591–602.
2. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, Gonzalez-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA, Jessup M. 2016 ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Rev Espanola Cardiol Engl Ed* 2016; **69**: 1167.

3. Obokata M, Reddy YNV, Borlaug BA. Diastolic dysfunction and heart failure with preserved ejection fraction: understanding mechanisms by using noninvasive methods. *JACC Cardiovasc Imaging* 2020; **13**: 245–257.
4. Westermann D, Kasner M, Steendijk P, Spillmann F, Riad A, Weitmann K, Hoffmann W, Poller W, Pauschinger M, Schultheiss HP, Tschöpe C. Role of left ventricular stiffness in heart failure with normal ejection fraction. *Circulation* 2008; **117**: 2051–2060.
5. Jeong E-M, Dudley SC. Diastolic dysfunction. *Circ J Off J Jpn Circ Soc* 2015; **79**: 470–477.
6. ter Maaten JM, Damman K, Verhaar MC, Paulus WJ, Duncker DJ, Cheng C, van Heerebeek L, Hillege HL, Lam CSP, Navis G, Voors AA. Connecting heart failure with preserved ejection fraction and renal dysfunction: the role of endothelial dysfunction and inflammation. *Eur J Heart Fail* 2016; **18**: 588–598.
7. Paulus WJ, Tschöpe C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol* 2013; **62**: 263–271.
8. Schiattarella GG, Altamirano F, Tong D, French KM, Villalobos E, Kim SY, Luo X, Jiang N, May HI, Wang ZV, Hill TM, Mammen PPA, Huang J, Lee DI, Hahn VS, Sharma K, Kass DA, Lavandro S, Gillette TG, Hill JA. Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction. *Nature* 2019; **568**: 351–356.
9. Gauthier C, Leblais V, Kobzik L, Trochu JN, Khandoudi N, Bril A, Balligand JL, le Marec H. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest* 1998; **102**: 1377–1384.
10. Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D, le Marec H. Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest* 1996; **98**: 556–562.
11. Chen Y, Park S, Li Y, Missov E, Hou M, Han X, Hall JL, Miller LW, Bache RJ. Alterations of gene expression in failing myocardium following left ventricular assist device support. *Physiol Genomics* 2003; **14**: 251–260.
12. Zile MR, Baicu CF, Ikonomidis JS, Stroud RE, Nietert PJ, Bradshaw AD, Slater R, Palmer BM, Van Buren P, Meyer M, Redfield M. Myocardial stiffness in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: contributions of collagen and titin. *Circulation* 2015; **131**: 1247–1259.
13. Shah AM, Shah SJ, Anand IS, Sweitzer NK, O'Meara E, Heitner JF, Sopko G, Li G, Assmann SF, McKinlay S, Pitt B, Pfeffer MA, Solomon SD, TOPCAT Investigators. Cardiac structure and function in heart failure with preserved ejection fraction: baseline findings from the echocardiographic study of the Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure with an Aldosterone Antagonist trial. *Circ Heart Fail* 2014; **7**: 104–115.
14. Wallner M, Eaton DM, Berretta RM, Borghetti G, Wu J, Baker ST, Feldsott EA, Sharp TE, Mohsin S, Oyama MA, von Lewinski D. A feline HFpEF model with pulmonary hypertension and compromised pulmonary function. *Sci Rep* 2017; **7**: 1–13.
15. Zakeri R, Moulay G, Chai Q, Ogut O, Hussain S, Takahama H, Lu T, Wang XL, Linke WA, Lee HC, Redfield MM. Left atrial remodeling and atrioventricular coupling in a canine model of early heart failure with preserved ejection fraction. *Circ Heart Fail* 2016; **9**: e003238.
16. Borlaug BA, Vojtech M, Russell Stuart D, Kristy K, Karel P, Becker Lewis C, Kass DA. Impaired chronotropic and vasodilator reserves limit exercise capacity in patients with heart failure and a preserved ejection fraction. *Circulation* 2006; **114**: 2138–2147.
17. John JM, Haykowsky M, Brubaker P, Stewart K, Kitzman DW. Decreased left ventricular distensibility in response to postural change in older patients with heart failure and preserved ejection fraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; **299**: H883–H889.
18. Trapanese DM, Liu Y, McCormick RC, Cannavo A, Nanayakkara G, Baskharoun MM, Jarrett H, Woitek FJ, Tillson DM, Dillon AR, Recchia FA. Chronic β_1 -adrenergic blockade enhances myocardial β_3 -adrenergic coupling with nitric oxide-cGMP signaling in a canine model of chronic volume overload: new insight into mechanisms of cardiac benefit with selective β_1 -blocker therapy. *Basic Res Cardiol* 2015; **110**: 456.
19. Birenbaum A, Tesse A, Loyer X, Michelet P, Andriantsitohaina R, Heymes C, Riou B, Amour J. Involvement of β_3 -adrenoceptor in altered β -adrenergic response in senescent heart: role of nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide. *Anesthesiol J Am Soc Anesthesiol* 2008; **109**: 1045–1053.
20. Jones SP, Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2006; **40**: 16–23.
21. Belge C, Hammond J, Dubois-Deruy E, Manoury B, Hamelet J, Beauloye C, Markl A, Pouleur AC, Bertrand L, Esfahani H, Jnaoui K. Enhanced expression of β_3 -adrenoceptors in cardiac myocytes attenuates neurohormone-induced hypertrophic remodeling through nitric oxide synthase. *Circulation* 2014; **129**: 451–462.
22. García-Prieto J, García-Ruiz JM, Sanz-Rosa D, Pun A, García-Alvarez A, Davidson SM, Fernández-Friera L, Nuno-Ayala M, Fernández-Jiménez R, Bernal JA, Izquierdo-García JL, Jimenez-Borreguero J, Pizarro G, Ruiz-Cabello J, Macaya C, Fuster V, Yellon DM, Ibanez B. β_3 adrenergic receptor selective stimulation during ischemia/reperfusion improves cardiac function in translational models through inhibition of mPTP opening in cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol* 2014; **109**: 422.
23. Moniotte S, Kobzik L, Feron O, Trochu JN, Gauthier C, Balligand JL. Upregulation of β_3 -adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation* 2001; **103**: 1649–1655.
24. Morimoto A, Hasegawa H, Cheng H-J, Little WC, Cheng C-P. Endogenous β_3 -adrenoceptor activation contributes to left ventricular and cardiomyocyte dysfunction in heart failure. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 2004; **286**: H2425–H2433.
25. Dong J, Zhao J, Zhang M, Liu G, Wang X, Liu Y, Yang N, Liu Y, Zhao G, Sun J, Tian J, Cheng C, Wei L, Li Y, Li W. β_3 -Adrenoceptor impairs mitochondrial biogenesis and energy metabolism during rapid atrial pacing-induced atrial fibrillation. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2016; **21**: 114–126.
26. Sheng L, Shen Q, Huang K, Liu G, Zhao J, Xu W, Liu Y, Li W, Li Y. Upregulation of β_3 -adrenergic receptors contributes to atrial structural remodeling in rapid pacing induced atrial fibrillation canines. *Cell Physiol Biochem* 2012; **30**: 372–381.
27. Wang X, Wang R, Liu G, Dong J, Zhao G, Tian J, Sun J, Jia X, Wei L, Wang Y, Li W. The β_3 adrenergic receptor agonist BRL37344 exacerbates atrial structural remodeling through iNOS uncoupling in canine models of atrial fibrillation. *Cell Physiol Biochem* 2016; **38**: 514–530.
28. Zhang Z, Ding L, Jin Z, Gao G, Li H, Zhang L, Zhang L, Lu X, Hu L, Lu B, Yu X. Nebivolol protects against myocardial infarction injury via stimulation of beta 3-adrenergic receptors and nitric oxide signaling. *PLoS ONE* 2014; **9**: e98179.
29. Karbach S, Wenzel P, Waisman A, Munzel T, Daiber A. eNOS uncoupling in cardiovascular diseases—the role of oxidative stress and inflammation. *Curr Pharm Des* 2014; **20**: 3579–3594.
30. Schiattarella GG, Rodolico D, Hill JA. Metabolic inflammation in heart failure with preserved ejection fraction. *Cardiovasc Res* 2020; **22**: 139.
31. Moens AL, Yang R, Watts VL, Barouch LA. Beta 3-adrenoreceptor regulation of nitric oxide in the cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol* 2010; **48**: 1088–1095.
32. Liu VWT, Huang PL. Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc Res* 2008; **77**: 19–29.
33. Ebner AKN, Brandt AZB, Weinert SPD, Ebner BAA, Wunderlich CWunderlich CE-AA, Strasser RH. Endothelial nitric oxide synthase-induced hypertrophy and Vascular dysfunction contribute to the left ventricular dysfunction in

- caveolin-1^{-/-} mice. *Can J Cardiol* 2017; **33**: 1716–1724.
34. Tong D, Schiattarella GG, Jiang N, May HI, Lavandro S, Gillette TG, Hill JA. Female sex is protective in a preclinical model of heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation* 2019; **140**: 1769–1771.
35. Solomon SD, Rizkala AR, Lefkowitz MP, Shi VC, Gong J, Anavekar N, Anker SD, Arango JL, Arenas JL, Atar D, Ben-Gal T, Boytsov SA, Chen CH, Chopra VK, Cleland J, Comin-Colet J, Duengen HD, Echeverría Correa LE, Filippatos G, Flammer AJ, Galinier M, Godoy A, Goncalvesova E, Janssens S, Katova T, Køber L, Lelonek M, Linssen G, Lund LH, O'Meara E, Merkely B, Milicic D, Oh BH, Perrone SV, Ranjith N, Saito Y, Saraiva JF, Shah S, Seferovic PM, Senni M, Sibulo AS Jr, Sim D, Sweitzer NK, Taurio J, Vinereanu D, Vrtovec B, Widimský J Jr, Yilmaz MB, Zhou J, Zweiker R, Anand IS, Ge J, Lam CSP, Maggioni AP, Martinez F, Packer M, Pfeffer MA, Pieske B, Redfield MM, Rouleau JL, van Veldhuisen D, Zannad F, Zile MR, McMurray J. Baseline characteristics of patients with heart failure and preserved ejection fraction in the PARAGON-HF trial. *Circ Heart Fail* 2018; **11**: e004962.
36. Solomon SD, Rizkala AR, Gong J, Wang W, Anand IS, Ge J, Lam CSP, Maggioni AP, Martinez F, Packer M, Pfeffer MA, Pieske B, Redfield MM, Rouleau JL, van Veldhuisen DJ, Zannad F, Zile MR, Desai AS, Shi VC, Lefkowitz MP, McMurray JJV. Angiotensin receptor neprilysin inhibition in heart failure with preserved ejection fraction: rationale and design of the PARAGON-HF trial. *JACC Heart Fail* 2017; **5**: 471–482.
37. Borlaug BA, Anstrom KJ, Lewis GD, Shah SJ, Levine JA, Koepp GA, Givertz MM, Felker GM, LeWinter MM, Mann DL, Margulies KB. Effect of inorganic nitrite vs placebo on exercise capacity among patients with heart failure with preserved ejection fraction: the INDIE-HFpEF randomized clinical trial. *JAMA* 2018; **320**: 1764–1773.

Vue synoptique de l'approche scientifique



1.3. Discussion

L'un des premiers objectifs de cette étude était la caractérisation d'un modèle pertinent pour étudier l'ICFEP. En clinique, l'ICFEP se caractérise par une dysfonction diastolique sans altération de la FE. Cependant, il serait réducteur de se limiter uniquement à ces paramètres pour caractériser cette pathologie complexe. Les patients, majoritairement des femmes, sont souvent polypathologiques (HTA, diabète, obésité, maladie pulmonaire...) et d'un âge avancé. De plus l'altération de la fonction diastolique, caractérisée majoritairement par une augmentation de la PTD_{VG} et une hypertrophie cardiaque, est la conséquence d'une augmentation de la rigidité du myocarde et d'une altération de la fonction atriale. Il est donc quasiment impossible de prétendre à un modèle animal parfait au vu des nombreuses caractéristiques cliniques présentes chez les patients souffrant d'ICFEP. Si l'on se base sur l'étude de Valero-Muñoz *et al.*, de 2017, les modèles animaux doivent présenter plusieurs caractéristiques afin de confirmer une ICFEP : une FE préservée, une intolérance à l'effort, des œdèmes pulmonaires et une hypertrophie cardiaque concentrique (Valero-Muñoz *et al.*, 2017). Cependant, les modèles actuels présentent de nombreuses différences avec la clinique. A titre d'exemple, les modèles d'HTA comme le rat Dahl/SS présentent une HTA sévère, une rétention hydrique et une IC. Les troubles de la fonction diastolique observés dans ce modèle sont liés à une hypertrophie ventriculaire (Klotz *et al.*, 2006). Globalement, ce sont des modèles précoces d'ICFEP qui développent rapidement une altération de la fonction systolique sévère qui n'est pas retrouvée chez les patients. Dans notre modèle, le parti pris a été de ne pas utiliser les comorbidités comme précurseur de l'ICFEP pour favoriser le développement sur le long terme de l'ICFEP. Le modèle Tg β_3 se base sur la surexpression du récepteur h β_3 -AR au niveau des cellules endothéliales sous la dépendance du promoteur ICAM-2. Les rats mâles Tg β_3 développent progressivement une dysfonction diastolique à partir de 30 semaines qui devient significativement différente à partir de 45 semaines. L'augmentation du ratio E/A, sans altération de la FE, l'augmentation de la PDT_{VG} et la présence d'une fibrose cardiaque confirment la présence d'une dysfonction diastolique caractéristique de l'ICFEP. Cependant, l'absence de remodelage ventriculaire, l'absence d'altération de la fonction cardiaque chez les femelles et l'absence d'altérations pulmonaires sont des points limitants de notre modèle d'étude si l'on se base sur les critères de l'étude de Valero-Muñoz *et al.*.

L'absence de remodelage cardiaque dans le modèle $Tg\beta_3$ n'est pas un point négatif pour autant. En effet, l'étude d'Hahn *et al.* démontre, sur des biopsies endo-myocardiques de patients ICFEP, l'absence d'hypertrophie cardiaque dans 12 % des cas (Hahn et al., 2020). Cette étude met en avant la grande variabilité des altérations retrouvées au niveau du myocarde des patients. Il est donc important de tenir compte de cette variabilité dans les modèles animaux. Dans le cas du rat $Tg\beta_3$, l'hypertrophie cardiaque n'est pas présente à 45 semaines comme pour certains patients. Néanmoins à 60 semaines, lorsque la dysfonction diastolique est plus marquée, un remodelage cardiaque est observable chez les rats $Tg\beta_3$. L'hypertrophie est une altération qui apparaît avec le temps et lors de stade plus avancé de la pathologie. L'avantage de ce modèle, en comparaison à la grande majorité des autres modèles décrits dans la littérature, est que l'apparition de la dysfonction diastolique se fait lentement avec l'âge. Cela permet d'étudier les différentes phases de la progression de la pathologie.

L'absence d'altération de la fonction cardiaque chez les rattes $Tg\beta_3$ est un point critique dans notre modèle. En effet, à 45 semaines, les rattes ne présentent pas d'ICFEP alors qu'en clinique les femmes sont majoritairement concernées par l'ICFEP. Ces résultats sont néanmoins explicables : les rattes ne présentent pas le profil hormonal d'une femme ménopausée. Les œstrogènes ayant un effet anti-apoptotique et anti-hypertrophique la pertinence de nos résultats est limitée (Knowlton and Lee, 2012). La forte prévalence de l'ICFEP chez les femmes âgées a conduit à l'hypothèse que de faibles niveaux d'œstrogènes contribuent à la physiopathologie de l'ICFEP (Scantlebury and Borlaug, 2011). Pour tester si les œstrogènes affectent les résultats observés chez les rattes, nous avons pratiqué une ovariectomie. Hormis des altérations minimales de la fonction systolique, aucune altération de la fonction diastolique n'a été mise en évidence chez les femelles ovariectomisées. Une autre étude sur un modèle animal développant une ICFEP a aussi mis en évidence des effets protecteurs associés au sexe féminin. Le degré de fibrose tissulaire et d'hypertrophie des cardiomyocytes était significativement plus faible chez les souris femelles que chez leurs homologues mâles ICFEP (Tong Dan et al., 2019).

L'étude sur le rat Tg β_3 montre que les rattes développent un phénotype cardiaque significativement atténué par rapport à leurs homologues mâles et que cet effet protecteur n'est pas médié par les hormones sexuelles femelles. Les limites de notre étude sont notamment que nous n'avons étudié que de jeunes animaux et que l'ovariectomie est un substitut imparfait de la ménopause physiologique. De plus, nous n'avons pas étudié l'impact des hormones sexuelles mâles. Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats dans d'autres modèles précliniques ICFep et en clinique avec des études bien conçues.

Des analyses transcriptomiques complémentaires à 15 semaines et à 45 semaines chez les animaux mâles ont été réalisées. On observe tout d'abord que les animaux mâles et femelles ont deux profils d'expression bien distincts. Chez les femelles, 183 gènes sont exprimés de manière différentielle entre les rats contrôles (WT) et Tg β_3 , contre 241 pour les mâles. De plus, on peut noter que mâles et femelles partagent seulement 16 gènes dont l'expression est modifiée chez les animaux transgéniques. Cette étude confirme le fort dimorphisme sexuel existant dans notre modèle.

Le deuxième objectif étant d'identifier les mécanismes physiopathologiques sous-jacents, une étude de transcriptomique a été réalisée sur les VG des WT et Tg β_3 . Les gènes retrouvés comme altérés chez les animaux malades sont impliqués dans les grandes fonctions que sont l'inflammation, le cycle du Ca²⁺, le métabolisme et la fibrose cardiaque. Etant donné le rôle important de l'endothélium dans l'ICFep (Paulus and Tschöpe, 2013b), les NOS ont été majoritairement étudiées.

Les résultats mettent en évidence une augmentation de l'expression de la iNOS. Etant donné le lien entre la iNOS et l'inflammation, cela suggère une augmentation, au moins bas grade, de l'inflammation. L'inflammation reste au centre des mécanismes physiopathologiques de l'ICFep ce qui renforce l'idée que le rat Tg β_3 est un modèle intéressant pour l'étude de l'ICFep. En outre, l'augmentation de l'expression de la iNOS a déjà été décrite dans un autre modèle d'ICFep, un modèle HTA et obésité (Schiattarella et al., 2019). Principalement connue pour son rôle dans l'inflammation, l'iNOS est aussi une enzyme métabolique (Anavi and Tirosh, 2020). Le lien entre l'activité de l'iNOS et l'insulino-résistance, par exemple, pourrait être pertinent dans l'ICFep (Carvalho-Filho et al., 2005; Ropelle et al., 2013).

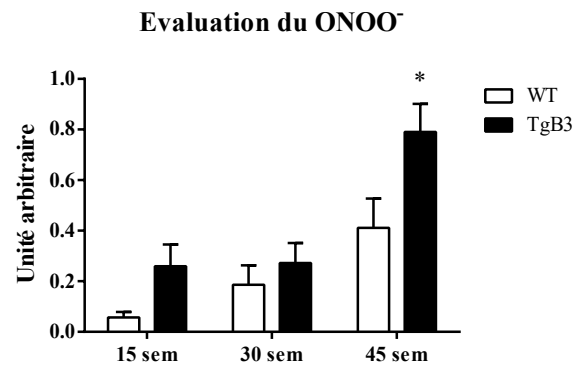
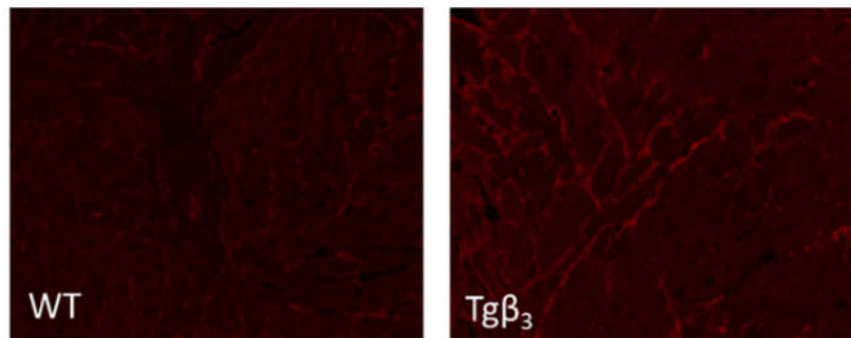


Figure 35 : Evaluation du ONOO⁻ au niveau cardiaque

Evaluation du ONOO⁻ à 15, 30 et 45 semaines chez les animaux WT et Tgβ₃. WT : rat contrôle ; Tgβ₃ : rat transgénique ; ONOO⁻ : peroxynitrite ; sem : semaines.

En effet, le stress oxydant, lié à l'inflammation et à la iNOS, dans le muscle squelettique a été associé à des modifications protéiques clés jouant un rôle dans la signalisation de l'insuline dans le contexte du vieillissement et de l'obésité. La iNOS aura donc un rôle central dans les mécanismes physiopathologiques observés.

L'augmentation de l'expression de la nNOS et la diminution de l'expression de la eNOS sont aussi impliquées dans les mécanismes pathologiques observés chez le rat $Tg\beta_3$ (Niu et al., 2012). Des études ont mis en évidence que la production du *NO par la nNOS est impliquée dans l'altération de la fonction contractile des cœurs diabétique et sénéscent (Amour et al., 2007; Birenbaum et al., 2008). La diminution de l'expression de la eNOS serait potentiellement liée à son découplage. Ce découplage a pour conséquence une augmentation du stress oxydant au niveau cardiaque. L'augmentation de la production de $l'O_2^{\bullet-}$, associé au *NO , provoque une augmentation de la production du $ONOO^-$ (Figure 35). Le $ONOO^-$ est décrit comme délétère au niveau de la cellule. En effet le $ONOO^-$ induit une inhibition de la voie GCs/GMPc/PKG, empêchant ainsi l'action anti-hypertrophique de cette voie. Il induit aussi une augmentation de l'activité du NF κ B. L'activité augmentée de ce facteur nucléaire provoque une élévation des cytokines inflammatoires. Dans le rat $Tg\beta_3$, le $ONOO^-$ pourrait participer aux altérations de la fonction diastolique sur le long terme (Zhazykbayeva et al., 2020). Comme pour la iNOS, le découplage de la eNOS a déjà été décrit dans l'ICFEp et serait même une potentielle piste thérapeutique de l'ICFEp.

A la suite de cette étude, différentes pistes ont été plus approfondies au travers d'autres études :

- étude de la dysfonction endothéliale et de son rôle dans la dysfonction diastolique lié à l'ICFEp,
- étude de l'impact des œstrogènes sur la fonction cardiaque,
- identification de cibles thérapeutiques dans l'ICFEp.

2. Dysfonction endothéliale et ICFEp

2.1. Préambule

L'IC est la cause la plus fréquente d'hospitalisation chez les personnes de plus de 65 ans, et son incidence continue d'augmenter. Malgré une meilleure prise en charge médicale, le pronostic est sombre, en particulier pour l'ICFEp qui a un taux de mortalité de 65 % à 5 ans (Roger, 2013). Contrairement à l'ICFEr, le diagnostic précoce de l'ICFEp reste un défi et le traitement standard actuel ne parvient pas à améliorer le pronostic (Ponikowski et al., 2016b). L'utilisation des β -bloquants ou des antagonistes des récepteurs à l'angII, des médicaments qui ciblent principalement le cœur, ont permis une réduction de la mortalité en cas d'ICFEr, mais pour l'ICFEp les résultats ont toujours été décevants (Conraads et al., 2012; Pitt et al., 2014; Yusuf et al., 2003). Afin d'identifier une thérapie ciblée de l'ICFEp il est important de comprendre les mécanismes physiopathologiques (De Keulenaer et al., 2017; Lim et al., 2015).

Outre l'âge avancé, le sexe féminin et la sédentarité, l'ICFEp est associée à des comorbidités telles que l'HTA, le diabète, l'obésité, l'HTAP et l'IRC (Bhatia et al., 2006). Les fonctions cardiaque et extracardiaques associées à ces comorbidités peuvent devenir inadaptées et conduire au syndrome d'ICFEp. Cette inadaptation se caractérise par des changements structurels tels que l'hypertrophie et la fibrose myocardiques. Le dysfonctionnement des cellules endothéliales dans l'ensemble du système cardiovasculaire a été mis en avant comme lien entre les comorbidités et la physiopathologie de l'ICFEp (Borlaug, 2014). Cela s'appuie sur les preuves expérimentales de Brutsaert *et al.* dans les années 1980, selon lesquelles les interactions entre les cellules endothéliales et les cardiomyocytes influencent directement la fonction diastolique (Brutsaert and Sys, 1989). La dysfonction endothéliale constitue donc une cible thérapeutique intéressante en raison de sa réversibilité à un stade précoce (Celermajer, 1997; Suganya et al., 2016).

En 2013, Paulus et Tschöpe ont émis l'hypothèse que la dysfonction endothéliale joue un rôle causal dans le développement de l'ICFEp (Paulus and Tschöpe, 2013a). Ils postulent que les pathologies associées à l'ICFEp induisent une inflammation bas grade, conduisant à une dysfonction endothéliale microvasculaire coronaire (Collier et al., 2011).

L'inflammation bas grade est une inflammation chronique, systémique et sans signe d'infection qui se caractérise par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires [interleukine-6 (IL-6), IL-1 β , tumor necrosis factor α (TNF α)] par les cellules immunitaires à des niveaux relativement bas mais persistants (Lommi et al., 1997; Torre-Amione et al., 1996). L'inflammation bas grade a été confirmée chez des patients ICFEp (Franssen et al., 2016b; Kalogeropoulos et al., 2016; Shah et al., 2016; Westermann et al., 2011) ainsi que dans de nombreux modèles animaux (Franssen et al., 2016b; Schiattarella et al., 2019).

La dysfonction endothéliale est majoritairement caractérisée par une infiltration sous-endothéliale de cellules immunitaires. En effet l'altération des protéines structurales des cellules endothéliales entraîne une perméabilité accrue de la paroi endothéliale qui ne joue plus son rôle de barrière (Lam and Brutsaert, 2012). L'infiltration, notamment des macrophages activés, dans le tissu de différents organes, a pour conséquence une augmentation de la production de matrice extracellulaire, une altération des voies de communication paracrine des cellules et une raréfaction de la micro-vascularisation.

Toujours d'après Paulus et Tschöpe, la dysfonction endothéliale serait accompagnée d'une réduction de la biodisponibilité du $\cdot\text{NO}$. La réduction de la signalisation du $\cdot\text{NO}$ par l'endothélium dysfonctionnel influence alors les cardiomyocytes et les fibroblastes cardiaques adjacents par la voie GCs-GMPc-PKG (Brutsaert, 2003). Un taux de PKG myocardique plus faible finit par entraîner des changements cardiaques fonctionnels et structurels associés à l'ICFEp (van Heerebeek et al., 2012). De plus les ROS jouent un rôle important, réagissant avec le $\cdot\text{NO}$ pour former du ONOO^- toxique, réduisant aussi la biodisponibilité du $\cdot\text{NO}$ (Pacher et al., 2007).

Cette perturbation de l'homéostasie endothéliale peut conduire à une altération de la vasorelaxation, à un état pro-inflammatoire et prothrombotique. Etant donné que la production du NO est notamment médiée par l'activation du β_3 -AR via les eNOS ou nNOS (Gauthier et al., 1998a; Trapanese et al., 2015a), le rat Tg β_3 semble un modèle adapté à l'étude du rôle de la dysfonction endothéliale dans l'ICFEp. L'objectif de cette étude est de comprendre l'implication de la dysfonction endothéliale dans l'établissement de l'ICFEp et les mécanismes physiopathologiques associés.

2.2. Article 2 : La dysfonction endothéliale : conséquence ou cause de la dysfonction diastolique

Endothelial dysfunction: as a trigger to diastolic dysfunction?

Justine Dhot, Angela Tesse, Mélanie Burban, Virginie Aillerie, Angélique Erraud, David Stevant, Céline Menguy, Vincent Sauzeau, Bertrand Rozec, Michel De Waard, Chantal Gauthier, Benjamin Lauzier.

En cours de préparation

**Endothelial dysfunction: Consequences or causes to diastolic
dysfunction?**

Justine Dhot¹, Angela Tesse¹, Mélanie Burban¹, Virginie Aillerie¹, Angélique Erraud¹,
David Stevant¹, Céline Menguy¹, Vincent Sauzeau¹, Bertrand Rozec¹, Michel De Waard¹,
Chantal Gauthier¹, Benjamin Lauzier¹

1: l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, Nantes, France

Address for correspondance: Benjamin Lauzier, Université de Nantes, l'institut du thorax,
Inserm UMR 1087 / CNRS UMR 6291, IRS –UN, 8 quai Moncousu, BP 70721, 44007
Nantes Cedex 1 France

Tel: +33 2 28 08 01 57 – benjamin.lauzier@univ-nantes.fr

Abstract

Aims: Despite better medical management, mortality remains high for Heart Failure with preserved Ejection Fraction (HFpEF), with a 65% mortality rate at 5 years of age. Early diagnosis of HFpEF remains a challenge and current standard treatment fails to improve the prognosis. Numerous studies have investigated the pathophysiological mechanisms of HFpEF. It has been shown that endothelial dysfunction plays an important role in HFpEF. No studies show whether endothelial dysfunction is the cause or consequence of HFpEF. We have described that the Tg β_3 rat develops HFpEF at 45 weeks. In order to know if endothelial dysfunction is the cause of HFpEF, we investigated endothelial function at 15, 30 and 45 weeks.

Methods and results: vascular reactivity was significantly reduced in response to isoproterenol in Tg β_3 aorta (-40% $p < 0.05$ vs WT) at 30 and 45 weeks indicating an alteration of endothelial function without alteration in systemic arterial pressure. With L-VNIO vasorelaxation was significantly reduced in Tg β_3 rat indicating a major implication of nNOS in vascular reactivity. nNOS expression was increased in aorta. Vascular production of NO was increased in Tg β_3 rats at 30 and 45 weeks (+39% and +84%, respectively $p < 0.05$ vs WT). This production was associated with an increase in $\text{O}_2^{\cdot -}$ Tg β_3 rats at 30 and 45 weeks (+76% and +76%, respectively $p < 0.05$ vs WT).

Conclusion: We have shown that endothelial dysfunction is present at 30 weeks, whereas impaired cardiac function is only present at 45 weeks. We can therefore conclude that endothelial dysfunction is the cause of HFpEF.

Key words: HFpEF, endothelial dysfunction, nitric oxide

I. Introduction

Over the past decade, cardiovascular disease has been one of the leading causes of death worldwide. Among these diseases, heart failure (HF) affects 2-3 % of the world's population (Metra and Teerlink, 2017). There are several forms of HF, including HF with preserved ejection fraction (HFpEF) which has no treatment at present day. This type of HF is characterized by diastolic dysfunction without alteration of ejection fraction. The clinical characteristics of patients with HFpEF are advanced age and female sex. (Oktay et al., 2013). However, the mechanism leading to HFpEF is not completely understood so far. A few years ago, Paulus et al. put forward the idea that endothelial function could be the common trigger of all HFpEF etiology (Paulus and Tschöpe, 2013). More specifically the nitric oxide (NO) pathway was pointed out. Indeed, NO is a major player in the maintenance of cardiovascular function. NO is mainly produced by the endothelial cell via the activation of one the Three isoforms of NO synthase (NOS): the endothelial NOS (eNOS or NOS3), the inductive NOS (iNOS or NOS2) and the neuronal NOS (nNOS or NOS1). In physiological condition, most of the NO production in vessels and heart is mediated by eNOS (Fleming, 2010). Paracrine action of NO , produced by endothelial cells, induce a vasorelaxation of smooth muscle cells in the vessels. At the cardiac level, endothelial cells represent 20% of the cells and NO play a role in the regulation of cardiac contractility (Liu and Huang, 2008). The NO production is mediated by the activation of β -adrenoceptors (β -AR) and more specifically the β_3 -AR through the activation of eNOS or nNOS (Gauthier et al., 1998; Trapanese et al., 2015). Activation of β_3 -AR, expressed in cardiomyocytes and endothelial cells, induced NO release. Considering the putative link between HFpEF and endothelial dysfunction and the link between β_3 -AR and NO signalling, we decided to study the impact of the β_3 -AR overexpression on endothelial function. An animal model that overexpress the β_3 -AR ($\text{Tg}\beta_3$) on endothelial cells have been developed. $\text{Tg}\beta_3$ animal overproduced NO at cardiac level and develop a diastolic dysfunction at 45 weeks, characteristic of HFpEF. The aim of this study is to understand if endothelial dysfunction is the cause of HFpEF.

II. Material and methods.

1. Experimental animals

All animal experimental protocols were approved by the Pays de la Loire Ethical Committee and were performed in accordance with the French law on animal welfare, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Pub. No. 85-23, revised 2011), and the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments and all the animals were housed according standard living conditions. Tg β_3 rats which overexpresses human β_3 -adrenoceptors (β_3 -AR) in endothelial cells and their control (WT) were used at 15, 30 and 45 weeks of age and fed with a soy-free diet (Envigo, #2914C, Huntingdon, United Kingdom) as previously described (Dhot et al., 2020). At 15, 30 and 45 weeks of age, echocardiography imaging and invasive hemodynamic study were performed. After animal were euthanized, thoracic aorta and mesenteric arteries were excised in order to performed vascular reactivity (thoracic aorta and mesenteric arteries), electron paramagnetic resonance (EPR) quantification (thoracic aorta) and Western-blot (thoracic aorta) as described below.

2. Pharmacological studies with vascular reactivity

Thoracic aorta and mesenteric arteries were carefully excised and cleared of fat and connective tissue. Vascular tensions were recorded as described previously (Roul et al., 2015). Briefly, aortic and mesenteric rings were mounted on transducer in organ chamber filling with Krebs solution at 37°C and oxygenated (95% CO₂ and 5% O₂).

The vasodilation in response to isoproterenol, a global β -AR agonist, (1 nM to 100 μ M; Sigma-Aldrich, I6504) and to CL 316 243, a β_3 -AR agonist, (1 nM to 100 μ M; Tocris, 1499) were evaluated. The tension was recorded on precontracted rings with phenylephrine (1 μ M; Sigma-Aldrich P6126). In a second time, the vasodilation in response to isoproterenol (1 nM to 100 μ M) in presence of NOS inhibitor: L-NIO, eNOS inhibitor, (10 μ M; N⁵-(1-Iminoethyl)-L-ornithine dihydrochloride; Tocris, 0546), vinyl-L-VNIO, nNOS inhibitor, (10 μ M; N⁵-(1-Imino-3-butenyl)-L-ornithine; L-VNIO; Enzo Life Sciences, ALX-270-216-M005), 1400 W, iNOS inhibitor, (10 μ M; N-[[3-(Aminomethyl)phenyl]methyl]-ethanimidamide dihydrochloride; Tocris, 1415) and L-NMMA, a global NOS inhibitor (30 μ M; NG-Monomethyl-L-arginine acetate; Tocris, 0771) were done. The inhibitor was added during 30 min before the phenylephrine precontraction.

3. Electron paramagnetic resonance (EPR)

EPR measurements were performed on aortas harvested from rats 15-, 30- and 45- weeks old, as previously describe (Agouni et al., 2009). Briefly, aortas were incubated 45 min at 37°C in a Krebs-HEPES colloid solution containing DETC (Sigma-Aldrich) as spin trap for •NO detection. 5 conditions were tested: with L-NMMA (10 µM); with L-NIO (10 µM) and L-VNIO (10 µM); with L-NIO (10 µM) and 1400W (10 µM); with L-VNIO (10 µM) and 1400W (10 µM); without inhibitor. For O₂•⁻ detection, aortas were incubated 45 min at 37°C in a Krebs-HEPES solution containing 1-hydroxy-3methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin (CMH, 500 µM, Noxygen,), deferoxamin (25 µM, Sigma-Aldrich) and DETC (5 µM, Sigma-Aldrich) with or without L-NMMA (10 µM). Then, each sample was frozen in liquid nitrogen and analyzed in a Dewar flask at 77°K by EPR Miniscope MS5000 (Friebeg Instruments, Germany). The instrument settings were microwave power of 10 mW, 1 mT or 0.400 mT of amplitude modulation for •NO and O₂•⁻ respectively, 100 kHz modulation frequency, sweep time of 150 s and 3 scans for •NO measurements or 60 s and 3 scans for O₂•⁻ spectra. Signals were quantified by measuring the total amplitude of the peaks of the spectra obtained, expressed in arbitrary units (A.U.) and normalized to dry weight of the sample.

4. Western-Blot

At 15-, 30- and 45-weeks rats were euthanized and aorta were excised and frozen in liquid nitrogen. Total protein was extracted from aorta powder as previously described (Ferron et al., 2019), in presence of phosphatase inhibitor in T-PER buffer. Western-blot were performed with a migration in 4-15% polyacrylamide stainfree gels in order to evaluate the expression of the nNOS (#4231S, Cell Signaling, Danvers, USA), iNOS (AB5382, Millipore, USA), eNOS (610296, BD Biosciences, San Diego, USA) and phosphorylated Ser1177 eNOS (P-eNOS; #9571, Cell Signaling, Danvers, USA). Total nNOS, iNOS and eNOS expression was expressed as a ratio with stainfree quantification of total protein.

5. Statistical analysis

Data were presented as mean ±SEM. For the comparisons involving two groups of animal's significances was defined using a Mann-Whitney test. For vascular studies, an ANOVA two-way was use with Tukey post-test. P<0.05 was considered as significant.

III. Results

1. β_3 -AR overexpression on long term induce vasodilatation alteration

Concentration-dependent vasodilation to isoproterenol, a non-specific β -AR agonist, was significantly reduced in aortic rings from Tg β_3 rat at 30 weeks of age (-35%, $p < 0.05$ vs WT) and worsen with age at 45 weeks (-48%, $p < 0.05$ vs WT) (**Figure 1A**). Similar results are obtained on mesenteric arteries with 28%, 36% and 41% respectively (**Figure 1B**).

CL 316 243, a β_3 -AR agonist, produced a concentration-dependant vasodilation in WT and Tg β_3 rat. This vasodilation was comparable between WT and Tg β_3 at all evaluated ages on aortic vascular bed (**Figure 1C**). Interestingly, on mesenteric artery, a resistance vessel, the vasorelaxation was increase during ageing independently of rat genotype (**Figure 1D**).

To evaluate the potential involvement of the NO synthase implication on the observed vascular dysfunction, vasodilation induced by isoproterenol was evaluated in presence of L-NMMA, a non-selective NOS inhibitor. In these conditions, the vasodilation was comparable between WT and Tg β_3 at 15, 30 and 45 weeks both on thoracic aortic rings (**Figure 1E**) and mesenteric arteries rings (**Figure 1F**).

All these results suggest an alteration of vasodilatation in response to isoproterenol in Tg β_3 potentially cause by a dysregulation of NOS function.

2. β_3 -AR overexpression during 15 weeks induced no endothelial dysfunction

NOS function at 15 weeks:

Vasodilation in response to isoproterenol was similar in aortic and mesenteric rings between WT and Tg β_3 rat (**Figure 1A** and **1B**). In presence of L-NIO – an eNOS inhibitor – the vasodilation was similar between WT and Tg β_3 rats on aortic rings (**Figure 2A**). With 1400W – an iNOS inhibitor – the vasodilation in response to isoproterenol was not modified (**Figure 2B**). Concentration-dependent vasodilation to isoproterenol in presence of L-VNIO – a nNOS inhibitor – produced the same maximal effect at 100 μM in both groups (**Figure 2C**). However, the pD_2 values was significantly reduced in Tg β_3 (7.363 ± 0.548 versus 4.769 ± 0.297 ; **Table 1**). Comparable results were obtained on mesenteric arteries rings (**Figure 2D**, **Figure 2E** and **Figure 2F**).

NOS expression at 15 weeks:

The aortic ratio of eNOS dimer/monomer and p-eNOS/eNOS monomer protein expression levels were not significantly modified in both groups (**Figure 2G** and **Figure 2H**). The overexpression of β_3 -AR in Tg β_3 induced a significant 2-fold increase of iNOS protein expression (**Figure 2I**). Aortic nNOS protein expression was not significantly modified in Tg β_3 group albeit it trended to increase (**Figure 2J**).

**NO and O₂^{•-} production at 15 weeks:*

Under baseline conditions there is no change in *NO production on thoracic aortic artery in both groups. With L-NMMA – a non-selective NOS inhibitor – the *NO production was drastically reduced, confirming that *NO production is mostly produced by NOS. To evaluate the contribution of eNOS to *NO production aortas were incubated with 1400W and L-VNIO. In these conditions the eNOS-dependent *NO production was similar between the two groups. The iNOS-dependent *NO production, with L-NIO and L-VNIO, was increased in Tg β_3 rats. Concerning the nNOS-dependent *NO production, with L-NIO and 1400W, was not significantly modified but trended to increase (**Figure 2K**). The generation of O₂^{•-} was also evaluated under baseline conditions and with L-NMMA. The results indicate no change on O₂^{•-} production with or without L-NMMA (**Figure 2L**).

At 15 weeks, results indicate an absence of endothelial dysfunction with no alteration of vasorelaxation in response to isoprenaline. Only the increase in iNOS expression indicates that inflammation would be present in transgenic animals.

3. β_3 -AR overexpression during 30 weeks induced endothelial dysfunction

NOS function at 30 weeks:

Vasodilation in response to isoproterenol in presence of eNOS inhibitor and iNOS inhibitor (L-NIO and 1400W respectively) were similar between WT and Tg β_3 rats on aortic rings (**Figure 3A** and **Figure 3B**). Concentration-dependent vasodilation to isoproterenol in presence of L-VNIO – nNOS inhibitor – was significantly reduced in Tg β_3 rats compared to WT rats in presence of L-VNIO (-36%, $p < 0.05$) (**Figure 3C**). On mesenteric arteries rings, vasodilation in response to isoproterenol with L-NIO, 1400W and L-VNIO were similar between WT and Tg β_3 rats (**Figure 3D**, **Figure 3E** and **Figure 3F**). These results suggest that nNOS function was increased.

NOS expression at 30 weeks:

The aortic ratio of eNOS dimer/monomer, p-eNOS/eNOS monomer and iNOS protein expression levels were not significantly modified in both groups (**Figure 3G**, **Figure 3H** and **Figure 3I**). The consequence of the β_3 -AR overexpression in Tg β_3 induced a significant 6-fold increase of nNOS protein expression (**Figure 3J**).

**NO and O₂^{•-} production at 30 weeks:*

At 30 weeks of age, *NO production was increase in Tg β_3 rats (+39%, p<0.05 vs WT). In presence of L-NMMA, the production of *NO was significantly reduce compare to *NO production without L-NMMA, suggesting that *NO production was induced by NOS. The overproduction of *NO observed in Tg β_3 rats was induced by nNOS and iNOS (**Figure 3K**). The generation of O₂^{•-} was also evaluated under baseline conditions and with L-NMMA. The results indicate an increase of O₂^{•-} production with or without L-NMMA in Tg β_3 rats compare to WT (**Figure 3L**).

At 30 weeks, results indicate an endothelial dysfunction with alteration of vasorelaxation in response to isoprenaline. Increase of nNOS expression and function induced an increase of *NO production, and these alterations could be at the origin of endothelial dysfunction. The increase of O₂^{•-} production confirmed the endothelial dysfunction.

4. β_3 -AR overexpression during 30 weeks induced endothelial dysfunction

NOS function at 45 weeks:

At 45 weeks, vasodilation in response to isoproterenol was significantly reduce in Tg β_3 rat compare to WT. In presence of L-NIO or 1400W or L-VNIO vasodilation was not significantly changed on aortic artery ring between Tg β_3 and WT rat (**Figure 4A**, **Figure 4B** and **Figure 4C**). On mesenteric artery ring, concentration-dependent vasodilation in response to isoproterenol in presence of L-NIO was significantly reduced from WT rat compare to Tg β_3 (**Figure 4D**). However, in presence of 1400W, the vasodilation was similar between the two group (**Figure 4E**). But in presence of L-VNIO, vasodilation in response to isoproterenol was significantly reduced with Tg β_3 rat compare to WT (**Figure 4F**).

NOS expression at 45 weeks:

In Tg β_3 rat, the aortic eNOS dimer/eNOS monomer protein expression ratio and the aortic p-eNOS/eNOS monomer protein expression ratio, were significantly reduced (**Figure 4G** and **Figure 4H**). These results suggest eNOS unclouping. Concerning iNOS protein expression we observed no modification (**Figure 4I**). But the aortic nNOS protein expression was significantly increase at 45 weeks on Tg β_3 rat (**Figure 4J**).

**NO and O₂^{•-} production at 30 weeks:*

The production of *NO was also altered. We observed an increase of *NO production on aorta in Tg β_3 rat in baseline condition. This increase was reversed in presence of L-NMMA. In presence of L-VNIO and 1400W, the *NO production dependant to eNOS was significantly decrease. The iNOS-dependent *NO production, with L-NIO and L-VNIO, was increase in Tg β_3 rats. But in presence of L-NIO and 1400W, the production dependant to nNOS, was significantly increase on Tg β_3 rat (**Figure 4K**). The production of O₂^{•-} was also increase in Tg β_3 rat, but similar production in presence of L-NMMA (**Figure 4L**).

At 45 weeks, the Tg β_3 rat develop an endothelial dysfunction. This dysfunction was characterized by a reduction of vasodilatation, an increase of *NO and O₂^{•-} production. We suppose that eNOS uncoupling lead to endothelial dysfunction by producing reactive oxygen species (ROS) with O₂^{•-} production. In conclusion, the endothelial dysfunction appears at 30 weeks and worsen at 45 weeks. The cardiac dysfunction was only observed at 45 weeks. In conclusion the endothelial dysfunction was the origin of cardiac dysfunction and HFpEF.

IV. Discussion

The aim of this study was to understand the link between endothelial dysfunction and diastolic dysfunction. We wanted to understand if endothelial dysfunction is the cause of HFpEF, we investigated endothelial function at 15, 30 and 45 weeks. The major finding of this study was that β_3 -AR overexpression lead to endothelial dysfunction at 30 weeks with a decrease of vasodilation in response to isoproterenol. With the ageing the endothelial dysfunction worsens. At 45 weeks, when the diastolic dysfunction appears, $O_2^{\cdot-}$ and $\cdot NO$ production was increased by the nNOS increase expression and function. The eNOS uncoupling observed at 45 weeks confirmed the endothelial dysfunction and can be at the origin of HFpEF pathophysiological mechanism.

Induction of endothelial dysfunction by β_3 -AR overexpression.

In the literature β_3 -AR has a low level of protein expression under baseline condition but some evidence indicated that in case of heart failure β_3 -AR expression increasing (Moniotte et al., 2001). Many studies demonstrated a cardioprotective role of β_3 -AR in pathophysiological condition (Kong et al., 2004). β_3 -AR overexpression on cardiac myocyte was associated with the cardioprotective effect (Belge Catharina et al., 2014). However, when the β_3 -AR overexpression was on endothelial cell, in this study, β_3 -AR was not associated with cardioprotective effect but endothelial dysfunction and diastolic dysfunction with ageing. In this case a decrease of vasodilatation in response to isoproterenol was observed at 30 weeks until 45 weeks when the diastolic dysfunction appears. This alteration was corrected with iNOS inhibitor suggesting a potential role of iNOS in the pathophysiological mechanism of endothelial dysfunction. A HFpEF animal model suggested that iNOS activation lead to HFpEF phenotype (Schiattarella et al., 2019). iNOS could have a key role on endothelial dysfunction and with ageing could lead to cardiac alteration.

Endothelial dysfunction and HFpEF

Endothelial dysfunction has been at the center of studies on the HFpEF for about ten years (Franssen et al., 2016; Gevaert Andreas B. et al., 2017; Schiattarella et al., 2019).

In the HFpEF, it has been described that endothelial dysfunction is characterized by a decrease in the production of $\cdot\text{NO}$, leading to a decrease in vasorelaxation, linked to a decrease in the function of the eNOS protein (Franssen et al., 2016). The decrease in $\cdot\text{NO}$ is explained by the decoupling of eNOS, which has been confirmed in patients with HFpEF and ZSF1 rats. Decoupling of eNOS shifts eNOS from the dimer, which produces $\cdot\text{NO}$, to the monomer, which generates $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Silberman et al., 2010).

Similar results were obtained in a diabetic HFpEF model (Galougahi et al., 2014). In this study, the authors show a decrease in the activity of eNOS due in particular to a decoupling of this protein, and thus a decrease in the production of $\cdot\text{NO}$. Interestingly, the deletion of NOS, especially eNOS, causes diastolic dysfunction and cardiac hypertrophy (Shibata et al., 2010). All these studies converge to say that in the HFpEF, the decoupling of the eNOS protein induces a decrease in the production of $\cdot\text{NO}$, which is at the origin of endothelial dysfunction.

Conversely, our results show an increase in the production of $\cdot\text{NO}$ and a decrease in the eNOS protein. The analysis of the production of $\cdot\text{NO}$ as a function of NOS showed that the eNOS protein produced less $\cdot\text{NO}$ while the nNOS protein produced more $\cdot\text{NO}$. It is interesting to see that the eNOS protein is decoupled inducing a decrease of $\cdot\text{NO}$ as in the literature but that the massive increase in the expression of the nNOS protein significantly increases the production of $\cdot\text{NO}$.

The other mechanism described as having a role in the establishment of endothelial dysfunction is oxidative stress. Indeed, it has been described that the H_2O_2 concentration in the myocardium of ICFEp patients was significantly elevated and this same observation has also been described in ZSF1 rats (Franssen et al., 2016). H_2O_2 results from the conversion of $\text{O}_2^{\cdot-}$ by SODs, and the high $\text{O}_2^{\cdot-}$ concentrations in our model therefore suggest an increase in H_2O_2 concentration and SOD activity at the vascular and cardiac levels.

Oxidative stress: the key on endothelial and diastolic dysfunction?

The endothelial dysfunction is link to increase of NO production by the nNOS. In the same time eNOS expression was decrease suggesting a eNOS uncoupling lead to $\text{O}_2^{\bullet-}$ production and oxidative stress (Battault et al., 2016; Moens et al., 2010). Increase of oxidative stress was majority link to the genesis of heart failure. Controversy with in this study, other study suggested that β_3 -AR activation inhibited oxidative stress and reactive oxygen production (ROS) production. It seems in the case when β_3 -AR was overexpressed on a long-term on endothelial cell did not protected again the ROS production. Surprisingly, the overproduction of NO is not link to gain of function but to endothelial dysfunction. Several hypotheses can explain this phenome. First, the increased of S-nitrosylation could explain the progressive decrease of cardiovascular function. Secondly, the increase of the NO bioavailability associated with an increase of ROS could lead to the production of peroxynitrite (ONOO^-). In our study the increase of NO is associated to the overproduction of $\text{O}_2^{\bullet-}$ suggesting the production of ONOO^- . The production of ONOO^- is increase when the eNOS is uncoupled. ROS production induced major perturbation in all the organism and in particular on cardiovascular function. In our model the decreased of $\text{O}_2^{\bullet-}$ production in presence of L-NMMA suggested that the NOS are at the origin of these disorder. More specifically, the uncoupled eNOS, find $\text{Tg}\beta_3$ rat could be at the origin of the diastolic dysfunction.

V. Conclusion

Endothelial dysfunction has an important role in our model because it precedes cardiac dysfunction and could be at the origin of diastolic dysfunction. As in the literature we have highlighted an increase in oxidative stress which has a major role in the pathophysiological mechanisms of HFpEF and endothelial dysfunction. The increase in oxidative stress is characterized by an increase in $\text{O}_2^{\bullet-}$ which seems to be produced by NOS. Although we do not know which NOS is responsible for this production, we assume that it is the decoupling of the eNOS protein. Indeed, in many HFpEF models the eNOS protein is described as decoupled, resulting in a decrease in the production of NO and an increase in $\text{O}_2^{\bullet-}$. Our study, confirmed that endothelial dysfunction was at the origin of HFpEF.

Bibliography.

Battault, S., Singh, F., Gayraud, S., Zoll, J., Reboul, C., and Meyer, G. (2016). Endothelial function does not improve with high-intensity continuous exercise training in SHR: implications of eNOS uncoupling. *Hypertens. Res.* 39, 70–78.

Belge Catharina, Hammond Joanna, Dubois-Deruy Emilie, Manoury Boris, Hamelet Julien, Beauloye Christophe, Markl Andreas, Pouleur Anne-Catherine, Bertrand Luc, Esfahani Hrag, et al. (2014). Enhanced Expression of β 3-Adrenoceptors in Cardiac Myocytes Attenuates Neurohormone-Induced Hypertrophic Remodeling Through Nitric Oxide Synthase. *Circulation* 129, 451–462.

Dhot, J., Ferron, M., Prat, V., Persello, A., Roul, D., Stévant, D., Guijarro, D., Piriou, N., Aillerie, V., Erraud, A., et al. (2020). Over-expression of endothelial β 3 – adrenergic receptor induces diastolic dysfunction in rats. *ESC Heart Fail.*

Ferron, M., Cadiet, J., Persello, A., Prat, V., Denis, M., Erraud, A., Aillerie, V., Mevel, M., Bigot, E., Chatham, J.C., et al. (2019). O-GlcNAc stimulation: A new metabolic approach to treat septic shock. *Sci. Rep.* 9, 18751.

Fleming, I. (2010). Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 459, 793–806.

Franssen, C., Chen, S., Unger, A., Korkmaz, H.I., De Keulenaer, G.W., Tschöpe, C., Leite-Moreira, A.F., Musters, R., Niessen, H.W.M., Linke, W.A., et al. (2016). Myocardial Microvascular Inflammatory Endothelial Activation in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *JACC Heart Fail.* 4, 312–324.

Galougahi, K.K., Liu, C.-C., Gentile, C., Kok, C., Nunez, A., Garcia, A., Fry, N.A.S., Davies, M.J., Hawkins, C.L., Rasmussen, H.H., et al. (2014). Glutathionylation mediates angiotensin II-induced eNOS uncoupling, amplifying NADPH oxidase-dependent endothelial dysfunction. *J. Am. Heart Assoc.* 3, e000731.

Gauthier, C., Leblais, V., Kobzik, L., Trochu, J.N., Khandoudi, N., Bril, A., Balligand, J.L., and Le Marec, H. (1998). The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J. Clin. Invest.* 102, 1377–1384.

Gevaert Andreas B., Shakeri Hadis, Leloup Arthur J., Van Hove Cor E., De Meyer Guido R.Y., Vrints Christiaan J., Lemmens Katrien, and Van Craenenbroeck Emeline M. (2017). Endothelial Senescence Contributes to Heart Failure With Preserved Ejection Fraction in an Aging Mouse Model. *Circ. Heart Fail.* 10, e003806.

Kong, Y., Li, W., and Tian, Y. (2004). [Effect of beta3-adrenoreceptors agonist on beta3-adrenoreceptors expression and myocyte apoptosis in a rat model of heart failure]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue Chin. Crit. Care Med. Zhongguo Weizhongbing Jijiuyixue* 16, 142–147.

Liu, V.W.T., and Huang, P.L. (2008). Cardiovascular roles of nitric oxide: A review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc. Res.* 77, 19–29.

Metra, M., and Teerlink, J.R. (2017). Heart failure. *Lancet Lond. Engl.*

- Moens, A.L., Yang, R., Watts, V.L., and Barouch, L.A. (2010). Beta 3-adrenoreceptor Regulation of Nitric Oxide in the Cardiovascular System. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48, 1088–1095.
- Moniotte, S., Kobzik, L., Feron, O., Trochu, J.N., Gauthier, C., and Balligand, J.L. (2001). Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation* 103, 1649–1655.
- Oktaç, A.A., Rich, J.D., and Shah, S.J. (2013). The emerging epidemic of heart failure with preserved ejection fraction. *Curr. Heart Fail. Rep.* 10, 401–410.
- Paulus, W.J., and Tschöpe, C. (2013). A Novel Paradigm for Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62, 263–271.
- Roul, D., Rozec, B., André, G., Merlet, N., Tran Quang, T., Lauzier, B., Ferron, M., Blanloeil, Y., Loirand, G., Sauzeau, V., et al. (2015). Increased β_2 -adrenergic vasorelaxation at the early phase of endotoxemic shock in rats. *Vascul. Pharmacol.* 72, 181–189.
- Schiattarella, G.G., Altamirano, F., Tong, D., French, K.M., Villalobos, E., Kim, S.Y., Luo, X., Jiang, N., May, H.I., Wang, Z.V., et al. (2019). Nitrosative Stress Drives Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Nature* 568, 351–356.
- Shibata, K., Yatera, Y., Furuno, Y., Sabanai, K., Morisada, N., Nakata, S., Morishita, T., Yamazaki, F., Tanimoto, A., Sasaguri, Y., et al. (2010). Spontaneous development of left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in mice lacking all nitric oxide synthases. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 74, 2681–2692.
- Silberman, G.A., Fan, T.-H.M., Liu, H., Jiao, Z., Xiao, H.D., Lovelock, J.D., Boulden, B.M., Widder, J., Fredd, S., Bernstein, K.E., et al. (2010). Uncoupled cardiac nitric oxide synthase mediates diastolic dysfunction. *Circulation* 121, 519–528.
- Trappanese, D.M., Liu, Y., McCormick, R.C., Cannavo, A., Nanayakkara, G., Baskharoun, M.M., Jarrett, H., Woitek, F.J., Tillson, D.M., Dillon, A.R., et al. (2015). Chronic β_1 -adrenergic blockade enhances myocardial β_3 -adrenergic coupling with nitric oxide-cGMP signaling in a canine model of chronic volume overload: new insight into mechanisms of cardiac benefit with selective β_1 -blocker therapy. *Basic Res. Cardiol.* 110, 456.

Figures legends.

Figure 1: Concentration-relaxation curves to isoproterenol, a non-selective β -AR agonist on thoracic aortic rings (A) and mesenteric artery rings (B). Concentration-relaxation curves to CL 316 243, a β_3 -AR agonist, on thoracic aortic rings (C) and mesenteric artery rings (D). Concentration-relaxation curves to isoproterenol, a non-selective β -AR agonist, in presence of L-NMMA, a non-selective NOS inhibitor, on thoracic aortic rings (E) and mesenteric arteries rings (F). Solid and open symbols represent the WT and Tg β_3 rats, respectively. The different colours of the curves correspond to the different ages: the lightest curve is for 15-week-old animals, the darkest curve is for 45-week-old animals and the intermediate colour curve is for 30-week-old animals. Results were expressed as the percentage of relaxation from the maximal contraction induced by phenylephrine. Values represent mean $\pm$ SEM (n=3-12). §: p<0.05 WT – 15 weeks *versus* Tg β_3 – 15 weeks; \$: p<0.05 WT – 30 weeks *versus* Tg β_3 – 30 weeks; *: p<0.05 WT – 45 weeks *versus* Tg β_3 – 45 weeks.

Figure 2: Evaluation of function, expression and activity production of NOS in WT and Tg β_3 rats at 15 weeks of age. Concentration-relaxation curves to isoproterenol, a non-selective β -AR agonist on thoracic aortic rings in presence or not of selective NOS inhibitor: L-NIO – eNOS inhibitor – (A), 1400W – iNOS inhibitor – (B) and L-VNIO – nNOS inhibitor – (C). The same experiments were done on mesenteric arteries rings with L-NIO (D), 1400W (E) and L-VNIO (F). Solid and open symbols represent the WT and Tg β_3 rats, respectively. Continuous lines represent control curves in the presence of isoproterenol alone and dotted lines represent curves in the presence of isoproterenol and inhibitors. Results were expressed as the percentage of relaxation from the maximal contraction induced by phenylephrine. Values represent mean $\pm$ SEM (n=3-9). Effects of the β_3 -AR overexpression in Tg β_3 rats on aortic protein expression of eNOS dimer/monomer ratio (G), p-eNOS/eNOS monomer (H), iNOS (I) and nNOS (J). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *: p<0.05 WT *versus* Tg β_3 . Evaluation of 'NO production on thoracic aortic rings with or without inhibitor (L-NMMA, L-NIO, 1400W and L-VNIO) (K) and O₂^{•-} production with or without L-NMMA from WT and Tg β_3 rats. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *: p<0.05 WT *versus* Tg β_3 .

Figure 3: Evaluation of function, expression and activity production of NOS in WT and Tg β_3 rats at 30 weeks of age. Concentration-relaxation curves to isoproterenol, a non-selective β -AR agonist on thoracic aortic rings in presence or not of selective NOS inhibitor: L-NIO – eNOS inhibitor – (A), 1400W – iNOS inhibitor – (B) and L-VNIO – nNOS inhibitor – (C). The same experiments were done on mesenteric arteries rings with L-NIO (D), 1400W (E) and L-VNIO (F). Solid and open symbols represent the WT and Tg β_3 rats, respectively. Continuous lines represent control curves in the presence of isoproterenol alone and dotted lines represent curves in the presence of isoproterenol and inhibitors. Results were expressed as the percentage of relaxation from the maximal contraction induced by phenylephrine. Values represent mean $\pm$ SEM (n=4-8). Effects of the β_3 -AR overexpression in Tg β_3 rats on aortic protein expression of eNOS dimer/monomer ratio (G), p-eNOS/eNOS monomer (H), iNOS (I) and nNOS (J). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *: p<0.05 WT *versus* Tg β_3 . Evaluation of 'NO production on thoracic aortic rings with or without inhibitor (L-NMMA, L-NIO, L-VNIO and 1400W) (K) and O₂^{•-} production with or without L-NMMA from WT and Tg β_3 rats. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *: p<0.05 WT *versus* Tg β_3 .

Figure 4: Evaluation of function, expression and activity production of NOS in WT and Tg β_3 rats at 45 weeks of age. Concentration-relaxation curves to isoproterenol, a non-selective β -AR agonist on thoracic aortic rings in presence or not of selective NOS inhibitor: L-NIO – eNOS inhibitor – (A), 1400W – iNOS inhibitor – (B) and L-VNIO – nNOS inhibitor – (C). The same experiments were done on mesenteric arteries rings with L-NIO (D), 1400W (E) and L-VNIO (F). Solid and open symbols represent the WT and Tg β_3 rats, respectively. Continuous lines represent control curves in the presence of isoproterenol alone and dotted lines represent curves in the presence of isoproterenol and inhibitors. Results were expressed as the percentage of relaxation from the maximal contraction induced by phenylephrine. Values represent mean $\pm$ SEM (n=5-10). *: p<0.05 WT + inhibitor *versus* Tg β_3 + inhibitor. Effects of the β_3 -AR overexpression in Tg β_3 rats on aortic protein expression of eNOS dimer/monomer ratio (G), p-eNOS/eNOS monomer (H), iNOS (I) and nNOS (J). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *: p<0.05 WT *versus* Tg β_3 . Evaluation of $\cdot$ NO production on thoracic aortic rings with or without inhibitor (L-NMMA, L-NIO, L-VNIO and 1400W) (K) and O $_2^{\cdot-}$ production with or without L-NMMA from WT and Tg β_3 rats. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *: p<0.05 WT *versus* Tg β_3 .

Figure 1.

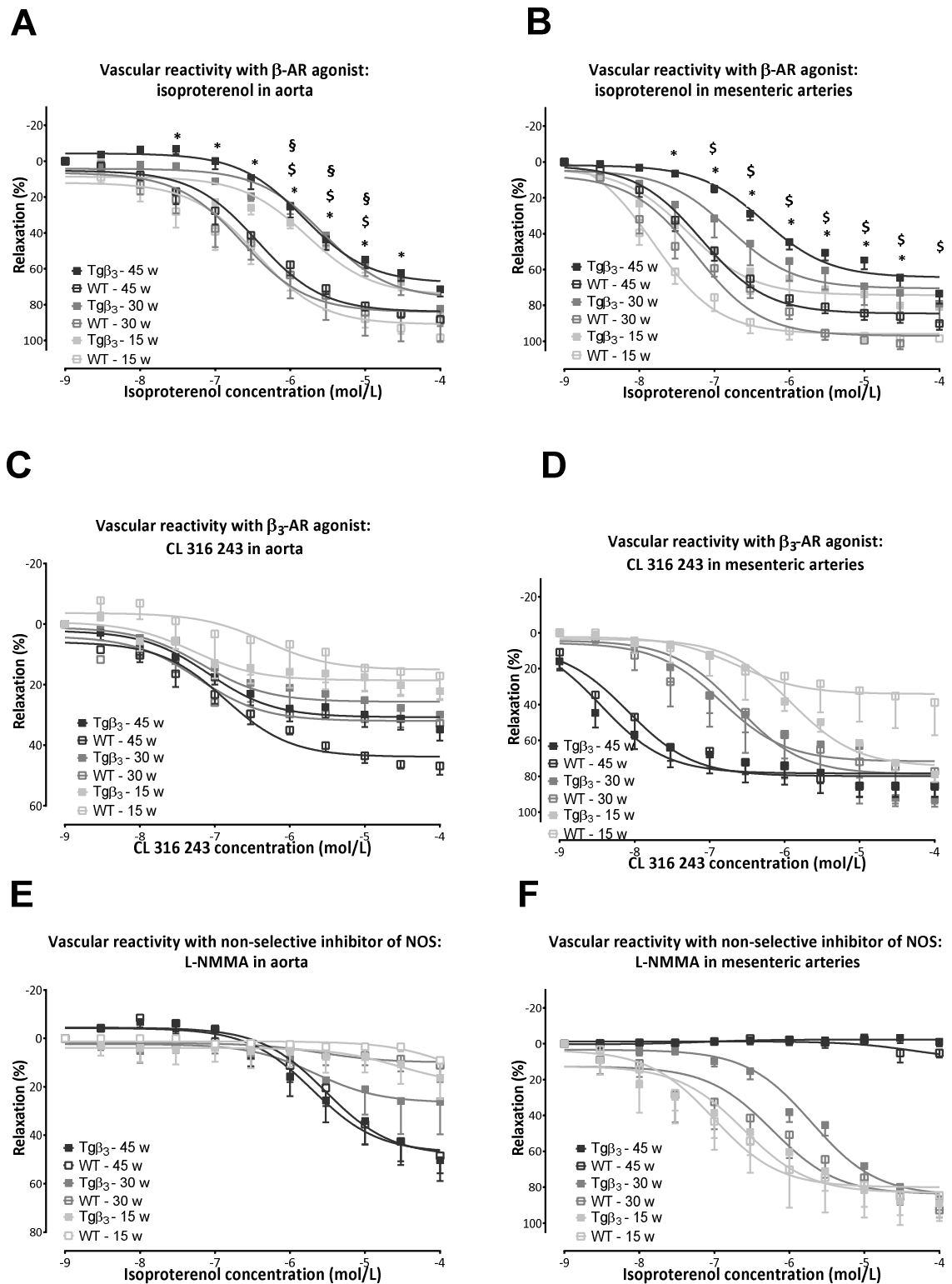


Figure 2.

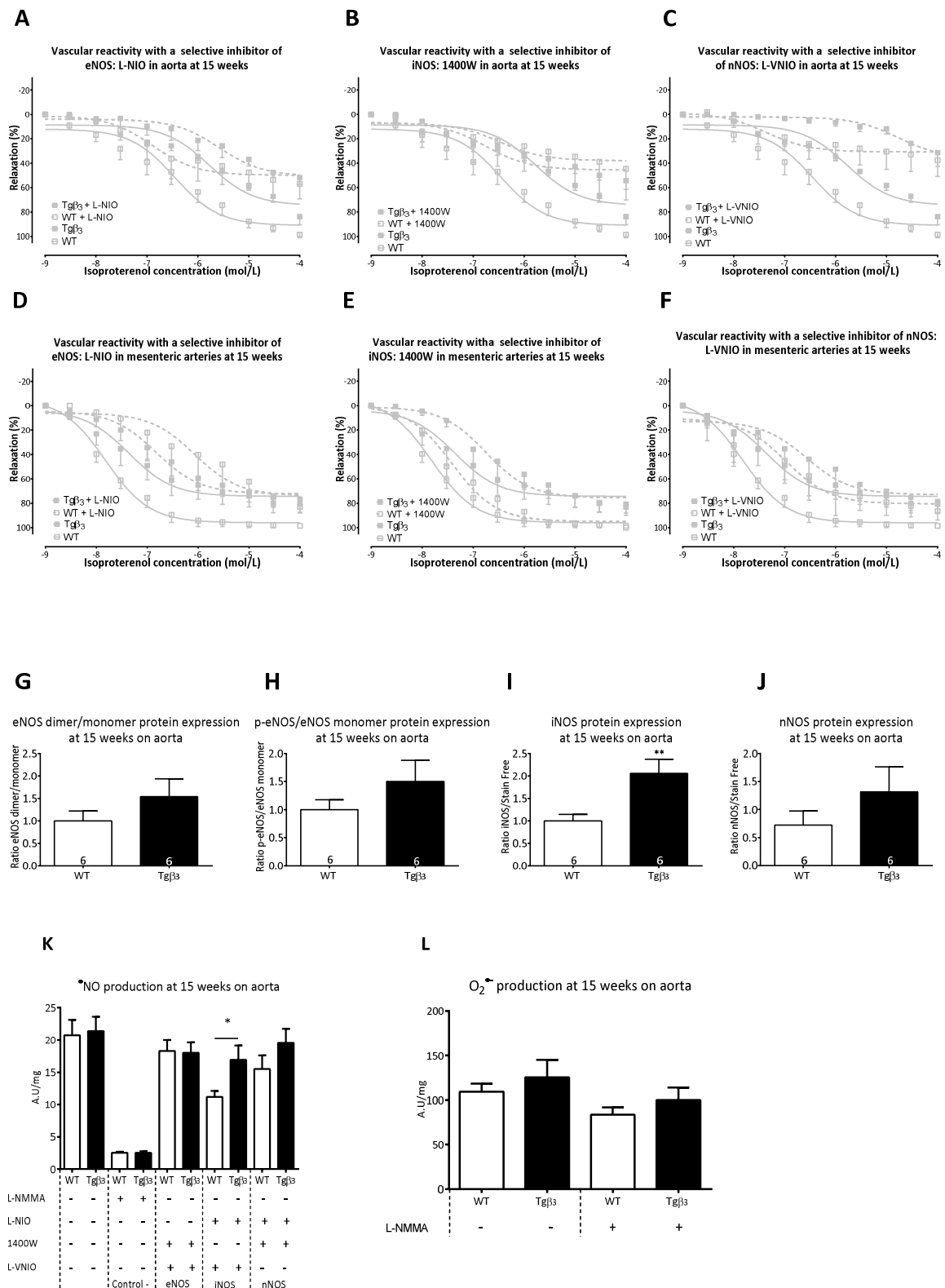


Figure 4.

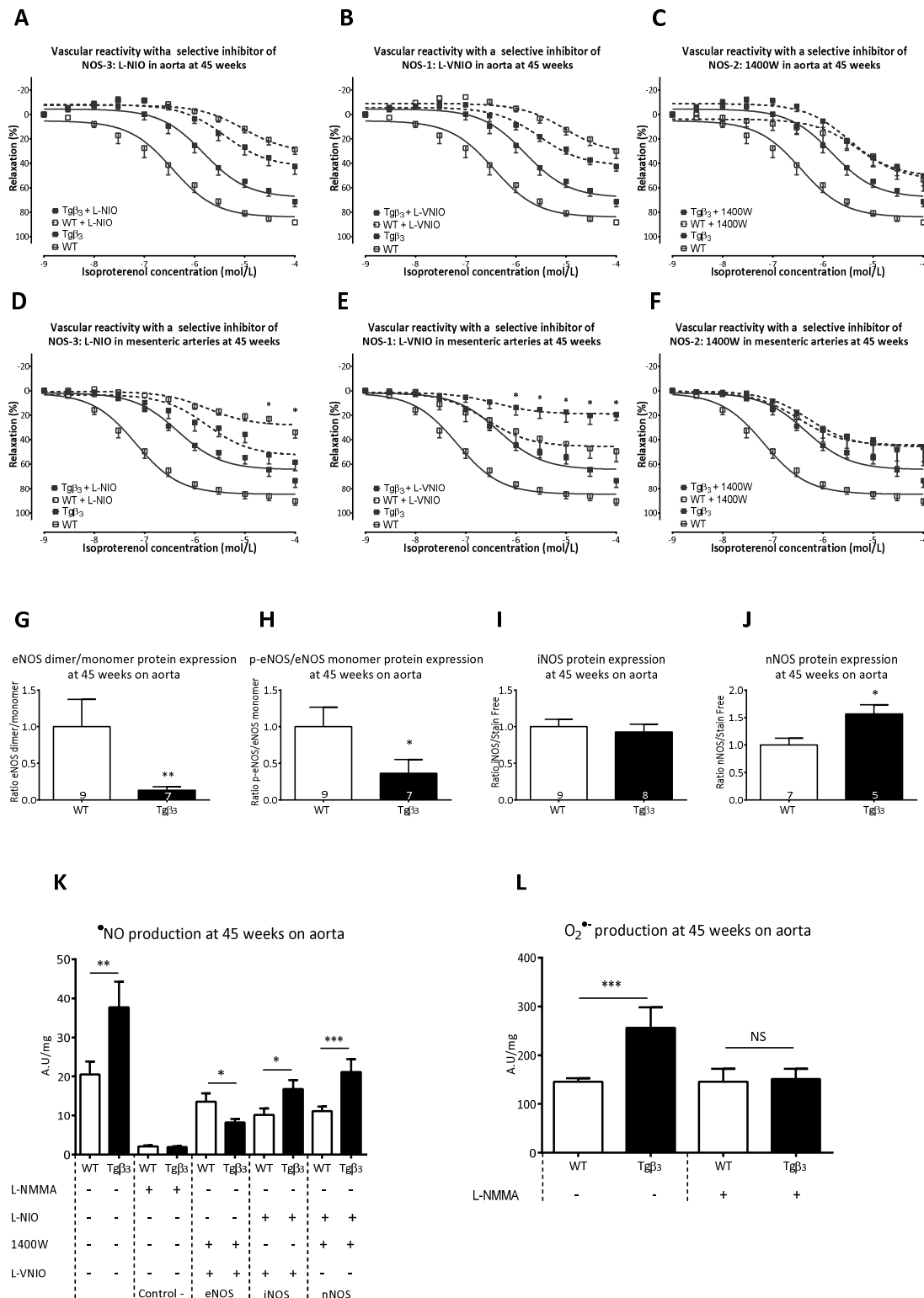
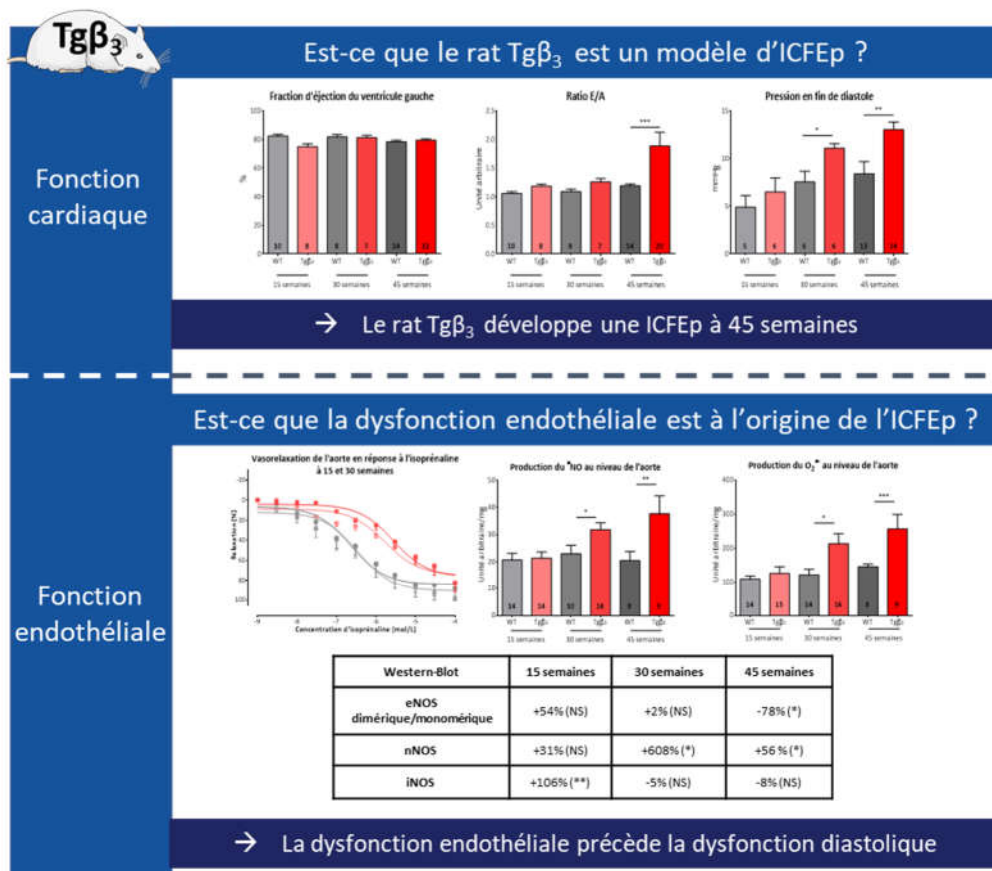


Table 1. Efficiencies and potencies of isoproterenol with or without NOS inhibitor and of CL 316 243 on thoracic aortic arteries and mesenteric arteries from WT and Tg β_3 rats at 15, 30 and 45 weeks of age.

		Thoracic aortic arteries – WT			Thoracic aortic arteries – Tg β_3			
Group		n	pD2	E _{max}	n	pD2	E _{max}	p
Isoproterenol	15 w	7	6.45 ± 0.14	90.92 ± 4.01	5	5.77 ± 0.11	74.58 ± 3.30	0.322
	30 w	4	6.63 ± 0.19	84.08 ± 5.15	8	5.56 ± 0.13	76.55 ± 4.40	0.006**
	45 w	11	6.44 ± 0.09	83.92 ± 2.67	10	5.81 ± 0.10	67.92 ± 3.08	0.015*
Isoproterenol + L-NMMA	15 w	6	3.81 ± 1.59	20.88 ± 46.37	5	4.46 ± 1.06	19.18 ± 13.51	0.401
	30 w	4	5.59 ± 0.67	9.934 ± 2.58	7	5.67 ± 0.50	26.55 ± 5.59	0.999
	45 w	9	5.52 ± 0.18	48.33 ± 4.76	9	5.69 ± 0.21	47.13 ± 4.88	0.653
Isoproterenol + L-NIO	15 w	7	6.89 ± 0.37	49.79 ± 5.62	4	5.58 ± 0.22	50.52 ± 4.89	0.748
	30 w	4	5.13 ± 0.38	48.04 ± 10.58	6	5.49 ± 0.32	40.62 ± 6.40	0.761
	45 w	8	5.02 ± 0.14	31.03 ± 3.33	8	5.39 ± 0.15	42.75 ± 3.90	0.064
Isoproterenol + L-VNIO	15 w	8	7.36 ± 0.55	30.74 ± 4.73	6	4.77 ± 0.30	36.02 ± 7.27	0.166
	30 w	4	6.25 ± 0.53	29.3 ± 5.28	7	5.49 ± 0.64	12.84 ± 3.45	0.657
	45 w	5	5.03 ± 0.17	32.13 ± 4.28	5	5.53 ± 0.11	41.96 ± 2.65	0.031
Isoproterenol + 1400W	15 w	8	6.47 ± 0.59	37.92 ± 6.53	5	6.75 ± 0.46	45.44 ± 5.93	0.999
	30 w	4	5.67 ± 0.28	45.51 ± 5.07	7	5.46 ± 0.22	49.62 ± 5.01	0.291
	45 w	7	5.28 ± 0.23	53.2 ± 6.02	8	5.48 ± 0.15	50.52 ± 4.37	0.679
CL _{316 243}	15 w	3	6.33 ± 0.62	15.03 ± 4.30	4	7.29 ± 0.31	18.55 ± 1.68	0.542
	30 w	3	7.22 ± 0.17	31.97 ± 1.32	3	7.17 ± 0.28	25.64 ± 1.99	0.801
	45 w	4	6.86 ± 0.11	43.82 ± 1.39	9	7.08 ± 0.18	30.73 ± 1.49	0.503

		Mesenteric arteries – WT			Mesenteric arteries – Tg β_3			
Group		n	pD2	E _{max}	n	pD2	E _{max}	p
Isoproterenol	15 w	4	7.816 ± 0.082	95.87 ± 1.89	8	7.361 ± 0.22	74.22 ± 4.19	0.262
	30 w	8	7.244 ± 0.098	96.93 ± 2.47	8	6.802 ± 0.216	70.47 ± 4.61	0.433
	45 w	12	7.173 ± 0.079	84.51 ± 1.89	12	6.338 ± 0.095	64.37 ± 2.2	<0.0001
Isoproterenol + L-NMMA	15 w	4	7.007 ± 0.277	79.98 ± 6.45	6	6.612 ± 0.239	83.09 ± 5.77	0.561
	30 w	7	6.225 ± 0.228	83.89 ± 6.21	6	5.701 ± 0.098	84.55 ± 3.65	0.615
	45 w	10	4.353 ± 0.815	8.92 ± 8.06	8	7.148 ± 1.166	-2.38 ± 0.91	0.861
Isoproterenol + L-NIO	15 w	3	6.067 ± 0.316	73.79 ± 8.64	9	6.827 ± 0.188	72.09 ± 4.11	0.281
	30 w	5	6.042 ± 0.184	73.33 ± 4.88	4	6.593 ± 0.193	85.17 ± 5.02	0.111
	45 w	10	5.750 ± 0.161	28.29 ± 2.00	9	5.758 ± 0.182	52.91 ± 4.07	0.713
Isoproterenol + L-VNIO	15 w	6	6.974 ± 0.292	80.35 ± 6.26	6	6.572 ± 0.312	72.81 ± 6.49	0.238
	30 w	3	6.369 ± 0.149	69.25 ± 3.25	6	6.646 ± 0.260	69.11 ± 5.40	0.761
	45 w	8	6.587 ± 0.241	45.54 ± 3.65	9	6.401 ± 0.438	18.96 ± 2.80	0.273
Isoproterenol + 1400W	15 w	4	7.412 ± 0.095	94.94 ± 2.41	7	6.749 ± 0.178	75.59 ± 4.36	0.072
	30 w	8	7.056 ± 0.214	77.78 ± 4.86	6	6.442 ± 0.2	83.67 ± 5.23	0.835
	45 w	8	6.478 ± 0.281	44.47 ± 4.31	8	6.289 ± 0.276	45.64 ± 4.68	0.776
CL _{316 243}	15 w	6	6.630 ± 0.612	34.07 ± 6.65	6	5.911 ± 0.085	74.51 ± 2.58	0.874
	30 w	3	6.836 ± 0.375	71.65 ± 7.95	4	6.633 ± 0.215	78.75 ± 5.46	0.742
	45 w	3	8.086 ± 0.259	79.85 ± 3.56	9	8.447 ± 0.250	78.32 ± 2.60	0.867

Vue synoptique de l'approche scientifique



2.3. Discussion

L'objectif de cette étude était de mettre en lumière le rôle de la dysfonction endothéliale dans la dysfonction diastolique.

Les résultats ont mis en évidence que la surexpression sur le long terme du récepteur β_3 – AR induit une dysfonction endothéliale qui conduit à une dysfonction diastolique à 45 semaines. A 15 semaines, la dysfonction endothéliale est établie chez les rats Tg β_3 mais sans dysfonction cardiaque. Au cours du temps, à 30 et 45 semaines, la dysfonction endothéliale est toujours présente, mais non significativement augmentée. A la différence des rats à 15 semaines, les rats Tg β_3 à 30 et 45 semaines présentent une dysfonction diastolique.

La dysfonction diastolique s'aggrave avec le temps pour devenir significative à 45 semaine. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la dysfonction endothéliale précède la dysfonction diastolique. Dans notre modèle, la dysfonction endothéliale se caractérise par une altération de la relaxation à l'isoprénaline au niveau de l'aorte et des artères mésentérique. Il est décrit que la diminution de la biodisponibilité du NO et l'augmentation de la production des ROS sont les principaux mécanismes impliqués dans la dysfonction endothéliale (Cai and Harrison, 2000).

Dans notre étude, les résultats indiquent une augmentation de la production du NO et des ROS chez les rats Tg β_3 , ce qui va à l'inverse de ce qui est décrit dans la littérature. L'augmentation de la production du NO est liée à l'augmentation de l'expression de la protéine nNOS et de la protéine iNOS, alors que la NOS majoritaire, la eNOS, est diminuée. L'augmentation de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ est induite par les NOS, en effet l'ajout de L-NMMA, un inhibiteur des NOS, permet de réduire les niveaux d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ chez les animaux transgéniques. En résumé les résultats de notre étude indiquent que la surexpression du récepteur β_3 – AR induit une dysfonction endothéliale à partir de 15 semaines. Les altérations d'expressions des protéines eNOS, nNOS et iNOS induisent une augmentation de la production du NO et des ROS qui sont deux mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la dysfonction endothéliale. De plus, l'apparition à partir de 30 et 45 semaines d'une dysfonction diastolique, confirme que la dysfonction endothéliale précède la dysfonction cardiaque dans l'ICFEp.

La dysfonction endothéliale est au centre des études sur l'ICFEp depuis une dizaine d'année (Franssen et al., 2016b; Gevaert et al., 2017; Schiattarella et al., 2019).

Dans l'ICFEp, il a été décrit que la dysfonction endothéliale se caractérise par une diminution de la production du NO , entraînant une diminution de la vasorelaxation, lié à la diminution de la fonction de la protéine eNOS (Franssen et al., 2016b). La diminution du NO s'explique par le découplage de la eNOS, qui a été confirmé chez les patients atteints d'ICFEp et les rats ZSF1. Le découplage de l'eNOS fait passer l'eNOS du dimère, producteur de NO , au monomère, générateur d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Silberman et al., 2010).

Des résultats similaires ont été obtenus dans un modèle d'ICFEp diabétique (Galougahi et al., 2014). Dans cette étude, les auteurs montrent une diminution de l'activité d'eNOS en raison notamment d'un découplage de cette protéine, et donc une diminution de la production du NO . De manière intéressante, la délétion des NOS, et notamment eNOS, provoque une dysfonction diastolique et une hypertrophie cardiaque (Shibata et al., 2010). Tous ces études convergent pour dire que dans l'ICFEp le découplage de la protéine eNOS induit une diminution de la production du NO , ce qui est à l'origine de la dysfonction endothéliale.

A l'inverse nos résultats montrent une augmentation de la production du NO et une diminution de la protéine eNOS. L'analyse de la production du NO en fonction des NOS a permis de mettre en évidence que la protéine eNOS produisait moins de NO alors que la protéine nNOS produisait plus de NO . Il est intéressant de voir que la protéine eNOS est découplée induisant une diminution du NO comme dans littérature mais que l'augmentation massive de l'expression de la protéine nNOS augmente significativement la production du NO .

L'autre mécanisme décrit comme ayant un rôle dans l'établissement de la dysfonction endothéliale est le stress oxydant. En effet, il a été décrit que la concentration d' H_2O_2 dans le myocarde des patients ICFEp était significativement élevée et cette même observation a aussi été décrite chez les rats ZSF1 (Franssen et al., 2016b). L' H_2O_2 résulte de la conversion de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ par les SOD, et les concentrations élevées d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ dans notre modèle suggèrent donc une augmentation de la concentration d' H_2O_2 et de l'activité des SOD au niveau vasculaire et cardiaque.

Les sources possibles de production d' $O_2^{\bullet}$ sont les NOX, les NOS non couplées (eNOS, iNOS), la xanthine oxydase et les mitochondries. Les résultats actuels de la diminution de la forme dimérique de la eNOS et l'augmentation de l'expression de la iNOS au niveau de l'endothélium soutiennent l'hypothèse selon laquelle le remodelage myocardique dans l'ICFEp est provoqué par l'activation endothéliale, contrairement à ICFEr, où le remodelage myocardique est provoqué par la mort des cardiomyocytes (Zhang et al., 2012). Dans notre modèle le stress oxydant est lui aussi augmenté avec une surproduction d' $O_2^{\bullet}$ via les NOS.

La dysfonction endothéliale a un rôle important dans notre modèle car elle précède la dysfonction cardiaque et pourrait être à l'origine de la dysfonction diastolique. Comme dans la littérature nous avons mis en évidence une augmentation du stress oxydant qui a un rôle majeur dans les mécanismes physiopathologiques de l'ICFEp et de la dysfonction endothéliale.

L'augmentation du stress oxydant se caractérise par une augmentation de l' $O_2^{\bullet}$ qui semble produit par les NOS. Même si nous ne savons pas quelle NOS est responsable de cette production nous présumons que c'est le découplage de la protéine eNOS. En effet dans de nombreux modèles d'ICFEp la protéine eNOS est décrite comme découplée, provoquant une diminution de la production du $^{\bullet}NO$ et une augmentation de l' $O_2^{\bullet}$.

Comme dans la littérature nous observons les mêmes altérations dans notre modèle. Cependant la surexpression du récepteur β_3 – AR entraîne une augmentation de l'expression de la protéine nNOS. L'augmentation massive de l'activité de la protéine nNOS provoque une forte augmentation de la production du $^{\bullet}NO$. Le rôle de la nNOS est très peu décrit et encore moins dans le cas d'une ICFEp. Dans l'hypertension artérielle, comorbidité majeure de l'ICFEp, il est décrit une augmentation de l'expression de nNOS et une diminution d'eNOS (Zhang et al., 2016).

Enfin, dans l'IC après infarctus du myocarde, il est également montré une augmentation de l'expression et de l'activité de nNOS (Kulandavelu and Hare, 2012; Moens et al., 2010). Nous ne pouvons pas dire si l'augmentation de l'expression et de la fonction de la nNOS est bénéfique ou délétère dans l'ICFEp.

3. Oestrogène et ICFEp

3.1. Préambule

Aujourd'hui, les maladies cardiovasculaires sont l'une des principales causes de décès dans le monde et représentent 30 % de la mortalité mondiale avec 17,3 millions de décès par an. La compréhension de la physiopathologie de ces maladies complexes est un objectif majeur de la recherche afin de développer de nouveaux traitements. Pour y parvenir l'utilisation de modèles animaux reste une étape importante et nécessaire que ce soit en recherche fondamentale ou pré-clinique.

Afin de transposer les conclusions de ces études à l'homme le choix du modèle animal est une étape cruciale. Le choix des animaux se justifie par de nombreux avantages mais il est évident que les souches de rongeurs présentent aussi de nombreuses différences majeures et critiques au niveau anatomique (Mauvais-Jarvis et al., 2017), physiologique (Jackson et al., 2017) et comportemental en comparaison à l'homme (Vaillant et al., 2013). Malgré ces désavantages majeurs, le rongeur reste pour autant le plus utilisé et le plus reconnu des modèles animaux en recherche. Il est donc important de contrôler tous les facteurs extérieurs ou environnementaux pour ne pas rajouter des biais supplémentaires. Parmi les biais possibles, les régimes alimentaires industriels pour rongeurs en font partis. Cependant peu d'études ont porté sur l'influence des régimes standards sur les résultats des études expérimentales, malgré le rôle essentiel de la quantité et de la qualité de l'apport alimentaire. En effet, de nombreuses études et médias publics parlent de l'impact des perturbateurs endocriniens dans l'alimentation humaine. On retrouve notamment le soja, utilisé dans l'alimentation comme source de protéine végétale mais qui est aussi une source importante de phytoestrogènes ou isoflavones (Patisaul and Jefferson, 2010). Comme leurs noms l'indiquent ces substances ont des structures moléculaires proches des œstrogènes leur conférant ainsi des activités hormonales, qui, si elles sont ingérées en grande quantité, peuvent devenir toxiques pour l'organisme. Et le soja est majoritairement utilisé dans l'alimentation standard des rongeurs, posant d'autant plus la question de l'impact de cette alimentation sur nos résultats scientifiques.

Dans le cas de l'ICFEp, l'utilisation de modèle animaux est d'autant plus importante du fait de l'absence de biopsie cardiaque de patients. Le choix du modèle animaux est donc un enjeu majeur pour cette thématique de recherche. Au cours d'une de nos études sur notre modèle de rat Tg β ₃ et de façon fortuite nous avons constaté que les isoflavones contenus dans l'alimentation influençaient directement le phénotype cardiaque de notre modèle qui développe avec le vieillissement une dysfonction diastolique proche de celle observée chez des patients ICFEp.

Nous avons comparé l'impact de la teneur en isoflavones, c'est-à-dire en soja, contenu dans les régimes alimentaires sur la fonction cardiovasculaire. Pour chaque groupe d'animaux, deux types d'alimentation ont été utilisés, une alimentation standard contenant du soja et la même alimentation mais dépourvue de soja.

3.2. Article 3 : Implication d’une alimentation riche en soja pour les modèles animaux

Implication of soy-based diet for animal models

Justine Dhot*, Valentine Prat*, Marine Ferron, Virginie Aillerie, Angélique Erraud, Bertrand Rozec, Michel De Waard, Chantal Gauthier, Benjamin Lauzier.

En cours de préparation pour soumission dans International Journal of Molecular Sciences

* Les auteurs ont contribué de façon équivalente à ce travail

Implication of soy-based diet for animal models

**Justine Dhot^{1*}, Valentine Prat^{1*}, Marine Ferron¹, Virginie Aillerie¹, Angélique Erraud¹,
Bertrand Rozec¹, Michel De Waard¹, Chantal Gauthier¹, Benjamin Lauzier¹**

1. Université de Nantes, CHU Nantes, CNRS, INSERM, l'institut du thorax, F-44000 Nantes, France.

*: These authors contributed equally to this work.

Address for correspondence: Benjamin Lauzier, Université de Nantes, l'institut du thorax, Inserm UMR 1087 / CNRS UMR 6291, IRS –UN, 8 quai Moncousu, BP 70721, 44007 Nantes Cedex 1 France.

Phone: +33 2 28 08 01 57 – benjamin.lauzier@univ-nantes.fr

Abbreviations

AFE: Atwater Fuel Energy

TGE: Total Genistein equivalent

ER: estrogen receptors

•NO: nitric oxide)

NOS: •NO synthases

eNOS: endothelial •NO synthase

iNOS: inducible •NO synthase

nNOS: neuronal •NO synthase

OVX: ovariectomized

NIH: National Institutes of Health

LV: left ventricle

LVEDP: left ventricle end diastolic pressure

ANOVA: analyses of variance

SEM: standard error of the mean

Highlights

- Diastolic dysfunction is observed with a soy-free diet
- Soy diet can module cardiac function on long term
- Diet is an important parameter for experimental studies

Abstract

The use of animal models in fundamental or pre-clinical research remains an absolute requirement for understanding human pathologies and developing new drugs. In order to transpose these results into clinical practice, many parameters must be taken into account to limit bias. Attention has recently been focused on the sex, age or even strain of animal, but the impact of diet has been largely neglected. Soy, which is commonly used in the diet at varying quantities can affect the physiology. In order to assess whether the presence of soy can impact the results obtained, we studied the impact of a soy-based diet *versus* a soy-free diet, on diastolic function in a rat model based on transgenic overexpression of the β_3 -adrenergic receptors in the endothelium and characterized by the appearance of diastolic dysfunction with age. Our results show that the onset of diastolic dysfunction is only observed in transgenic male fed on a long-term with a soy-free diet. Our study highlights the importance of the diet's choice in the design of studies, in particular paying attention to the level of soy, to correctly interpret the outcome as low-cost diet are more likely to contain very high level of soy.

Key words: phytoestrogen, soy-based diet, sex, endothelium, diastolic function

1. Introduction

Today, cardiovascular diseases are among the leading causes of death worldwide and account for 30% of global mortality, with 17.3 million deaths per year (2015). Understanding the pathophysiology of these diseases to identify new therapeutic targets is a major research objective. To achieve this, the use of animal models remains an important and necessary step in both basic and pre-clinical research and the choice of the animal model is a crucial step. In recent years attention has been focused on the impact of sex (Mauvais-Jarvis et al., 2017), age (Jackson et al., 2017) or strain of rodents (Vaillant et al., 2013) on the quality of the data obtained, whereas the impact of feeding has mostly been neglected. The majority of the used diets consist of soy, which is very popular because of its low cost, rich in protein, fibre and unsaturated fatty acids but also contain diadzein and genisteins, two isoflavones that are classified as endocrine disruptors (2007). Because of their structure they can act as agonists or antagonists of human estrogen receptors (ER), and are therefore referred to as phytoestrogens (Patisaul and Jefferson, 2010). Because of their hormonal activity, isoflavones can interact with different signaling pathways, in particular the nitric oxide (*NO) pathway by modulating the transcription of different *NO synthases (NOS) and can thereby indirectly modulate cardiovascular function. Given the potential strong effects on cardiovascular phenotype, we decided to conduct a study to evaluate the impact of a long-term soy-based diet *versus* a soy-free diet in control rats and in a transgenic rat model, characterized by the development of diastolic dysfunction in male.

2. Materials and Methods

2.1. Animal model

We used a model developed in our team: the transgenic (Tg β_3) rats overexpressing human β_3 -adrenergic receptor in endothelial cells, and their control (WT) rats. Both male and female (ovariectomized (OVX) or not) rats were analyzed. All animals were fed with a widely used standard industrial diet containing soy (RM1, SDS diet) or with an equivalent soy-free diet (Envigo, #2914C, Huntingdon, United Kingdom) (Diet composition in **Table 1**). All animal experimental protocols were approved by the Pays de la Loire Ethical Committee and were performed in accordance with the French law on animal welfare, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Pub. No. 85-23, revised 2011), and the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments and all the animals were housed according to standard living conditions.

2.2. Echocardiography

Echocardiography was performed blindly at 15, 30 and 45 weeks of age on anesthetized rats using a Vingmed-General Electric (VIVID 7, Horten, Norway). The analyses were performed using off-line cineloop analysis software (Echopac TVI, GE-Vingmed Ultrasound) on the Therassay platform as previously described (Merlet et al., 2013a).

2.3. Pressure measurements

At 45 weeks of age, rats were anesthetized with isoflurane and O₂ under spontaneous ventilation. A pressure probe SPR 838 size 2F (Millar Instruments Inc., Houston, Texas) was inserted in the right carotid and pushed into the left ventricle (LV) and end diastolic pressure (LVEDP) was recorded using IOX1.5.7 software (EMKA Technologies, Paris, France).

2.4. Western blots

After pressure measurement at 45 weeks of age, male rats were euthanized and hearts were excised. Total protein was extracted from LV powder as previously described (Ferron et al., 2019). Western blots were performed in order to evaluate the protein expression levels of nNOS (#4231S, Cell Signaling, USA), iNOS (AB5382, Millipore, USA), eNOS (610296, BD Biosciences, USA).

2.5. Statistical analyses

Data are presented as mean $\pm$ SEM. For the comparisons involving two groups of animals, significances were defined using a Mann-Whitney test. For echocardiography study, an ANOVA two-way was used with Bonferroni post-test. $P < 0.05$ was considered as significant.

3. Results and Discussion

Using echocardiographic we show that the systolic function based on the ejection fraction shows no change during ageing in male, female or OVX female rats whatever the diet or the genotype (**Figure 1A-C**). The diastolic function, was affected as shown by an increase in the E/A ratio (**Figure 1D**) for male Tg β_3 rats fed by soy-free diet only (Dhot et al., 2020). However, no changes in this parameter were observed in females, either OVX or not, fed with either soy-based or soy-free diets (**Figure 1E, F**). The diastolic alteration was confirmed by hemodynamic pressure analysis at 45 weeks of age in male Tg β_3 rats fed with the soy-free diet (**Figure 1G**). Echocardiography of female rats, with or without OVX, showed no alteration in LVEDP (**Figure 1H, I**). Our study therefore illustrates that the presence of soy in diet can affect pathology development in rodent model. Other studies have already investigated isoflavones, which is derived from soy, as a therapeutic tool in various pathologies (Xiao et al., 2018). On the other hand, Haines *et al.* reported that long-term consumption of phytoestrogens had no protective effect in females and was even fatal in males in a mouse model of hereditary hypertrophic cardiomyopathy (Haines et al., 2012). It is therefore important to take into account that soy levels in standard rodent diets induce phenotypic changes observed over a long-term period, but also through alteration in gene expression levels potentially *via* their action on ERs. In our study, the type of diet induced a change in the expression levels of NOS proteins. The expression of nNOS was significantly lower in rats fed a soy-based diet (**Figure 2A**). While an increase in eNOS expression was observed in rats fed with soy-based diet and a significant decrease in rats fed with a soy-free diet (**Figure 2B**). The expression of iNOS is not altered by the genotype or the diet of the rats (**Figure 2C**). Beyond the question of the beneficial or negative effects of soy on cardiovascular function, these results highlight the importance of considering the potential impact of modifying dietary intake in animal models. Our study further raises an interesting

avenue of reflection: it is possible that the development of diastolic dysfunction in Tg β_3 rats is dependent on the level of estrogens and phytoestrogens since only male animals, fed without phytoestrogens, develop this cardiac alteration. The fact that this cardiac dysfunction does not develop in rats fed with soy-rich diet further indicates the role of hormones in this pathology. Whether we can extend this analogy to imagine a therapeutic approach to cases of heart failure with preserved ejection fraction, mainly characterized by diastolic dysfunction, remains to be investigated. We conclude that diet should be considered as an additional important parameter for the design of experimental studies, alongside the choice of sex and strain, housing conditions, pain management and animal welfare.

Acknowledgments

The authors declare that they have no conflict of interest.

For technical assistance on echocardiographic study and pressure measurements, we thank the Therassay platform. We also thank the UTE for the housing and maintenance of the animals. Our thanks to Marja Steenman, for her careful English revision. This work was supported by « Agence Nationale de la Recherche » [ANR-13-BSV1-0003, Paris, France]

Author contribution

J.Dhot and V.Prat performed most of the experiments; M.Ferron, V.Aillerie and A.Erraud assisted with the experimental work; B.Rozec, M.De Waard, C.Gauthier and B.Lauzier participated in the study conception and design as well as data analysis and interpretation; J.Dhot, V. Prat, M.De Waard and B.Lauzier drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

4. References

- [1] Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015;385:117–71. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61682-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61682-2).
- [2] Mauvais-Jarvis F, Arnold AP, Reue K. A guide for the design of pre-clinical studies on sex differences in metabolism. *Cell Metab* 2017;25:1216–30. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.033>.
- [3] Jackson SJ, Andrews N, Ball D, Bellantuono I, Gray J, Hachoumi L, et al. Does age matter? The impact of rodent age on study outcomes. *Lab Anim* 2017;51:160–9. <https://doi.org/10.1177/0023677216653984>.
- [4] Vaillant F, Lauzier B, Poirier I, Gélinas R, Rivard M-E, Robillard Frayne I, et al. Mouse strain differences in metabolic fluxes and function of ex vivo working hearts. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 2013;306:H78–87. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00465.2013>.
- [5] How isoflavone levels in common rodent diets can interfere with the value of animal models and with experimental results. *Lab Anim* 2007;41:1–18. <https://doi.org/10.1258/00236770779399428>.
- [6] Patisaul HB, Jefferson W. The pros and cons of phytoestrogens. *Front Neuroendocrinol* 2010;31:400–19. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.03.003>.
- [7] Merlet N, Piriou N, Rozec B, Grabherr A, Lauzier B, Trochu J-N, et al. Increased beta2-adrenoceptors in doxorubicin-induced cardiomyopathy in rat. *PloS One* 2013;8:e64711. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064711>.
- [8] Ferron M, Cadiet J, Persello A, Prat V, Denis M, Erraud A, et al. O-GlcNAc stimulation: A new metabolic approach to treat septic shock. *Sci Rep* 2019;9:18751. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55381-7>.
- [9] Dhot J, Ferron M, Prat V, Persello A, Roul D, Stévant D, et al. Over-expression of endothelial β_3 – adrenergic receptor induces diastolic dysfunction in rats. *ESC Heart Fail* 2020.
- [10] Xiao Y, Zhang S, Tong H, Shi S. Comprehensive evaluation of the role of soy and isoflavone supplementation in humans and animals over the past two decades. *Phytother Res* 2018;32:384–94. <https://doi.org/10.1002/ptr.5966>.
- [11] Haines CD, Harvey PA, Luczak ED, Barthel KKB, Konhilas JP, Watson PA, et al. Estrogenic compounds are not always cardioprotective and can be lethal in males with genetic heart disease. *Endocrinology* 2012;153:4470–9. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1391>.

5. Figures

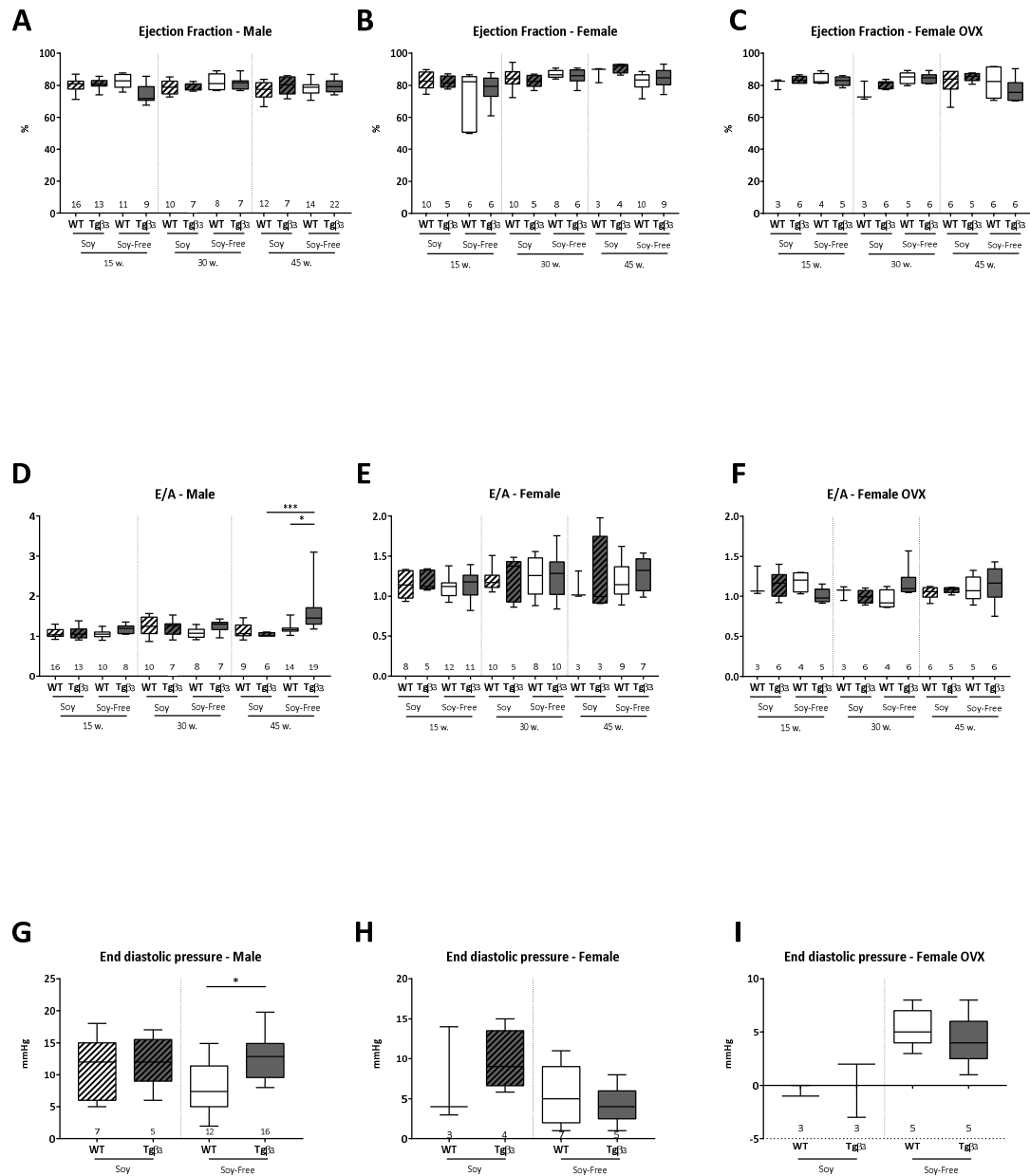


Figure 1: Echocardiography study at 15, 30 and 45 weeks of age and invasive hemodynamic study at 45 weeks of age depending on the rodent diet; with or without soy. We evaluated the ejection fraction on male (A), female (B) and OVX female (C) rats and the E/A ratio, on male (D), female (E) and OVX female (F) rats. LVEDP was evaluated at 45 weeks on male (G), female (H) and OVX female (I) rats. Data are expressed as mean $\pm$ SEM *: $p < 0.05$.

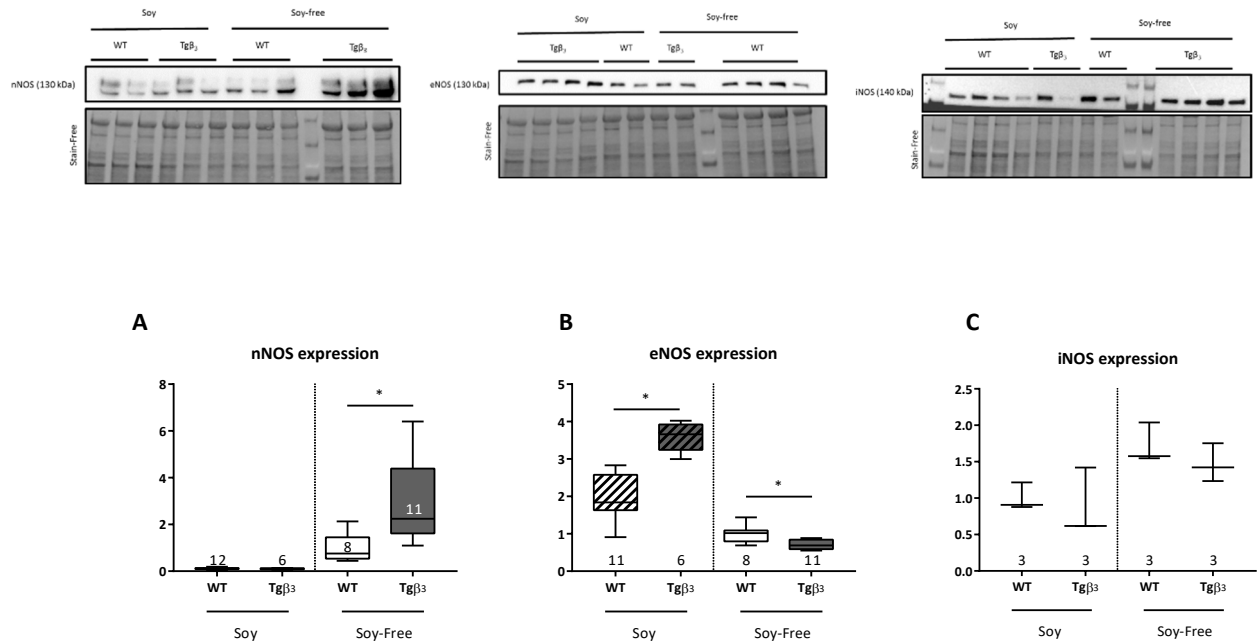


Figure 2: Changes in NOS protein expression was performed by Western blot analysis for nNOS protein expression (A), eNOS protein expression (B) and iNOS protein expression (C) on LV from male rats depending on the rodent diet (with or without soy at 45 weeks). Data are expressed as mean ± SEM *: p<0.05.

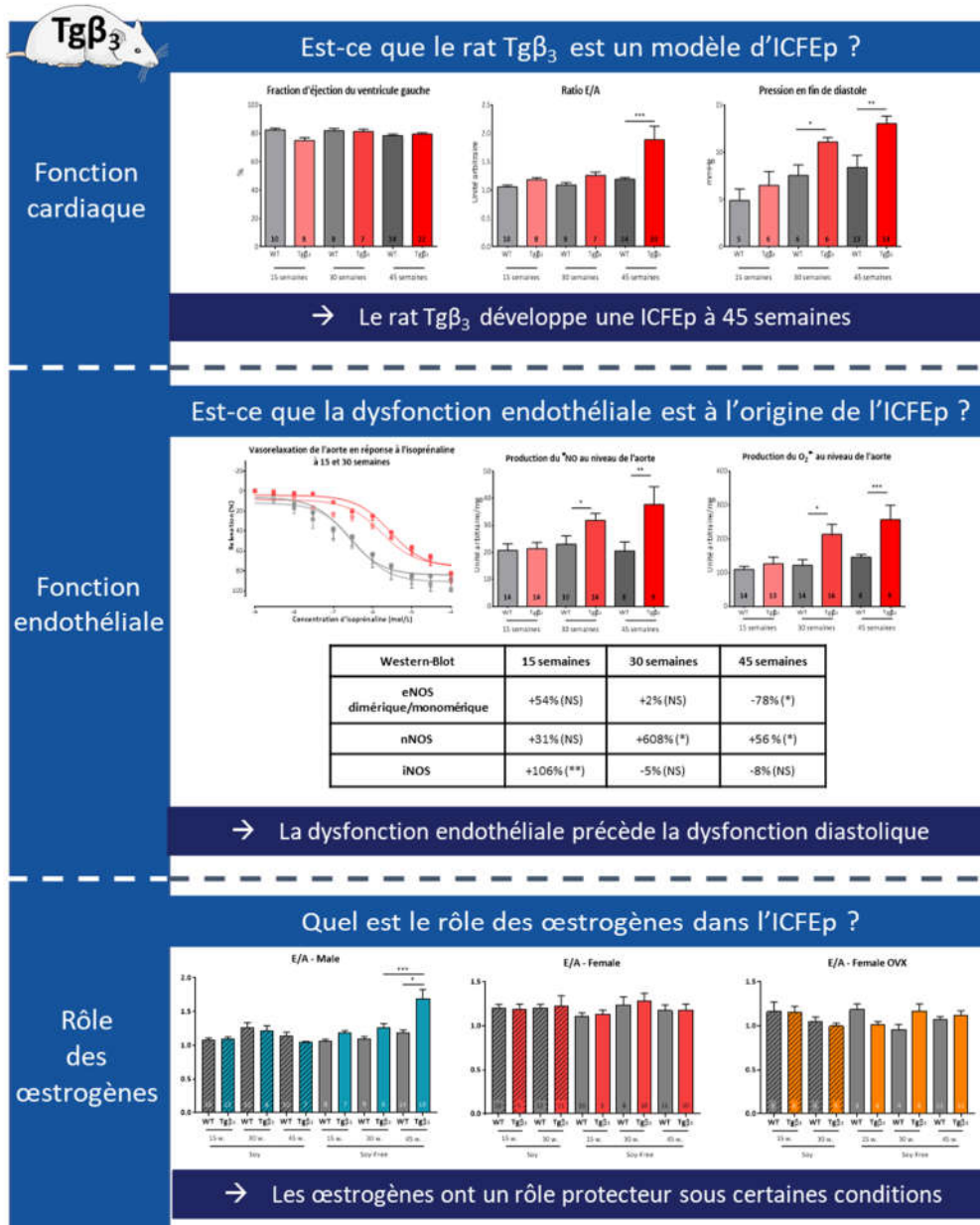
6. Table**Table 1:** Diet composition.

	RM1	2914C
Wheat/barley (g/kg)	885	630
Soybean	60	X
Whey	25	X
Soy oil	5	X
Mineral	25	20
Corn-derived	X	350
Carbohydrates (%)	44.97	48
Crude Protein (%)	14.38	14.3
Crude Oil (%)	2.71	3.4
Crude Fiber (%)	4.65	4.1
Nitrogen Free Extract (%)	61.73	66
Total Saturated Fatty Acids (%)	0.51	0.6
Total Monounsaturated Fatty Acids (%)	0.88	0.7
Total Polyunsaturated Fatty Acids (%)	0.88	2.1
Metabolism energy (kJ/g)	10	12
AFE (kJ/g)	13.75	14.47
AFE from Oil	7.42	8.77
AFE from Protein	17.49	16.52
AFE from Carbohydrates	75.09	76.26
Calcium (%)	0.73	0.7
Total Phosphorus (%)	0.52	0.6
Sodium (%)	0.25	0.1
Chloride (%)	0.38	0.3
Potassium (%)	0.67	0.6
Magnesium (%)	0.23	0.2
TGE (mg/kg)	100 – 200	<20

AFE: Atwater Fuel Energy

TGE: Total Genistein equivalent

Vue synoptique de l'approche scientifique



3.3. Discussion

Notre étude confirme que le niveau de soja dans l'alimentation module la fonction cardiaque, et que les résultats observés dépendent du sexe de l'animal. Nous avons montré que seuls les animaux mâles Tg β ₃ nourris avec un régime sans soja développent un dysfonctionnement diastolique avec le vieillissement, ce qui suggère un effet bénéfique du soja.

Au cours des vingt dernières années, de nombreuses études ont confirmé l'effet bénéfique du soja sur diverses pathologies. Ces études ont été motivées par l'utilisation massive du soja dans l'industrie alimentaire humaine ou animale pour ses qualités nutritionnelles. Les effets positifs sont liés à la présence de la daidzéine et de la génistéine, les deux principales isoflavones qui ont une structure et une activité hormonale similaires à celles du 17- β -oestradiol. Agissant comme un agoniste ou un antagoniste des récepteurs aux œstrogènes, selon le niveau endogène d'œstrogènes, les isoflavones provoquent des effets génomiques ou non génomiques qui peuvent être bénéfiques dans des conditions pathologiques (Morito et al., 2001). En effet, l'administration de génistéine réduit la fibrose myocardique, améliore la fonction cardiaque et la densité capillaire dans un modèle d'IC chez le rat (Qin et al., 2015). Des améliorations similaires ont également été observées dans des modèles de constriction aortique et de surcharge volumique. Les mécanismes impliqués seraient liés à l'activation de la voie *NO par phosphorylation de l'eNOS ou par activation de la transcription du gène codant pour l'eNOS. En plus de leur effet antioxydant et hypocholestérolémiant, les isoflavones sont également décrites comme bénéfiques dans le cancer du sein. Cependant, les isoflavones sont aussi décrites comme des stimulants du cancer. Ainsi, les effets bénéfiques ou délétères des isoflavones seraient liés à la durée d'exposition aux phytoestrogènes. Par exemple, une étude a montré que l'exposition *in utero* et précoce des rats aux phytoestrogènes entraînait une résistance accrue à la surcharge volumique (Matori et al., 2012; Xiao et al., 2018).

Dans notre étude, il sera nécessaire par la suite de déterminer l'effet des phytoestrogènes en fonction du génotype du rat. Mais ces résultats indiquent clairement que le choix du régime alimentaire n'est certainement pas une question triviale, car les rats Sprague-Dawley en bonne santé semblent développer un processus pathologique avec le vieillissement, alors que le modèle pathologique semble être protégé en cas d'exposition chronique aux phytoestrogènes. Le soja dans l'alimentation aurait donc un effet protecteur en cas de dysfonctionnement diastolique, une des hypothèses étant que l'ajout d'isoflavones jouerait sur les niveaux d'expression des eNOS et nNOS qui protégeraient ainsi de l'apparition d'un dysfonctionnement endothélial lui-même à l'initiation du dysfonctionnement diastolique. Afin de valider cette hypothèse, des analyses supplémentaires devront être effectuées pour montrer le rôle direct des l'isoflavones sur la fonction endothéliale et diastolique.

Cette controverse sur les isoflavones et leur activité hormonale a incité les autorités sanitaires à surveiller les niveaux d'isoflavones ingérés, compte tenu des effets bénéfiques ou négatifs observés. En effet, un débat est toujours en cours sur la qualification des isoflavones en tant que perturbateurs endocriniens et il est donc nécessaire de réglementer la consommation de soja.

Pour l'alimentation humaine, il est conseillé de limiter la consommation à 1 mg/Kg d'isoflavones par jour. En ce qui concerne l'alimentation animale, et plus particulièrement les régimes alimentaires des animaux de laboratoire, l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE) a fixé en 2018 la dose maximale de phytoestrogènes à 350 µg de génistéine ou équivalents / gramme d'aliment, soit 35 mg/100g. Dans notre étude, nous avons utilisé un régime avec du soja contenant entre 10 et 20 mg/100g de génistéines et un régime sans soja avec 2 mg/100g de génistéines. Bien que le régime avec soja respecte les recommandations de l'OCDE, nous rapportons quand même des variations dans le phénotype cardiaque observée.

Au-delà de la question sur les effets bénéfiques ou négatifs du soja sur la fonction cardiovasculaire, nos résultats soulignent l'importance du choix de l'alimentation dans nos études. Il est donc important de prendre en compte ce paramètre dès le début de la conception de celle-ci, quel que soit le domaine de recherche. Ainsi, le choix de l'alimentation doit être considéré comme un point critique dans les protocoles de recherche, comme c'est déjà le cas pour la douleur et le bien-être des animaux.

4. Identification de cibles thérapeutiques et biomarqueurs dans l'ICFep

4.1. Introduction

L'ICFep est une maladie cardiovasculaire chronique courante dans le monde pour laquelle il n'existe actuellement aucun traitement efficace. Comme expliqué précédemment, l'ICFep est un trouble systémique progressif influencé par le vieillissement et les comorbidités, en particulier l'obésité, qui induisent un état pro-inflammatoire systémique conduisant à un dysfonctionnement endothélial. Les mécanismes conduisant au remodelage et au dysfonctionnement du myocarde ne sont pas complètement définis. De nombreuses études convergent pour dire que l'inflammation serait à l'origine de ces mécanismes.

Le concept émergent est que l'ICFep serait un syndrome initié par des facteurs de la circulation sanguine systémique. La découverte de nouveaux biomarqueurs circulants pourrait permettre un diagnostic précoce et précis de l'ICFep, la classification des patients ou le développement de nouvelles thérapies.

Afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs dans l'ICFep, notre étude s'appuie sur un modèle préclinique de l'ICFep le rat Tg β ₃. Dans un premier temps nous avons sélectionné différents biomarqueurs potentiels à partir de l'étude transcriptomique que nous avons validé au niveau circulant dans le modèle Tg β ₃. Dans un second temps l'objectif de cette étude était de valider ces cibles au niveau circulant des patients ICFep. Ce dernier point ne sera pas présenté dans ce manuscrit du fait de la difficulté d'obtenir des échantillons de patients et de sujets contrôles.

Sur le profil transcriptomique nous avons identifié la protéine Adénylate Kinase 1 (AK1) comme significativement augmenté au niveau cardiaque chez le rat Tg β ₃ en comparaison au rat contrôle.

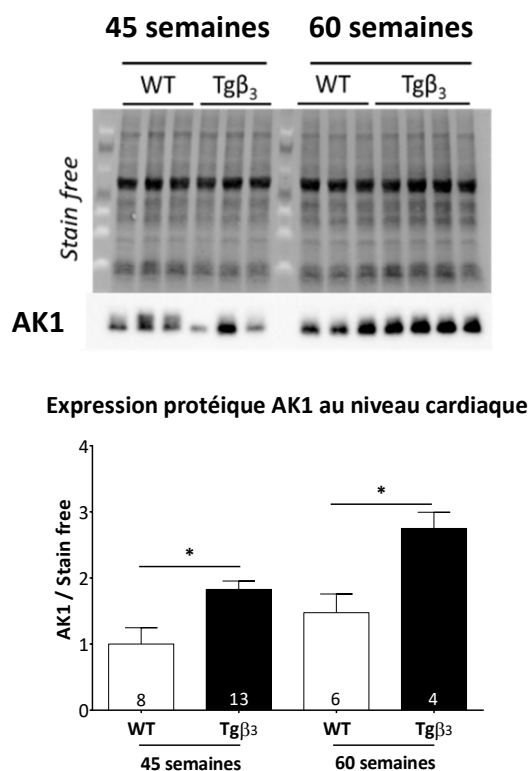


Figure 36 : Evaluation de l'expression protéique d'AK1 au niveau cardiaque à 45 et 60 semaines chez les animaux WT et Tgβ₃

Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. * : p<0.05

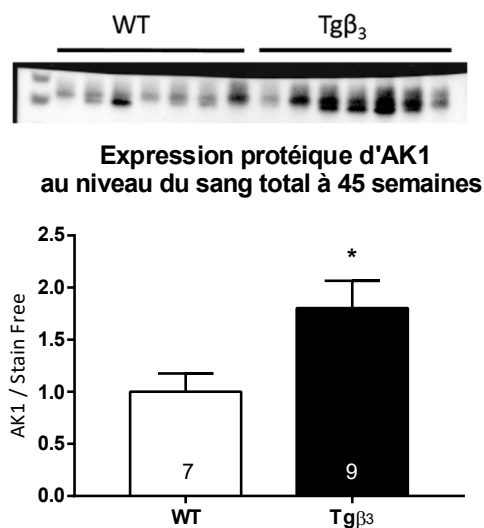


Figure 37 : Evaluation de l'expression protéique d'AK1 au niveau du sang total à 45 semaines chez les animaux WT et Tgβ₃

Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. * : p<0.05

4.2. Matériels et Méthodes

Pour l'ensemble des expérimentations, des rats de souche Sprague-Dawley transgéniques et leurs contrôles sauvages sont utilisés. La transgénèse a été réalisée par micro-injection dans des embryons d'ADN codant pour le $h\beta_3$ -AR sous la dépendance d'un promoteur ICAM-2 permettant une expression spécifiquement dans les cellules endothéliales. Les reproducteurs transgéniques mâles sont accouplés avec des femelles sauvages (élevage JANVIER, France). A leur sevrage, les rats sont identifiés, génotypés et maintenues dans des conditions d'élevage standard (température 21-24°C et cycle diurne-nocturne de 12h, avec accès à la nourriture et à l'eau à volonté) jusqu'à l'âge de 45 semaines. Afin de réaliser le génotypage des animaux, un prélèvement d'oreille est effectué dès le sevrage (3 semaines) et une *Polymerase Chain Reaction* (PCR) permet de détecter la présence du gène $h\beta_3$ -AR. Les animaux positifs sont des animaux transgéniques hétérozygotes pour le gène $h\beta_3$ -AR (Tg β_3), tandis que les animaux négatifs sont considérés sauvages (WT). Aux différents âges de l'étude, le sang et le cœur sont prélevés et une extraction de protéine est réalisée afin d'évaluer les niveaux d'expression d'AK1 (référence anticorps : ab71621) en Western-Blot.

4.3. Résultats

4.3.1. Expression cardiaque et circulante de la protéine AK1

Dans cette étude nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de la protéine AK1 à 45 et 60 semaines chez les rats Tg β_3 mâle au niveau cardiaque (Figure 36). A 60 semaines, les rats Tg β_3 présentent une dysfonction diastolique plus importante. Etant donné que l'expression de la protéine AK1 augmente à 60 semaines, il se pourrait donc que l'expression d'AK1 soit corrélée à la dysfonction diastolique.

Dans un second temps, il a été mis en évidence que cette augmentation était aussi visible au niveau circulant et plus exactement au niveau du sang total (Figure 37), suggérant ainsi que la protéine AK1 pourrait être un marqueur de la dysfonction diastolique. Afin de confirmer cette hypothèse, des études complémentaires devront être menées sur d'autres modèles animaux et sur des échantillons de sang de patients ICFEP.

4.3.2. Cohorte

Afin d'envisager une potentielle application clinique, il est nécessaire de disposer d'échantillons biologiques de patients ICFEP pour tester et valider les cibles d'intérêts identifiées avec le modèle animal. Dans cette optique, nous avons décidé de monter un projet de cohorte de patients dans le service de Cardiologie et Maladies Vasculaires du CHU de Nantes.

Cette cohorte est une cohorte observationnelle qui ne modifie pas le suivi habituel du patient. Ce type de cohorte est à visée épidémiologique et permet la création d'une bio-collection (prélèvement de sang et urine). Dans un premier temps, uniquement des patients ICFEP sont inclus. Dans un second temps, des échantillons contrôles issus de biobanques existantes seront utilisés. Ce projet de « HEART-iFICE » est porté par Jean-Noël TROCHU, David STEVANT et Imen FELLAH.

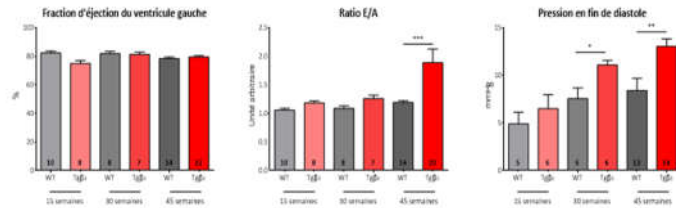
Vue synoptique de l'approche scientifique

BENCH TO BEDSIDE



Fonction
cardiaque

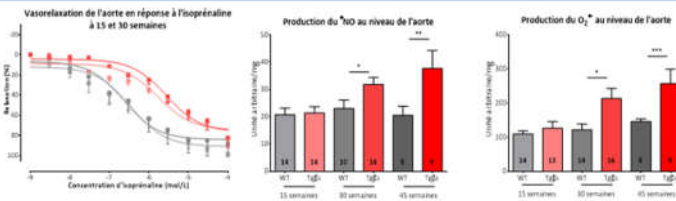
Est-ce que le rat $Tg\beta_3$ est un modèle d'ICFEP ?



→ Le rat $Tg\beta_3$ développe une ICFEP à 45 semaines

Fonction
endothéliale

Est-ce que la dysfonction endothéliale est à l'origine de l'ICFEP ?

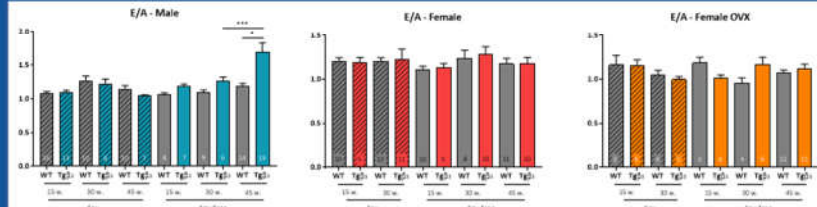


Western-Blot	15 semaines	30 semaines	45 semaines
eNOS dimérique/monomérique	+54% (NS)	+2% (NS)	-78% (*)
nNOS	+31% (NS)	+608% (*)	+56% (*)
iNOS	+106% (**)	-5% (NS)	-8% (NS)

→ La dysfonction endothéliale précède la dysfonction diastolique

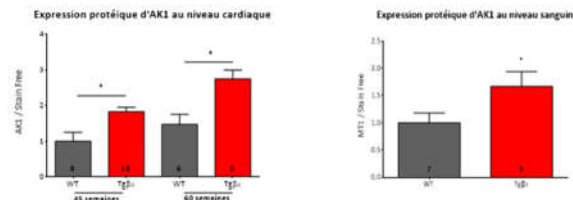
Rôle
des
œstrogènes

Quel est le rôle des œstrogènes dans l'ICFEP ?



→ Les œstrogènes ont un rôle protecteur sous certaines conditions

Quel sont les biomarqueurs de l'ICFEP dans le modèle $Tg\beta_3$?



→ AK1 est potentiellement un biomarqueur de l'ICFEP

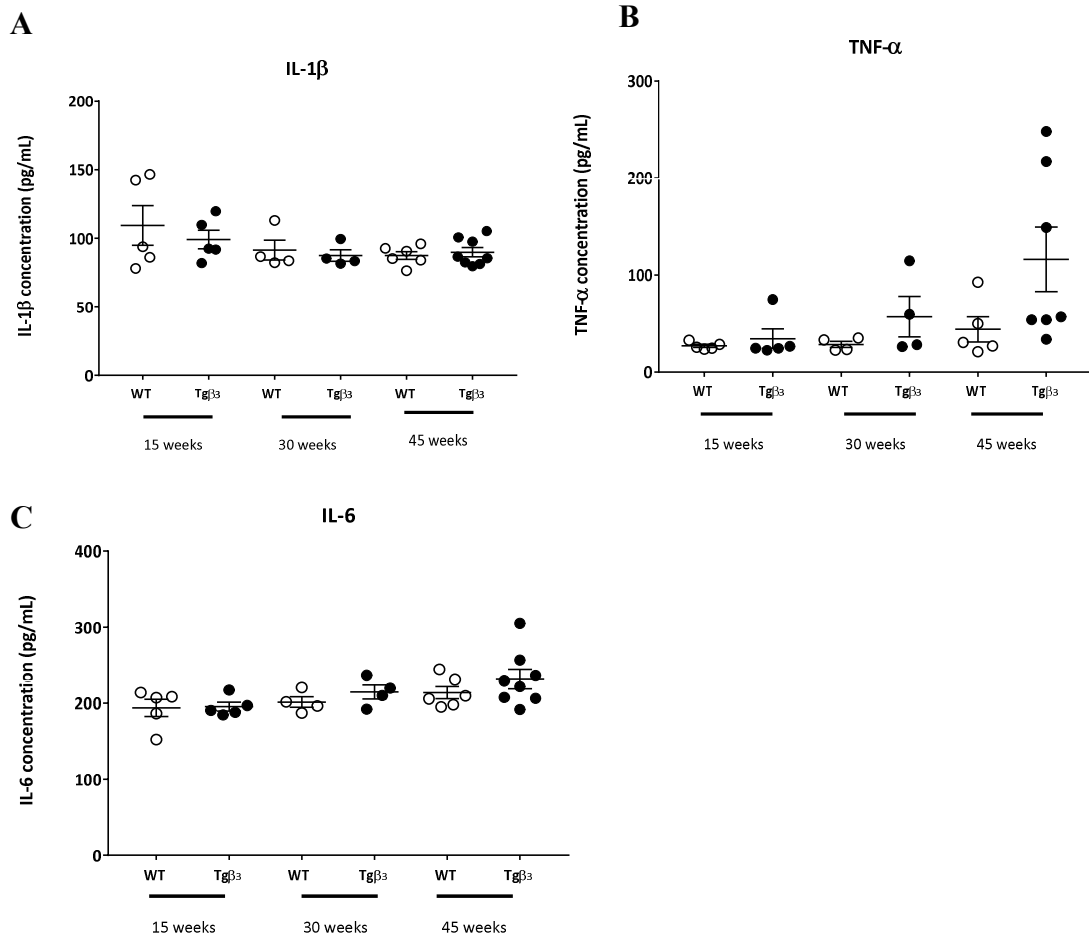


Figure 38 : Concentration plasmatique d'IL-1 β , TNF- α et d'IL-6 à 15, 30 et 45 semaines chez les WT et les Tg β_3

A : Concentration d'IL-1 β au niveau plasmatique chez les rats WT et les Tg β_3 à 15, 30 et 45 semaines. B : Concentration de TNF- α au niveau plasmatique chez les rats WT et les Tg β_3 à 15, 30 et 45 semaines. C : Concentration de TNF- α au niveau plasmatique chez les rats WT et les Tg β_3 à 15, 30 et 45 semaines. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Après des années de recherche sur le modèle Tg β_3 , l'ensemble des résultats générés pendant ma thèse et par les nombreux étudiants avant moi ont permis de conclure que les rats Tg β_3 présentent de nombreuses caractéristiques de l'ICFEp. Ce modèle ne développe pas une ICFEp caractéristique en tout point au tableau clinique retrouvé chez les patients. En effet, le fait que les femelles ne développent pas la pathologie et aussi l'absence de comorbidités sont des limitations à notre modèle. Néanmoins ces différences sont aussi des atouts, car cela nous a permis d'étudier les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la dysfonction diastolique sans comorbidités et sans l'influence des œstrogènes et phytoestrogènes.

Pendant ma thèse je me suis donc intéressée plus particulièrement à l'endothélium qui est cité comme étant à l'origine du remodelage cardiaque dans l'ICFEp. La dysfonction endothéliale retrouvée dans l'ICFEp serait induite par une inflammation bas grade elle-même causée par les comorbidités.

1. Avantages et limitations du modèle

Les deux points limitant du modèle sont l'absence d'altération cardiaque chez les femelles et l'absence de comorbidités. L'ajout de comorbidités dans le modèle permettrait d'exacerber l'inflammation et donc les dysfonctions endothéliale et diastolique observées. Afin de vérifier cette hypothèse, une étude est en cours de réalisation en Roumanie à Cluj-Napoca. Cette étude, menée par l'équipe de Stéliciana Ghibu, a pour objectif d'évaluer l'impact d'une alimentation occidentale, riche en sucre et lipide et sans soja sur le phénotype cardiaque des animaux WT et Tg β_3 . Les résultats sont en cours d'analyse pour savoir si l'obésité induite par l'alimentation va permettre une exacerbation de l'ICFEp.

L'avantage du modèle Tg β_3 est que l'on peut ajouter une ou plusieurs comorbidités afin d'étudier l'impact de ces comorbidités sur les mécanismes physiopathologiques de l'ICFEp, offrant ainsi de nombreuses combinaisons pour décortiquer les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'ICFEp, mais aussi valider l'intérêt d'AK1 comme potentiel biomarqueur de la pathologie.

Il serait intéressant de poursuivre l'investigation de la dysfonction endothéliale comme élément central de l'ICFEp. De plus, je trouverais enrichissant d'étudier le sécrétome de la cellule endothéliale, en condition pathologique. L'étude du sécrétome permettrait très certainement de mettre en évidence des facteurs, à ce jour non connus, qui induisent des altérations fonctionnelles au niveau des cellules adjacentes comme les cardiomyocytes pouvant conduire sur le long terme à un remodelage de la fonction cardiaque.

Le fait que la ratte Tg β_3 ne développe pas de dysfonction cardiaque reste non expliqué à ce jour. Au vu des résultats initiaux et au vu des données cliniques, nous pensions que les œstrogènes jouaient un rôle crucial dans la pathologie. Cependant, l'ovariectomie n'a pas permis de rétablir le phénotype observé chez les animaux mâles nourris sans soja suggérant ainsi que les œstrogènes ne se sont pas à l'origine des mécanismes physiopathologiques. Il sera donc aussi pertinent de s'intéresser à la testostérone, hormone très peu étudiée dans l'ICFEp et dont le rôle sur la fonction cardiaque n'a pas été établi.

D'autre part, cette étude pose question sur le rôle du récepteur β_3 -AR en condition pathologique et plus généralement au niveau du système cardiovasculaire. Alors que les études suggèrent que le rôle du récepteur β_3 -AR est bénéfique en condition pathologique dans le cas de l'IC et de l'hypertrophie cardiaque, notre étude suggère quant à elle que le rôle de ce récepteur est néfaste dans l'IC. Des études complémentaires doivent être envisagées pour comprendre plus en détail les mécanismes d'action de ce récepteur. Il est possible aussi que c'est la désensibilisation sur le long terme des récepteurs β -AR qui induit un déséquilibre dans la régulation de la fonction cardiaque et vasculaire. Il serait intéressant d'évaluer l'impact du stress dans l'établissement de l'ICFEp.

Comme le montre les niveaux plasmatiques des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α , IL-6), il n'y a pas d'augmentation de l'inflammation systémique (Figure 38). Cependant de nombreuses études mettent en évidence une augmentation de l'inflammation circulante comme étant à l'origine de l'ICFEp (Esposito et al., 2017; Franssen et al., 2016a; Glezeva et al., 2015). Le fait que cette inflammation n'est pas présente dans le modèle, s'explique par l'absence de comorbidités. Mais l'augmentation de l'expression de la protéine iNOS au niveau cardiaque et aortique suggèrent une faible inflammation chez les rats Tg β_3 .

Une étude en 2013 a mis en évidence que l'activation du β_3 -AR endothélial est responsable de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , CCL2, TNF α , IL-6) (Roth Flach et al., 2013). Etant donné que le rat Tg β_3 surexprime le récepteur β_3 -AR au niveau endothélial, il sera intéressant d'évaluer plus spécifiquement l'inflammation au niveau de la cellule endothéliale. Il serait aussi intéressant d'évaluer d'autres cytokines inflammatoires comme l'IL-16. En effet, les travaux de Tamaki montrent que l'augmentation de l'IL-16 circulante chez les patients ICFEp est corrélée à la dysfonction diastolique.

2. Les altérations de la fonction endothéliale

Malgré l'absence d'inflammation il a été mis en évidence une dysfonction endothéliale au niveau aortique et mésentérique. Cette dysfonction endothéliale se caractérise par une altération de la vasorelaxation à l'isoprénaline. Cependant, à l'inverse des données de la littérature, il a été mis en évidence une augmentation de la production du 'NO, un agent vasorelaxant, au niveau vasculaire et cardiaque. Cette augmentation de la production du NO est pathologique chez le rat Tg β_3 et, d'après les résultats de l'étude, est induite par l'augmentation de l'expression de la protéine nNOS. Ces résultats semblent cohérents avec la littérature, puisqu'une augmentation de l'expression de la nNOS est montrée chez des rats âgés de deux ans.

Dans ce modèle, la réponse β -AR cardiaque est également altérée en partie à cause d'une diminution du β_1 -AR et une augmentation du β_3 -AR (Birenbaum et al., 2008). Cependant il n'est pas possible d'affirmer que l'augmentation de la protéine nNOS est bénéfique ou délétère dans l'ICFEp. Des études récentes confirment l'implication des NOS dans l'ICFEp mais des recherches complémentaires sont nécessaires pour comprendre le rôle des NOS dans les mécanismes physiopathologiques.

En ce qui concerne la eNOS, elle est couramment décrite comme diminuée dans les pathologies cardiovasculaires ou lors du vieillissement. En effet lorsqu'elle est activée en condition physiologique, la dimérisation est nécessaire pour permettre la production du 'NO. En condition pathologique, la protéine eNOS est dite découplée, c'est-à-dire qu'elle reste majoritairement sous sa forme monomérique entraînant la production d'O₂^{•-}.

Il semblerait que dans le modèle Tg β ₃ le découplage de la eNOS soit responsable de l'augmentation du stress oxydant, expliquant ainsi l'altération de la fonction vasculaire observée. Cette augmentation de la production de l'O₂⁻ via la eNOS et l'augmentation de la production du ^{*}NO via la nNOS suggèrent une augmentation de la production du ONOO⁻ qui est toxique pour la cellule et peut expliquer les altérations de la fonction cardiaque ou endothéliale observée. Cette étude sur la fonction endothéliale a surtout mis en évidence qu'une altération des cellules endothéliales peut conduire sur le long terme à une altération de la fonction cardiaque et plus particulièrement à une ICFEp.

3. Les altérations du métabolisme cardiaque

L'identification de cibles thérapeutiques ou de potentiels biomarqueurs est un enjeu majeur pour l'ICFEp. Durant ma thèse j'ai pu identifier des cibles par l'analyse transcriptomique. J'ai principalement prêté attention à la protéine AK1 dont l'expression est augmentée chez les rats Tg β ₃. Décrite comme senseur d'un déséquilibre énergétique, AK1 est impliquée dans la régulation du métabolisme cardiaque, ainsi que dans de nombreuses voies de signalisation. AK1 catalyse le transfert réversible d'un phosphate entre l'ATP et l'AMP selon cette réaction : $2 \text{ ADP} \leftrightarrow \text{AMP} + \text{ATP}$, et joue ainsi un rôle important dans la régulation du taux d'AMPc et le transfert de l'énergie (Dzeja and Terzic, 2009; Dzeja et al., 2007).

En condition physiologique, le transfert de phosphate est catalysé par la créatine kinase (CK). Les altérations des composants du système CK, à savoir la réduction de la créatine, de la phosphocréatine (PCr) et de l'activité de la CK sont caractéristiques de l'IC. Le ratio PCr/ATP est un prédicteur de la mortalité de l'IC. Bien que la contribution de l'AK1 ne soit que de 10%, en réponse à un stress, elle facilite le transfert de l'énergie sous forme d'AMP. Cela déclenche une cascade de signalisation métabolique, conduisant à une augmentation de la production d'ATP via l'activation de la kinase AMP dépendante (AMPK) et régulant ainsi l'homéostasie de l'énergie myocardique (Neubauer, 2007).

Au-delà de l'intérêt d'étudier AK1 comme biomarqueur au niveau circulant il serait aussi intéressant d'étudier le rôle de cette enzyme dans notre modèle et son implication dans l'ICFEp d'autant plus que ce résultat suggère des altérations du métabolisme cardiaque. Les altérations métaboliques sont courantes chez les patients ICFEp qui souffrent souvent d'obésité ou de diabète. Depuis quelques années, les connaissances sur les altérations métaboliques associées à l'ICFEp ont beaucoup progressé (De Jong and Lopaschuk, 2017).

Dans notre modèle animal, il a été décrit une augmentation du taux de triglycérides au niveau cardiaque indiquant une augmentation du stockage ou une diminution d'utilisation des acides gras. Ces données sont particulièrement intéressantes car l'augmentation de triglycérides dans le tissu cardiaque est associée au développement de la dysfonction diastolique, comme cela a été précédemment démontré chez des patients diabétiques (van der Meer et al., 2008; Rijzewijk et al., 2008). Plusieurs études montrent l'impact de cette dysfonction métabolique dans l'IC. Tout d'abord, l'accumulation lipidique au niveau cardiaque est fréquemment associée à une diminution des niveaux d'expressions de l'AMPK – un senseur métabolique.

Une étude préliminaire a été réalisée sur le rat Tg β_3 . Les résultats indiquent une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK sur la thréonine 172 sans changement des niveaux d'expressions de la protéine AMPK. Dans le cas d'une IC, il est plutôt décrit une diminution de la protéine AMPK. Il serait donc intéressant de compléter cette étude afin d'identifier les altérations métaboliques dans l'ICFEp.

CONCLUSION

Ces études ont permis de mettre en évidence qu'une altération de la fonction endothéliale initiée par une surexpression du récepteur β_3 -AR au niveau de la cellule endothéliale induit sur le long terme une dysfonction diastolique caractéristique de l'ICFep. L'utilisation du modèle Tg β_3 nous a permis d'évaluer le rôle de la fonction endothéliale dans l'ICFep. En plus de la mise en évidence de l'impaction de la voie du NO et des NOS dans la physiopathologie de l'ICFep, nous avons mis en avant que les œstrogènes et les phytoestrogène jouent un rôle dans la mise en place de la pathologie. Néanmoins des études complémentaires seront nécessaire pour affiner nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'ICFep.

Ce modèle offre de nombreuses possibilités d'études des différentes comorbidités et des mécanismes physiopathologiques impliqués afin d'identifier de nouvelles pistes thérapeutiques ou biomarqueurs.

Par ailleurs, nos résultats ont mis en avant que la protéine AK1 pourrait représenter un futur biomarqueur de l'ICFep, afin d'identifier plus précocement les patients atteints de ce syndrome. Son expression sera évaluée au niveau du sang total des patients ICFep.

Au-delà de l'aspect scientifique, cette thèse CIFRE réalisée avec Sanofi et l'institut du thorax m'a permis de découvrir les différents aspects de la recherche. Une thèse CIFRE offre l'opportunité de découvrir le secteur privé et la recherche académique. Pendant ces trois années, j'ai pu mener à bien un projet de recherche dans son ensemble et en grande autonomie dans deux structures de recherche différents. J'ai pu me rendre compte des différences d'organisation, de budget et d'infrastructure entre la recherche dans un grand groupe pharmaceutique et dans un laboratoire de recherche public. Au-delà de ces aspects, le travail de recherche en lui-même est identique que l'on travaille dans un laboratoire public ou privé. Cette thèse CIFRE m'aura permis d'apprendre de nombreuses choses qui me seront grandement utile par la suite.

REFERENCES

- Abd El-Aziz, T.A., Mohamed, R.H., Mohamed, R.H., and Pasha, H.F. (2012). Leptin, leptin gene and leptin receptor gene polymorphism in heart failure with preserved ejection fraction. *Heart Vessels* 27, 271–279.
- Abe, T., Ohga, Y., Tabayashi, N., Kobayashi, S., Sakata, S., Misawa, H., Tsuji, T., Kohzuki, H., Suga, H., Taniguchi, S., et al. (2002). Left ventricular diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus model rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 282, H138–H148.
- Abernethy, A., Raza, S., Sun, J.-L., Anstrom, K.J., Tracy, R., Steiner, J., VanBuren, P., and LeWinter, M.M. (2018). Pro-Inflammatory Biomarkers in Stable Versus Acutely Decompensated Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Heart Assoc* 7.
- Adak, S., Aulak, K.S., and Stuehr, D.J. (2002). Direct evidence for nitric oxide production by a nitric-oxide synthase-like protein from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 277, 16167–16171.
- Adams, V., Alves, M., Fischer, T., Rolim, N., Werner, S., Schütt, N., Bowen, T.S., Linke, A., Schuler, G., and Wisloff, U. (2015). High-intensity interval training attenuates endothelial dysfunction in a Dahl salt-sensitive rat model of heart failure with preserved ejection fraction. *Journal of Applied Physiology* 119, 745–752.
- Agouni, A., Lagrue-Lak-Hal, A.-H., Mostefai, H.A., Tesse, A., Mulder, P., Rouet, P., Desmoulin, F., Heymes, C., Martínez, M.C., and Andriantsitohaina, R. (2009). Red Wine Polyphenols Prevent Metabolic and Cardiovascular Alterations Associated with Obesity in Zucker Fatty Rats (Fa/Fa). *PLoS One* 4.
- Ahlquist, R.P. (1966). The adrenergic receptor. *J Pharm Sci* 55, 359–367.
- Ai, X., Curran, J.W., Shannon, T.R., Bers, D.M., and Pogwizd, S.M. (2005). Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in heart failure. *Circ. Res.* 97, 1314–1322.
- Akata, T. (2007). Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca^{2+} mobilization and/or myofilament Ca^{2+} sensitivity in vascular smooth muscle cells. *J Anesth* 21, 232–242.
- Akiyama, E., Sugiyama, S., Matsuzawa, Y., Konishi, M., Suzuki, H., Nozaki, T., Ohba, K., Matsubara, J., Maeda, H., Horibata, Y., et al. (2012). Incremental prognostic significance of peripheral endothelial dysfunction in patients with heart failure with normal left ventricular ejection fraction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 60, 1778–1786.
- Akiyama, E., Cinotti, R., Čerlinskaitė, K., Van Aelst, L.N.L., Arrigo, M., Placido, R., Chouihed, T., Girerd, N., Zannad, F., Rossignol, P., et al. (2020). Improved cardiac and venous pressures during hospital stay in patients with acute heart failure: an echocardiography and biomarkers study. *ESC Heart Fail* 7, 996–1006.

REFERENCES

- Alex, L., Russo, I., Holoborodko, V., and Frangogiannis, N.G. (2018). Characterization of a mouse model of obesity-related fibrotic cardiomyopathy that recapitulates features of human heart failure with preserved ejection fraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 315, H934–H949.
- Amour, J., Loyer, X., Le Guen, M., Mabrouk, N., David, J.-S., Camors, E., Carusio, N., Vivien, B., Andriantsitohaina, R., Heymes, C., et al. (2007). Altered contractile response due to increased beta3-adrenoceptor stimulation in diabetic cardiomyopathy: the role of nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide. *Anesthesiology* 107, 452–460.
- Anand, I.S. (2008). Anemia and chronic heart failure implications and treatment options. *J. Am. Coll. Cardiol.* 52, 501–511.
- Anavi, S., and Tirosh, O. (2020). iNOS as a metabolic enzyme under stress conditions. *Free Radic. Biol. Med.* 146, 16–35.
- Andrew, P.J., and Mayer, B. (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43, 521–531.
- Angeli, F., Reboldi, G., Trapasso, M., Gentile, G., Pinzagli, M.G., Aita, A., and Verdecchia, P. (2019). European and US guidelines for arterial hypertension: similarities and differences. *European Journal of Internal Medicine* 63, 3–8.
- Angelone, T., Filice, E., Quintieri, A.M., Imbrogno, S., Recchia, A., Pulerà, E., Mannarino, C., Pellegrino, D., and Cerra, M.C. (2008). Beta3-adrenoceptors modulate left ventricular relaxation in the rat heart via the NO-cGMP-PKG pathway. *Acta Physiol (Oxf)* 193, 229–239.
- Anker, S.D., Agewall, S., Borggrefe, M., Calvert, M., Jaime Caro, J., Cowie, M.R., Ford, I., Paty, J.A., Riley, J.P., Swedberg, K., et al. (2014). The importance of patient-reported outcomes: a call for their comprehensive integration in cardiovascular clinical trials. *Eur. Heart J.* 35, 2001–2009.
- Anwar, M.S., Iskandar, M.Z., Parry, H.M., Doney, A.S., Palmer, C.N., and Lang, C.C. (2015). The future of pharmacogenetics in the treatment of heart failure. *Pharmacogenomics* 16, 1817–1827.
- Assar, M.E., Angulo, J., and Rodríguez-Mañas, L. (2016). Diabetes and ageing-induced vascular inflammation. *J. Physiol. (Lond.)* 594, 2125–2146.
- Ather, S., Chan, W., Bozkurt, B., Aguilar, D., Ramasubbu, K., Zachariah, A.A., Wehrens, X.H.T., and Deswal, A. (2012). Impact of noncardiac comorbidities on morbidity and mortality in a predominantly male population with heart failure and preserved versus reduced ejection fraction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 59, 998–1005.
- Aurigemma, G.P., and Gaasch, W.H. (2004). Clinical practice. Diastolic heart failure. *N. Engl. J. Med.* 351, 1097–1105.
- Babiker, F.A., De Windt, L.J., Van Eickels, M., Thijssen, V., Bronsaer, R.J.P., Grohé, C., Van Bilsen, M., and Doevendans, P.A. (2004). 17 β -Estradiol Antagonizes Cardiomyocyte

REFERENCES

- Hypertrophy by Autocrine/Paracrine Stimulation of a Guanylyl Cyclase A Receptor-Cyclic Guanosine Monophosphate-Dependent Protein Kinase Pathway. *Circulation* 109, 269–276.
- Babušíková, E., Lehotský, J., Dobrota, D., Račay, P., and Kaplán, P. (2012). Age-Associated Changes in Ca²⁺-ATPase and Oxidative Damage in Sarcoplasmic Reticulum of Rat Heart. *Physiological Research* 453–460.
- Baldasseroni, S., Opasich, C., Gorini, M., Lucci, D., Marchionni, N., Marini, M., Campana, C., Perini, G., Deorsola, A., Masotti, G., et al. (2002). Left bundle-branch block is associated with increased 1-year sudden and total mortality rate in 5517 outpatients with congestive heart failure: a report from the Italian network on congestive heart failure. *Am. Heart J.* 143, 398–405.
- Balligand, J.L., Kelly, R.A., Marsden, P.A., Smith, T.W., and Michel, T. (1993). Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 347–351.
- Balligand, J.L., Ungureanu-Longrois, D., Simmons, W.W., Pimental, D., Malinski, T.A., Kapturczak, M., Taha, Z., Lowenstein, C.J., Davidoff, A.J., and Kelly, R.A. (1994). Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J. Biol. Chem.* 269, 27580–27588.
- Battault, S., Singh, F., Gayrard, S., Zoll, J., Reboul, C., and Meyer, G. (2016). Endothelial function does not improve with high-intensity continuous exercise training in SHR: implications of eNOS uncoupling. *Hypertension Research* 39, 70–78.
- Belge Catharina, Hammond Joanna, Dubois-Deruy Emilie, Manoury Boris, Hamelet Julien, Beauloye Christophe, Markl Andreas, Pouleur Anne-Catherine, Bertrand Luc, Esfahani Hrag, et al. (2014). Enhanced Expression of β 3-Adrenoceptors in Cardiac Myocytes Attenuates Neurohormone-Induced Hypertrophic Remodeling Through Nitric Oxide Synthase. *Circulation* 129, 451–462.
- Berg, A.H., and Scherer, P.E. (2005). Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ. Res.* 96, 939–949.
- Bergström, A., Andersson, B., Edner, M., Nylander, E., Persson, H., and Dahlström, U. (2004). Effect of carvedilol on diastolic function in patients with diastolic heart failure and preserved systolic function. Results of the Swedish Doppler-echocardiographic study (SWEDIC). *European Journal of Heart Failure* 6, 453–461.
- Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* 415, 198–205.
- Bessman, S.P., and Geiger, P.J. (1981). Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. *Science* 211, 448–452.
- Bhatia, R.S., Tu, J.V., Lee, D.S., Austin, P.C., Fang, J., Haouzi, A., Gong, Y., and Liu, P.P. (2006). Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study. *The New England Journal of Medicine* 355, 260–269.

REFERENCES

- Bikou, O., Miyashita, S., and Ishikawa, K. (2018). Pig Model of Increased Cardiac Afterload Induced by Ascending Aortic Banding. *Methods Mol. Biol.* 1816, 337–342.
- Birenbaum, A., Tesse, A., Loyer, X., Michelet, P., Andriantsitohaina, R., Heymes, C., Riou, B., and Amour, J. (2008). Involvement of β 3-Adrenoceptor in Altered β -Adrenergic Response in Senescent Heart Role of Nitric Oxide Synthase 1-derived Nitric Oxide. *Anesthes* 109, 1045–1053.
- Bischof, O., Dejean, A., and Pineau, P. (2009). Une re-vue de la sénescence cellulaire - Ami ou ennemi de la promotion tumorale ? *Med Sci (Paris)* 25, 153–160.
- Bishu, K., Hamdani, N., Mohammed, S.F., Kruger, M., Ohtani, T., Ogut, O., Brozovich, F.V., Burnett, J.C., Linke, W.A., and Redfield, M.M. (2011). Sildenafil and B-type natriuretic peptide acutely phosphorylate titin and improve diastolic distensibility in vivo. *Circulation* 124, 2882–2891.
- Black, J.W., Crowther, A.F., Shanks, R.G., Smith, L.H., and Dornhorst, A.C. (1964). A NEW ADRENERGIC BETARECEPTOR ANTAGONIST. *Lancet* 1, 1080–1081.
- Bloom, M.W., Greenberg, B., Jaarsma, T., Januzzi, J.L., Lam, C.S.P., Maggioni, A.P., Trochu, J.-N., and Butler, J. (2017). Heart failure with reduced ejection fraction. *Nature Reviews Disease Primers* 3, 1–19.
- Borbély, A., Papp, Z., Edes, I., and Paulus, W.J. (2009). Molecular determinants of heart failure with normal left ventricular ejection fraction. *Pharmacol Rep* 61, 139–145.
- Borghetti, G., von Lewinski, D., Eaton, D.M., Sourij, H., Houser, S.R., and Wallner, M. (2018). Diabetic Cardiomyopathy: Current and Future Therapies. *Beyond Glycemic Control. Front. Physiol.* 9.
- Borlaug, B.A. (2014). The pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nature Reviews Cardiology* 11, 507–515.
- Borlaug, B.A., and Kass, D.A. (2009). Invasive hemodynamic assessment in heart failure. *Heart Fail Clin* 5, 217–228.
- Borlaug, B.A., and Paulus, W.J. (2011). Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Eur. Heart J.* 32, 670–679.
- Borlaug, B.A., Lam, C.S.P., Roger, V.L., Rodeheffer, R.J., and Redfield, M.M. (2009). Contractility and ventricular systolic stiffening in hypertensive heart disease insights into the pathogenesis of heart failure with preserved ejection fraction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54, 410–418.
- Borlaug, B.A., Olson, T.P., Lam, C.S.P., Flood, K.S., Lerman, A., Johnson, B.D., and Redfield, M.M. (2010). Global cardiovascular reserve dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 56, 845–854.
- Borlaug, B.A., Kane, G.C., Melenovsky, V., and Olson, T.P. (2016). Abnormal right ventricular-pulmonary artery coupling with exercise in heart failure with preserved ejection fraction. *Eur. Heart J.* 37, 3293–3302.

REFERENCES

- Borlaug, B.A., Anstrom, K.J., Lewis, G.D., Shah, S.J., Levine, J.A., Koepp, G.A., Givertz, M.M., Felker, G.M., LeWinter, M.M., Mann, D.L., et al. (2018). Effect of Inorganic Nitrite vs Placebo on Exercise Capacity Among Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: The INDIE-HFpEF Randomized Clinical Trial. *JAMA* 320, 1764–1773.
- Borlaug Barry A., and Redfield Margaret M. (2011). Diastolic and Systolic Heart Failure Are Distinct Phenotypes Within the Heart Failure Spectrum. *Circulation* 123, 2006–2014.
- Borlaug Barry A., Melenovsky Vojtech, Russell Stuart D., Kessler Kristy, Pacak Karel, Becker Lewis C., and Kass David A. (2006). Impaired Chronotropic and Vasodilator Reserves Limit Exercise Capacity in Patients With Heart Failure and a Preserved Ejection Fraction. *Circulation* 114, 2138–2147.
- Boustany, C.M., Bharadwaj, K., Daugherty, A., Brown, D.R., Randall, D.C., and Cassis, L.A. (2004). Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287, R943-949.
- Brixius, K., Bloch, W., Pott, C., Napp, A., Krahwinkel, A., Ziskoven, C., Koriller, M., Mehlhorn, U., Hescheler, J., Fleischmann, B., et al. (2004). Mechanisms of beta 3-adrenoceptor-induced eNOS activation in right atrial and left ventricular human myocardium. *Br J Pharmacol* 143, 1014–1022.
- Brodde, O.E., and Michel, M.C. (1999). Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* 51, 651–690.
- Brouwers, F.P., de Boer, R.A., van der Harst, P., Voors, A.A., Gansevoort, R.T., Bakker, S.J., Hillege, H.L., van Veldhuisen, D.J., and van Gilst, W.H. (2013). Incidence and epidemiology of new onset heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction in a community-based cohort: 11-year follow-up of PREVEND. *Eur Heart J* 34, 1424–1431.
- Brown, S.M., Pittman, J.E., Hirshberg, E.L., Jones, J.P., Lanspa, M.J., Kuttler, K.G., Litwin, S.E., and Grissom, C.K. (2012). Diastolic dysfunction and mortality in early severe sepsis and septic shock: a prospective, observational echocardiography study. *Crit Ultrasound J* 4, 8.
- Brutsaert, D.L. (2003). Cardiac Endothelial-Myocardial Signaling: Its Role in Cardiac Growth, Contractile Performance, and Rhythmicity. *Physiological Reviews* 83, 59–115.
- Brutsaert, D.L., and De Keulenaer, G.W. (2006). Diastolic heart failure: a myth. *Curr. Opin. Cardiol.* 21, 240–248.
- Brutsaert, D.L., and Sys, S.U. (1989). Relaxation and diastole of the heart. *Physiological Reviews* 69, 1228–1315.
- Bui, A.L., Horwich, T.B., and Fonarow, G.C. (2011). Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat Rev Cardiol* 8, 30–41.
- Burhans, M.S., Hagman, D.K., Kuzma, J.N., Schmidt, K.A., and Kratz, M. (2018). Contribution of Adipose Tissue Inflammation to the Development of Type 2 Diabetes Mellitus. *Compr Physiol* 9, 1–58.

REFERENCES

- Burton, D.G.A. (2009). Cellular senescence, ageing and disease. *Age (Dordr)* 31, 1–9.
- Buttery, L.D., Springall, D.R., Chester, A.H., Evans, T.J., Standfield, E.N., Parums, D.V., Yacoub, M.H., and Polak, J.M. (1996). Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab. Invest.* 75, 77–85.
- Cai, H., and Harrison, D.G. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidant stress. *Circulation Research* 87, 840–844.
- Cain, B.S., Meldrum, D.R., Joo, K.S., Wang, J.-F., Meng, X., Cleveland, J.C., Banerjee, A., and Harken, A.H. (1998). Human SERCA2a levels correlate inversely with age in senescent human myocardium. *Journal of the American College of Cardiology* 32, 458–467.
- Camici, G.G., Savarese, G., Akhmedov, A., and Lüscher, T.F. (2015). Molecular mechanism of endothelial and vascular aging: implications for cardiovascular disease. *Eur Heart J* 36, 3392–3403.
- Campbell, R.T., Jhund, P.S., Castagno, D., Hawkins, N.M., Petrie, M.C., and McMurray, J.J.V. (2012). What have we learned about patients with heart failure and preserved ejection fraction from DIG-PEF, CHARM-preserved, and I-PRESERVE? *J. Am. Coll. Cardiol.* 60, 2349–2356.
- Campisi, J., Andersen, J.K., Kapahi, P., and Melov, S. (2011). Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin. Cancer Biol.* 21, 354–359.
- Cannavo, A., and Koch, W.J. (2017). Targeting β 3-Adrenergic Receptors in the Heart: Selective Agonism and β -Blockade. *J Cardiovasc Pharmacol* 69, 71–78.
- Cao, N., Wong, Y.G., Rosli, S., Kiriazis, H., Huynh, K., Qin, C., Du, X.-J., Kemp-Harper, B.K., and Ritchie, R.H. (2015). Chronic administration of the nitroxyl donor 1-nitrosocyclohexyl acetate limits left ventricular diastolic dysfunction in a mouse model of diabetes mellitus in vivo. *Circ Heart Fail* 8, 572–581.
- Carbone, S., Canada, J.M., Buckley, L.F., Trankle, C.R., Dixon, D.L., Buzzetti, R., Arena, R., Van Tassell, B.W., and Abbate, A. (2016). Obesity Contributes to Exercise Intolerance in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 68, 2487–2488.
- Carvalho-Filho, M.A., Ueno, M., Hirabara, S.M., Seabra, A.B., Carvalheira, J.B.C., de Oliveira, M.G., Velloso, L.A., Curi, R., and Saad, M.J.A. (2005). S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes* 54, 959–967.
- Casadei, B., and Sears, C.E. (2003). Nitric-oxide-mediated regulation of cardiac contractility and stretch responses. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 82, 67–80.
- Celermajer, D.S. (1997). Endothelial Dysfunction: Does It Matter? Is It Reversible? *Journal of the American College of Cardiology* 30, 325–333.
- Celermajer, D.S., Sorensen, K.E., Spiegelhalter, D.J., Georgakopoulos, D., Robinson, J., and Deanfield, J.E. (1994). Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J. Am. Coll. Cardiol.* 24, 471–476.

REFERENCES

- Chamberlain, A.M., St Sauver, J.L., Gerber, Y., Manemann, S.M., Boyd, C.M., Dunlay, S.M., Rocca, W.A., Finney Rutten, L.J., Jiang, R., Weston, S.A., et al. (2015). Multimorbidity in heart failure: a community perspective. *Am. J. Med.* 128, 38–45.
- Chandler, M.P., Kerner, J., Huang, H., Vazquez, E., Reszko, A., Martini, W.Z., Hoppel, C.L., Imai, M., Rastogi, S., Sabbah, H.N., et al. (2004). Moderate severity heart failure does not involve a downregulation of myocardial fatty acid oxidation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287, H1538-1543.
- Charreau, B., Ménoret, S., Tesson, L., Azimzadeh, A., Audet, M., Wolf, P., Marquet, R., Verbakel, C., Ijzermans, J., Cowan, P., et al. (1999). Protection against hyperacute xenograft rejection of transgenic rat hearts expressing human decay accelerating factor (DAF) transplanted into primates. *Mol. Med.* 5, 617–630.
- Chassot, P. (2010). *Précis d'Anesthésie cardiaque* 5.
- Chelu, M.G., and Wehrens, X.H.T. (2007). Sarcoplasmic reticulum calcium leak and cardiac arrhythmias. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 952–956.
- Cheng, R.K., Cox, M., Neely, M.L., Heidenreich, P.A., Bhatt, D.L., Eapen, Z.J., Hernandez, A.F., Butler, J., Yancy, C.W., and Fonarow, G.C. (2014). Outcomes in patients with heart failure with preserved, borderline, and reduced ejection fraction in the Medicare population. *Am. Heart J.* 168, 721–730.
- Chu, G., Lester, J.W., Young, K.B., Luo, W., Zhai, J., and Kranias, E.G. (2000). A Single Site (Ser16) Phosphorylation in Phospholamban Is Sufficient in Mediating Its Maximal Cardiac Responses to β -Agonists. *J. Biol. Chem.* 275, 38938–38943.
- Clark, H., Krum, H., and Hopper, I. (2014). Worsening renal function during renin-angiotensin-aldosterone system inhibitor initiation and long-term outcomes in patients with left ventricular systolic dysfunction. *Eur. J. Heart Fail.* 16, 41–48.
- Cleland, J.G.F., Swedberg, K., Follath, F., Komajda, M., Cohen-Solal, A., Aguilar, J.C., Dietz, R., Gavazzi, A., Hobbs, R., Korewicki, J., et al. (2003). The EuroHeart Failure survey programme—a survey on the quality of care among patients with heart failure in EuropePart 1: patient characteristics and diagnosis. *Eur Heart J* 24, 442–463.
- Cleland, J.G.F., Tendera, M., Adamus, J., Freemantle, N., Polonski, L., Taylor, J., and PEP-CHF Investigators (2006). The perindopril in elderly people with chronic heart failure (PEP-CHF) study. *Eur. Heart J.* 27, 2338–2345.
- Colantonio, L.D., Booth, J.N., Bress, A.P., Whelton, P.K., Shimbo, D., Levitan, E.B., Howard, G., Safford, M.M., and Muntner, P. (2018). 2017 ACC/AHA Blood Pressure Treatment Guideline Recommendations and Cardiovascular Risk. *Journal of the American College of Cardiology* 72, 1187–1197.
- Coles, A.H., Tisminetzky, M., Yarzebski, J., Lessard, D., Gore, J.M., Darling, C.E., and Goldberg, R.J. (2015). Magnitude of and Prognostic Factors Associated With 1-Year Mortality After Hospital Discharge for Acute Decompensated Heart Failure Based on Ejection Fraction Findings. *J Am Heart Assoc* 4.

REFERENCES

- Collier, P., Watson, C.J., Voon, V., Phelan, D., Jan, A., Mak, G., Martos, R., Baugh, J.A., Ledwidge, M.T., and McDonald, K.M. (2011). Can emerging biomarkers of myocardial remodelling identify asymptomatic hypertensive patients at risk for diastolic dysfunction and diastolic heart failure? *European Journal of Heart Failure* 13, 1087–1095.
- Collier, P., Ledwidge, M., and McDonald, K. (2012). Diagnostics and therapeutic interventions in myocardial interstitial disease, a previously neglected pathology. *QJM* 105, 721–724.
- Colliva, A., Braga, L., Giacca, M., and Zacchigna, S. (2020). Endothelial cell-cardiomyocyte crosstalk in heart development and disease. *J Physiol* 598, 2923–2939.
- Commoner, B., Townsend, J., and Pake, G.E. (1954). Free radicals in biological materials. *Nature* 174, 689–691.
- Conceição, G., Heinonen, I., Lourenço, A.P., Duncker, D.J., and Falcão-Pires, I. (2016). Animal models of heart failure with preserved ejection fraction. *Neth Heart J* 24, 275–286.
- Conraads, V.M., Metra, M., Kamp, O., De Keulenaer, G.W., Pieske, B., Zamorano, J., Vardas, P.E., Böhm, M., and Dei Cas, L. (2012). Effects of the long-term administration of nebivolol on the clinical symptoms, exercise capacity, and left ventricular function of patients with diastolic dysfunction: results of the ELANDD study. *Eur. J. Heart Fail.* 14, 219–225.
- Costantino, S., and Cosentino, F.P. and F. (2015). Targeting Chromatin Remodeling to Prevent Cardiovascular Disease in Diabetes.
- Crouch, M.A. (2005). Chronic Heart Failure: Developments and Perspectives. *The Consultant Pharmacist* 20, 751–765.
- Curl, C.L., Danes, V.R., Bell, J.R., Raaijmakers, A.J.A., Ip, W.T.K., Chandramouli, C., Harding, T.W., Porrello, E.R., Erickson, J.R., Charchar, F.J., et al. (2018). Cardiomyocyte Functional Etiology in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction Is Distinctive—A New Preclinical Model. *J Am Heart Assoc* 7.
- Daaka, Y., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (1997). Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390, 88–91.
- Dale, H.H. (1906). On some physiological actions of ergot. *The Journal of Physiology* 34, 163–206.
- Davie, A.P., Francis, C.M., Love, M.P., Caruana, L., Starkey, I.R., Shaw, T.R., Sutherland, G.R., and McMurray, J.J. (1996). Value of the electrocardiogram in identifying heart failure due to left ventricular systolic dysfunction. *BMJ* 312, 222.
- Davie, A.P., Francis, C.M., Caruana, L., Sutherland, G.R., and McMurray, J.J. (1997). Assessing diagnosis in heart failure: which features are any use? *QJM* 90, 335–339.
- De Jong, K.A., and Lopaschuk, G.D. (2017). Complex Energy Metabolic Changes in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction and Heart Failure With Reduced Ejection Fraction. *Can J Cardiol* 33, 860–871.

REFERENCES

- De Keulenaer, G.W., and Brutsaert, D.L. (2007). Diastolic Heart Failure: A Separate Disease or Selection Bias? *Progress in Cardiovascular Diseases* 49, 275–283.
- De Keulenaer, G.W., Segers, V.F.M., Zannad, F., and Brutsaert, D.L. (2017). The future of pleiotropic therapy in heart failure. Lessons from the benefits of exercise training on endothelial function. *European Journal of Heart Failure* 19, 603–614.
- De Peretti, C., Pérel, C., Tuppin, P., Iliou, M., Juillière, Y., Gabet, A., Olié, V., Danet, S., and Danchin, N. (2014). Prévalences et statut fonctionnel des cardiopathies ischémiques et de l'insuffisance cardiaque dans la population adulte en France : apports des enquêtes déclaratives « Handicap-Santé ». *Bull Epidemiol Hebd.* 172–181.
- Defer, N., Best-Belpomme, M., and Hanoune, J. (2000). Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am J Physiol Renal Physiol* 279, F400–416.
- Desai, A.S., Mitchell, G.F., Fang, J.C., and Creager, M.A. (2009). Central aortic stiffness is increased in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *J Card Fail* 15, 658–664.
- Dessauer, C.W. (2009). Adenylyl cyclase--A-kinase anchoring protein complexes: the next dimension in cAMP signaling. *Mol Pharmacol* 76, 935–941.
- Deswal, A., Richardson, P., Bozkurt, B., and Mann, D.L. (2011). Results of the Randomized Aldosterone Antagonism in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction trial (RAAM-PEF). *J. Card. Fail.* 17, 634–642.
- Dhingra, A., Garg, A., Kaur, S., Chopra, S., Batra, J.S., Pandey, A., Chaanine, A.H., and Agarwal, S.K. (2014). Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Curr Heart Fail Rep* 11, 354–365.
- Dhot, J., Ferron, M., Prat, V., Persello, A., Roul, D., Stévant, D., Guijarro, D., Piriou, N., Aillerie, V., Erraud, A., et al. (2020). Over-expression of endothelial β_3 – adrenergic receptor induces diastolic dysfunction in rats. *ESC Heart Failure*.
- Dickstein, K., Cohen-Solal, A., Filippatos, G., McMurray, J.J.V., Ponikowski, P., Poole-Wilson, P.A., Strömberg, A., van Veldhuisen, D.J., Atar, D., Hoes, A.W., et al. (2008). ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur Heart J* 29, 2388–2442.
- Dixon, R.A., Kobilka, B.K., Strader, D.J., Benovic, J.L., Dohlman, H.G., Frielle, T., Bolanowski, M.A., Bennett, C.D., Rands, E., Diehl, R.E., et al. (1986). Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321, 75–79.
- Doggrell, S.A., and Brown, L. (1998). Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res* 39, 89–105.

REFERENCES

- Doi, R., Masuyama, T., Yamamoto, K., Doi, Y., Mano, T., Sakata, Y., Ono, K., Kuzuya, T., Hirota, S., Koyama, T., et al. (2000). Development of different phenotypes of hypertensive heart failure: systolic versus diastolic failure in Dahl salt-sensitive rats. *Journal of Hypertension* 18, 111–120.
- Dunlay, S.M., Roger, V.L., and Redfield, M.M. (2017). Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nature Reviews Cardiology* 14, 591–602.
- Duprez, D.A., Gross, M.D., Kizer, J.R., Ix, J.H., Hundley, W.G., and Jacobs, D.R. (2018). Predictive Value of Collagen Biomarkers for Heart Failure With and Without Preserved Ejection Fraction: MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *J Am Heart Assoc* 7.
- Dzeja, P., and Terzic, A. (2009). Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. *Int J Mol Sci* 10, 1729–1772.
- Dzeja, P.P., Bast, P., Pucar, D., Wieringa, B., and Terzic, A. (2007). Defective metabolic signaling in adenylate kinase AK1 gene knock-out hearts compromises post-ischemic coronary reflow. *J. Biol. Chem.* 282, 31366–31372.
- E. Klabunde, R. (2012). *Cardiovascular Physiology Concepts*, Second Edition.
- Eckel, J., and Reinauer, H. (1990). Insulin action on glucose transport in isolated cardiac myocytes: signalling pathways and diabetes-induced alterations. *Biochem Soc Trans* 18, 1125–1127.
- Edelmann, F., Wachter, R., Schmidt, A.G., Kraigher-Krainer, E., Colantonio, C., Kamke, W., Duvinage, A., Stahrenberg, R., Durstewitz, K., Löffler, M., et al. (2013). Effect of spironolactone on diastolic function and exercise capacity in patients with heart failure with preserved ejection fraction: the Aldo-DHF randomized controlled trial. *JAMA* 309, 781–791.
- Edelmann, F., Musial-Bright, L., Gelbrich, G., Trippel, T., Radenovic, S., Wachter, R., Inkrot, S., Loncar, G., Tahirovic, E., Celic, V., et al. (2016). Tolerability and Feasibility of Beta-Blocker Titration in HFpEF Versus HFrEF: Insights From the CIBIS-ELD Trial. *JACC Heart Fail* 4, 140–149.
- Eiros, R., Romero-González, G., Gavira, J.J., Beloqui, O., Colina, I., Fortún Landecho, M., López, B., González, A., Díez, J., and Ravassa, S. (2020). Does Chronic Kidney Disease Facilitate Malignant Myocardial Fibrosis in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction of Hypertensive Origin? *J Clin Med* 9.
- El Assar, M., Angulo, J., Vallejo, S., Peiró, C., Sánchez-Ferrer, C.F., and Rodríguez-Mañas, L. (2012). Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction. *Front Physiol* 3, 132.
- Elfering, S.L., Sarkela, T.M., and Giulivi, C. (2002). Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 277, 38079–38086.
- El-Refai, M., Peterson, E.L., Wells, K., Swadia, T., Sabbah, H.N., Spertus, J.A., Williams, L.K., and Lanfear, D.E. (2013). Comparison of Beta-Blocker Effectiveness in Heart Failure

REFERENCES

Patients With Preserved Ejection Fraction Versus Those With Reduced Ejection Fraction. *Journal of Cardiac Failure* 19, 73–79.

Emorine, L.J., Marullo, S., Briend-Sutren, M.M., Patey, G., Tate, K., Delavier-Klutcho, C., and Strosberg, A.D. (1989). Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science* 245, 1118–1121.

Esposito, G., Cappetta, D., Russo, R., Rivellino, A., Ciuffreda, L.P., Roviezzo, F., Piegari, E., Berrino, L., Rossi, F., De Angelis, A., et al. (2017). Sitagliptin reduces inflammation, fibrosis and preserves diastolic function in a rat model of heart failure with preserved ejection fraction. *Br J Pharmacol* 174, 4070–4086.

European Study Group on Diastolic Heart Failure (1998). How to diagnose diastolic heart failure. European Study Group on Diastolic Heart Failure. *Eur. Heart J.* 19, 990–1003.

Ferreira, S.H., Bartelt, D.C., and Greene, L.J. (1970). Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry* 9, 2583–2593.

Ferron, M., Cadiet, J., Persello, A., Prat, V., Denis, M., Erraud, A., Aillerie, V., Mevel, M., Bigot, E., Chatham, J.C., et al. (2019). O-GlcNAc stimulation: A new metabolic approach to treat septic shock. *Sci Rep* 9, 18751.

Fischer, V., Gabauer, I., Tillinger, A., Novakova, M., Pechan, I., Krizanova, O., Kvetnanský, R., and Myslivecek, J. (2008). Heart adrenoceptor gene expression and binding sites in the human failing heart. *Ann N Y Acad Sci* 1148, 400–408.

Fleming, I. (2010). Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 459, 793–806.

Fonarow, G.C., Stough, W.G., Abraham, W.T., Albert, N.M., Gheorghiade, M., Greenberg, B.H., O'Connor, C.M., Sun, J.L., Yancy, C.W., Young, J.B., et al. (2007). Characteristics, treatments, and outcomes of patients with preserved systolic function hospitalized for heart failure: a report from the OPTIMIZE-HF Registry. *J. Am. Coll. Cardiol.* 50, 768–777.

Francis, S.H., Busch, J.L., Corbin, J.D., and Sibley, D. (2010). cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol. Rev.* 62, 525–563.

Frank, O. (1895). Zur Dynamik des Herzmuskels. *Z Biol* 32, 370–447.

Franssen, C., Chen, S., Hamdani, N., and Paulus, W.J. (2016a). From comorbidities to heart failure with preserved ejection fraction: a story of oxidative stress. *Heart* 102, 320–330.

Franssen, C., Chen, S., Unger, A., Korkmaz, H.I., De Keulenaer, G.W., Tschöpe, C., Leite-Moreira, A.F., Musters, R., Niessen, H.W.M., Linke, W.A., et al. (2016b). Myocardial Microvascular Inflammatory Endothelial Activation in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *JACC Heart Fail* 4, 312–324.

Freed Benjamin H., Daruwalla Vistasp, Cheng Jeanette Y., Aguilar Frank G., Beussink Lauren, Choi Andrew, Klein David A., Dixon Debra, Baldrige Abigail, Rasmussen-Torvik Laura J., et al. (2016). Prognostic Utility and Clinical Significance of Cardiac Mechanics in

REFERENCES

- Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation: Cardiovascular Imaging* 9, e003754.
- Frielle, T., Collins, S., Daniel, K.W., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., and Kobilka, B.K. (1987). Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7920–7924.
- Fuat, A., Murphy, J.J., Hungin, A.P.S., Curry, J., Mehrzad, A.A., Hetherington, A., Johnston, J.I., Smellie, W.S.A., Duffy, V., and Cawley, P. (2006). The diagnostic accuracy and utility of a B-type natriuretic peptide test in a community population of patients with suspected heart failure. *Br J Gen Pract* 56, 327–333.
- Fung, J.W.H., Sanderson, J.E., Yip, G.W.K., Zhang, Q., and Yu, C.M. (2007). Impact of Atrial Fibrillation in Heart Failure With Normal Ejection Fraction: A Clinical and Echocardiographic Study. *Journal of Cardiac Failure* 13, 649–655.
- Furchgott, R.F., and Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373–376.
- Gaasch, W.H., and Zile, M.R. (2004). Left ventricular diastolic dysfunction and diastolic heart failure. *Annu. Rev. Med.* 55, 373–394.
- Gabet, A., Chatignoux, E., Billionnet, C., Maura, G., Giroud, M., Béjot, Y., and Olié, V. (2019). Annual rate of newly treated atrial fibrillation by age and gender in France, 2010–2016. *Eur J Epidemiol*.
- Galougahi, K.K., Liu, C.-C., Gentile, C., Kok, C., Nunez, A., Garcia, A., Fry, N.A.S., Davies, M.J., Hawkins, C.L., Rasmussen, H.H., et al. (2014). Glutathionylation mediates angiotensin II-induced eNOS uncoupling, amplifying NADPH oxidase-dependent endothelial dysfunction. *Journal of the American Heart Association* 3, e000731.
- Gauthier, C., Tavernier, G., Charpentier, F., Langin, D., and Le Marec, H. (1996). Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest* 98, 556–562.
- Gauthier, C., Leblais, V., Kobzik, L., Trochu, J.N., Khandoudi, N., Bril, A., Balligand, J.L., and Le Marec, H. (1998a). The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J. Clin. Invest.* 102, 1377–1384.
- Gauthier, C., Leblais, V., Kobzik, L., Trochu, J.N., Khandoudi, N., Bril, A., Balligand, J.L., and Le Marec, H. (1998b). The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest* 102, 1377–1384.
- Gauthier, C., Sèze-Goismier, C., and Rozec, B. (2007). Beta 3-adrenoceptors in the cardiovascular system. *Clin Hemorheol Microcirc* 37, 193–204.
- Gavras, H., Brunner, H.R., Laragh, J.H., Sealey, J.E., Gavras, I., and Vukovich, R.A. (1974). An angiotensin converting-enzyme inhibitor to identify and treat vasoconstrictor and volume factors in hypertensive patients. *N. Engl. J. Med.* 291, 817–821.

REFERENCES

- Geller, D.A., Lowenstein, C.J., Shapiro, R.A., Nussler, A.K., Di Silvio, M., Wang, S.C., Nakayama, D.K., Simmons, R.L., Snyder, S.H., and Billiar, T.R. (1993). Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 3491–3495.
- Gevaert, A.B., Shakeri, H., Leloup, A.J., Van Hove, C.E., De Meyer, G.R.Y., Vrints, C.J., Lemmens, K., and Van Craenenbroeck, E.M. (2017). Endothelial Senescence Contributes to Heart Failure With Preserved Ejection Fraction in an Aging Mouse Model. *Circ Heart Fail* *10*.
- Gevaert, A.B., Boen, J.R.A., Segers, V.F., and Van Craenenbroeck, E.M. (2019). Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Review of Cardiac and Noncardiac Pathophysiology. *Front Physiol* *10*.
- Gheorghiade, M., Zannad, F., Sopko, G., Klein, L., Piña, I.L., Konstam, M.A., Massie, B.M., Roland, E., Targum, S., Collins, S.P., et al. (2005). Acute heart failure syndromes: current state and framework for future research. *Circulation* *112*, 3958–3968.
- Gholami, M., Sharifi, F., Shahriari, S., Khoshnevisan, K., Larijani, B., and Amoli, M.M. (2019). Association of interleukin-6 polymorphisms with obesity: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine* *123*, 154769.
- Gladden, J.D., Linke, W.A., and Redfield, M.M. (2014). Heart failure with preserved ejection fraction. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* *466*, 1037–1053.
- Glezeva, N., Voon, V., Watson, C., Horgan, S., McDonald, K., Ledwidge, M., and Baugh, J. (2015). Exaggerated inflammation and monocytosis associate with diastolic dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction: evidence of M2 macrophage activation in disease pathogenesis. *J. Card. Fail.* *21*, 167–177.
- Goetz, R.M., Morano, I., Calovini, T., Studer, R., and Holtz, J. (1994). Increased expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase in rat aorta during pregnancy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *205*, 905–910.
- Gómez-Garre, D., González-Rubio, M.L., Muñoz-Pacheco, P., Caro-Vadillo, A., Aragoncillo, P., and Fernández-Cruz, A. (2010). Rosuvastatin added to standard heart failure therapy improves cardiac remodelling in heart failure rats with preserved ejection fraction. *Eur. J. Heart Fail.* *12*, 903–912.
- González-López, E., Gallego-Delgado, M., Guzzo-Merello, G., de Haro-del Moral, F.J., Cobo-Marcos, M., Robles, C., Bornstein, B., Salas, C., Lara-Pezzi, E., Alonso-Pulpon, L., et al. (2015). Wild-type transthyretin amyloidosis as a cause of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur Heart J* *36*, 2585–2594.
- Groban, L., Yamaleyeva, L.M., Westwood, B.M., Houle, T.T., Lin, M., Kitzman, D.W., and Chappell, M.C. (2008). Progressive diastolic dysfunction in the female mRen(2). Lewis rat: influence of salt and ovarian hormones. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* *63*, 3–11.
- Gross, S.S., Jaffe, E.A., Levi, R., and Kilbourn, R.G. (1991). Cytokine-activated endothelial cells express an isotype of nitric oxide synthase which is tetrahydrobiopterin-dependent,

REFERENCES

- calmodulin-independent and inhibited by arginine analogs with a rank-order of potency characteristic of activated macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 823–829.
- Guazzi, M., Gomberg-Maitland, M., and Arena, R. (2015). Pulmonary hypertension in heart failure with preserved ejection fraction. *J. Heart Lung Transplant.* 34, 273–281.
- Gupta, S., Matulevicius, S.A., Ayers, C.R., Berry, J.D., Patel, P.C., Markham, D.W., Levine, B.D., Chin, K.M., de Lemos, J.A., Peshock, R.M., et al. (2013). Left atrial structure and function and clinical outcomes in the general population. *Eur. Heart J.* 34, 278–285.
- Haass, M., Kitzman, D.W., Anand, I.S., Miller, A., Zile, M.R., Massie, B.M., and Carson, P.E. (2011). Body mass index and adverse cardiovascular outcomes in heart failure patients with preserved ejection fraction: results from the Irbesartan in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction (I-PRESERVE) trial. *Circ Heart Fail* 4, 324–331.
- Habibi, M., Chahal, H., Opdahl, A., Gjesdal, O., Helle-Valle, T.M., Heckbert, S.R., McClelland, R., Wu, C., Shea, S., Hundley, G., et al. (2014). Association of CMR-measured LA function with heart failure development: results from the MESA study. *JACC Cardiovasc Imaging* 7, 570–579.
- Hahn, V.S., Yanek, L.R., Vaishnav, J., Ying, W., Vaidya, D., Lee, Y.Z.J., Riley, S.J., Subramanya, V., Brown, E.E., Hopkins, C.D., et al. (2020). Endomyocardial Biopsy Characterization of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction and Prevalence of Cardiac Amyloidosis. *JACC: Heart Failure* 8, 712–724.
- Haines, C.D., Harvey, P.A., Luczak, E.D., Barthel, K.K.B., Konhilas, J.P., Watson, P.A., Stauffer, B.L., and Leinwand, L.A. (2012). Estrogenic compounds are not always cardioprotective and can be lethal in males with genetic heart disease. *Endocrinology* 153, 4470–4479.
- Hall, J.E., do Carmo, J.M., da Silva, A.A., Wang, Z., and Hall, M.E. (2015). Obesity-induced hypertension: interaction of neurohumoral and renal mechanisms. *Circ. Res.* 116, 991–1006.
- Hamdani, N., Bishu, K.G., von Frieling-Salewsky, M., Redfield, M.M., and Linke, W.A. (2013). Deranged myofilament phosphorylation and function in experimental heart failure with preserved ejection fraction. *Cardiovasc. Res.* 97, 464–471.
- Hamdani Nazha, Franssen Constantijn, Lourenço André, Falcão-Pires Inês, Fontoura Dulce, Leite Sara, Plettig Luisa, López Begoña, Ottenheijm Coen A., Becher Peter Moritz, et al. (2013a). Myocardial Titin Hypophosphorylation Importantly Contributes to Heart Failure With Preserved Ejection Fraction in a Rat Metabolic Risk Model. *Circulation: Heart Failure* 6, 1239–1249.
- Hamdani Nazha, Krysiak Judith, Kreusser Michael M., Neef Stefan, dos Remedios Cristobal G., Maier Lars S., Krüger Markus, Backs Johannes, and Linke Wolfgang A. (2013b). Crucial Role for Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase-II in Regulating Diastolic Stress of Normal and Failing Hearts via Titin Phosphorylation. *Circulation Research* 112, 664–674.
- Hammond, J., and Balligand, J.-L. (2012). Nitric oxide synthase and cyclic GMP signaling in cardiac myocytes: from contractility to remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52, 330–340.

REFERENCES

- Harvey, W. (1928). *Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus*. (Frankfurt: William Fitzer).
- Hawkins, N.M., Petrie, M.C., Jhund, P.S., Chalmers, G.W., Dunn, F.G., and McMurray, J.J.V. (2009). Heart failure and chronic obstructive pulmonary disease: diagnostic pitfalls and epidemiology. *Eur J Heart Fail* *11*, 130–139.
- van Heerebeek, L., Hamdani, N., Falcão-Pires, I., Leite-Moreira, A.F., Begieneman, M.P.V., Bronzwaer, J.G.F., van der Velden, J., Stienen, G.J.M., Laarman, G.J., Somsen, A., et al. (2012). Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation* *126*, 830–839.
- Heidenreich, P.A., Trogon, J.G., Khavjou, O.A., Butler, J., Dracup, K., Ezekowitz, M.D., Finkelstein, E.A., Hong, Y., Johnston, S.C., Khera, A., et al. (2011). Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circulation* *123*, 933–944.
- Hendry, P.B., Krisdinarti, L., and Erika, M. (2016). Scoring System Based on Electrocardiogram Features to Predict the Type of Heart Failure in Patients With Chronic Heart Failure. *Cardiol Res* *7*, 110–116.
- Henning, R.J. (2020). Diagnosis and treatment of heart failure with preserved left ventricular ejection fraction. *World J Cardiol* *12*, 7–25.
- Hernandez, A.F., Hammill, B.G., O'Connor, C.M., Schulman, K.A., Curtis, L.H., and Fonarow, G.C. (2009). Clinical effectiveness of beta-blockers in heart failure: findings from the OPTIMIZE-HF (Organized Program to Initiate Lifesaving Treatment in Hospitalized Patients with Heart Failure) Registry. *J. Am. Coll. Cardiol.* *53*, 184–192.
- Hicklin, H.E., Gilbert, O.N., Ye, F., Brooks, J.E., and Upadhyya, B. (2020). Hypertension as a Road to Treatment of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Curr. Hypertens. Rep.* *22*, 82.
- Hidalgo, C., Hudson, B., Bogomolovas, J., Zhu, Y., Anderson, B., Greaser, M., Labeit, S., and Granzier, H. (2009). PKC phosphorylation of titin's PEVK element-- a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res* *105*, 631–638.
- Hiemstra, J.A., Veteto, A.B., Lambert, M.D., Olver, T.D., Ferguson, B.S., McDonald, K.S., Emter, C.A., and Domeier, T.L. (2018). Chronic low-intensity exercise attenuates cardiomyocyte contractile dysfunction and impaired adrenergic responsiveness in aortic-banded mini-swine. *J Appl Physiol* (1985) *124*, 1034–1044.
- Hohendanner Felix, Ljubojević Senka, MacQuaide Niall, Sacherer Michael, Sedej Simon, Biesmans Liesbeth, Wakula Paulina, Platzer Dieter, Sokolow Sophie, Herchuelz André, et al. (2013). Intracellular Dyssynchrony of Diastolic Cytosolic [Ca²⁺] Decay in Ventricular Cardiomyocytes in Cardiac Remodeling and Human Heart Failure. *Circulation Research* *113*, 527–538.
- Hong, F., Brizendine, R.K., Carter, M.S., Alcalá, D.B., Brown, A.E., Chattin, A.M., Haldeman, B.D., Walsh, M.P., Facemyer, K.C., Baker, J.E., et al. (2015). Diffusion of

REFERENCES

myosin light chain kinase on actin: A mechanism to enhance myosin phosphorylation rates in smooth muscle. *J Gen Physiol* 146, 267–280.

Horgan, S., Watson, C., Glezeva, N., and Baugh, J. (2014). Murine Models of Diastolic Dysfunction and Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Journal of Cardiac Failure* 20, 984–995.

Hsia, C.C.W., Hyde, D.M., Ochs, M., Weibel, E.R., and ATS/ERS Joint Task Force on Quantitative Assessment of Lung Structure (2010). An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 181, 394–418.

Huang, W., Gelas, F.A., and Osborne-Pellegrin, M.J. (1998). Protection of the arterial internal elastic lamina by inhibition of the renin-angiotensin system in the rat. *Circulation Research* 82, 879–890.

Hundley, W.G., Kitzman, D.W., Morgan, T.M., Hamilton, C.A., Darty, S.N., Stewart, K.P., Herrington, D.M., Link, K.M., and Little, W.C. (2001). Cardiac cycle-dependent changes in aortic area and distensibility are reduced in older patients with isolated diastolic heart failure and correlate with exercise intolerance. *J Am Coll Cardiol* 38, 796–802.

Hung, M.J., Cherng, W.J., Kuo, L.T., and Wang, C.H. (2002). Effect of verapamil in elderly patients with left ventricular diastolic dysfunction as a cause of congestive heart failure. *Int. J. Clin. Pract.* 56, 57–62.

Hunt, S.A., Baker, D.W., Chin, M.H., Cinquegrani, M.P., Feldman, A.M., Francis, G.S., Ganiats, T.G., Goldstein, S., Gregoratos, G., Jessup, M.L., et al. (2001). ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult. *Journal of the American College of Cardiology* 38, 2101–2113.

Ide, T., Tsutsui, H., Hayashidani, S., Kang, D., Suematsu, N., Nakamura, K., Utsumi, H., Hamasaki, N., and Takeshita, A. (2001). Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ. Res.* 88, 529–535.

Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., and Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 9265–9269.

Ingwall, J.S. (2002). Is creatine kinase a target for AMP-activated protein kinase in the heart? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, 1111–1120.

Jackson, S.J., Andrews, N., Ball, D., Bellantuono, I., Gray, J., Hachoumi, L., Holmes, A., Latcham, J., Petrie, A., Potter, P., et al. (2017). Does age matter? The impact of rodent age on study outcomes. *Lab Anim* 51, 160–169.

Jaisson, S., and Gillery, P. (2018). Les produits de glycation avancée des protéines. *Revue Francophone des Laboratoires* 2018, 48–55.

REFERENCES

- Janczewski, A.M., and Lakatta, E.G. (2010). Modulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} cycling in systolic and diastolic heart failure associated with aging. *Heart Fail Rev* 15, 431–445.
- Jankowska, E.A., von Haehling, S., Anker, S.D., Macdougall, I.C., and Ponikowski, P. (2013). Iron deficiency and heart failure: diagnostic dilemmas and therapeutic perspectives. *Eur. Heart J.* 34, 816–829.
- Jazbutyte, V., Arias-Loza, P.A., Hu, K., Widder, J., Govindaraj, V., Von Poser-Klein, C., Bauersachs, J., Fritzemeier, K.-H., Hegele-Hartung, C., Neyses, L., et al. (2008). Ligand-dependent activation of $\text{ER}\beta$ lowers blood pressure and attenuates cardiac hypertrophy in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Cardiovascular Research* 77, 774–781.
- Johnson, B.D., Zheng, W., Korach, K.S., Scheuer, T., Catterall, W.A., and Rubanyi, G.M. (1997). Increased Expression of the Cardiac L-type Calcium Channel in Estrogen Receptor-deficient Mice. *J Gen Physiol* 110, 135–140.
- Junqueira, L.C.U., Bignolas, G., and Brentani, R.R. (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 11, 447–455.
- Kalogeropoulos, A.P., Fonarow, G.C., Georgiopoulou, V., Burkman, G., Siwamogsatham, S., Patel, A., Li, S., Papadimitriou, L., and Butler, J. (2016). Characteristics and Outcomes of Adult Outpatients With Heart Failure and Improved or Recovered Ejection Fraction. *JAMA Cardiol* 1, 510–518.
- Kam, K.W.L., Kravtsov, G.M., Liu, J., and Wong, T.M. (2005). Increased PKA activity and its influence on isoprenaline-stimulated L-type Ca^{2+} channels in the heart from ovariectomized rats. *Br. J. Pharmacol.* 144, 972–981.
- Kamimura, D., Ohtani, T., Sakata, Y., Mano, T., Takeda, Y., Tamaki, S., Omori, Y., Tsukamoto, Y., Furutani, K., Komiyama, Y., et al. (2012). Ca^{2+} entry mode of $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger as a new therapeutic target for heart failure with preserved ejection fraction. *Eur Heart J* 33, 1408–1416.
- Kanagala, P., Arnold, J.R., Singh, A., Chan, D.C.S., Cheng, A.S.H., Khan, J.N., Gulsin, G.S., Yang, J., Zhao, L., Gupta, P., et al. (2020). Characterizing heart failure with preserved and reduced ejection fraction: An imaging and plasma biomarker approach. *PLoS One* 15.
- Kapoor, J.R., Kapoor, R., Ju, C., Heidenreich, P.A., Eapen, Z.J., Hernandez, A.F., Butler, J., Yancy, C.W., and Fonarow, G.C. (2016). Precipitating Clinical Factors, Heart Failure Characterization, and Outcomes in Patients Hospitalized With Heart Failure With Reduced, Borderline, and Preserved Ejection Fraction. *JACC Heart Fail* 4, 464–472.
- Kasner, M., Aleksandrov, A.S., Westermann, D., Lassner, D., Gross, M., von Haehling, S., Anker, S.D., Schultheiss, H.-P., and Tschöpe, C. (2013). Functional iron deficiency and diastolic function in heart failure with preserved ejection fraction. *International Journal of Cardiology* 168, 4652–4657.

REFERENCES

- Kato, S., Saito, N., Kirigaya, H., Gytoku, D., Iinuma, N., Kusakawa, Y., Iguchi, K., Nakachi, T., Fukui, K., Futaki, M., et al. (2016). Impairment of Coronary Flow Reserve Evaluated by Phase Contrast Cine-Magnetic Resonance Imaging in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Heart Assoc* 5.
- Katz, A.M., and Katz, P.B. (1962). DISEASE OF THE HEART IN THE WORKS OF HIPPOCRATES. *Br Heart J* 24, 257–264.
- Kelder, J.C., Cramer, M.J., van Wijngaarden, J., van Tooren, R., Mosterd, A., Moons, K.G.M., Lammers, J.W., Cowie, M.R., Grobbee, D.E., and Hoes, A.W. (2011). The diagnostic value of physical examination and additional testing in primary care patients with suspected heart failure. *Circulation* 124, 2865–2873.
- Kessler, P., Bauersachs, J., Busse, R., and Schini-Kerth, V.B. (1997). Inhibition of inducible nitric oxide synthase restores endothelium-dependent relaxations in proinflammatory mediator-induced blood vessels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 1746–1755.
- Kim, S.K., Zhao, Z.S., Lee, Y.J., Lee, K.E., Kang, S.M., Choi, D., Lim, S.-K., Chung, N., Lee, H.C., and Cha, B.S. (2003). Left-ventricular diastolic dysfunction may be prevented by chronic treatment with PPAR- α or - γ agonists in a type 2 diabetic animal model. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 19, 487–493.
- Kisling, A., Lust, R.M., and Katwa, L.C. (2019). What is the role of peptide fragments of collagen I and IV in health and disease? *Life Sci* 228, 30–34.
- Klotz, S., Hay, I., Zhang, G., Maurer, M., Wang, J., and Burkhoff, D. (2006). Development of heart failure in chronic hypertensive Dahl rats: focus on heart failure with preserved ejection fraction. *Hypertension* 47, 901–911.
- Knowlton, A.A., and Lee, A.R. (2012). Estrogen and the cardiovascular system. *Pharmacol. Ther.* 135, 54–70.
- Kobusiak-Prokopowicz, M., Krzysztofik, J., Kaaz, K., Jolda-Mydlowska, B., and Mysiak, A. (2018). MMP-2 and TIMP-2 in Patients with Heart Failure and Chronic Kidney Disease. *Open Med (Wars)* 13, 237–246.
- Koch, S.E., Haworth, K.J., Robbins, N., Smith, M.A., Lather, N., Anjak, A., Jiang, M., Varma, P., Jones, W.K., and Rubinstein, J. (2013). Age- and gender-related changes in ventricular performance in wild-type FVB/N mice as evaluated by conventional and vector velocity echocardiography imaging: a retrospective study. *Ultrasound Med Biol* 39, 2034–2043.
- Kolijn, D., Pabel, S., Tian, Y., Lódi, M., Herwig, M., Carrizzo, A., Zhazykbayeva, S., Kovács, Á., Fülöp, G.Á., Falcão-Pires, I., et al. (2020). Empagliflozin improves endothelial and cardiomyocyte function in human heart failure with preserved ejection fraction via reduced pro-inflammatory-oxidative pathways and protein kinase G α oxidation. *Cardiovasc. Res.*
- Komajda, M., Isnard, R., Cohen-Solal, A., Metra, M., Pieske, B., Ponikowski, P., Voors, A.A., Dominjon, F., Henon-Goburdhun, C., Pannaux, M., et al. (2017). Effect of ivabradine

REFERENCES

- in patients with heart failure with preserved ejection fraction: the EDIFY randomized placebo-controlled trial. *Eur. J. Heart Fail.* *19*, 1495–1503.
- Kong, Y., Li, W., and Tian, Y. (2004). [Effect of beta3-adrenoreceptors agonist on beta3-adrenoreceptors expression and myocyte apoptosis in a rat model of heart failure]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* *16*, 142–147.
- Kornfeld, O.S., Hwang, S., Disatnik, M.-H., Chen, C.-H., Qvit, N., and Mochly-Rosen, D. (2015). Mitochondrial reactive oxygen species at The heart of The matter: New therapeutic approaches for cardiovascular diseases. *Circulation Research* *116*, 1783–1799.
- Koshizuka, R., Ishizu, T., Kameda, Y., Kawamura, R., Seo, Y., and Aonuma, K. (2013). Longitudinal Strain Impairment as a Marker of the Progression of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction in a Rat Model. *Journal of the American Society of Echocardiography* *26*, 316–323.
- Kotecha, D., Lam, C.S.P., Van Veldhuisen, D.J., Van Gelder, I.C., Voors, A.A., and Rienstra, M. (2016). Heart Failure With Preserved Ejection Fraction and Atrial Fibrillation: Vicious Twins. *Journal of the American College of Cardiology* *68*, 2217–2228.
- Kovács, S.J. (2015). Diastolic function in heart failure. *Clin Med Insights Cardiol* *9*, 49–55.
- Krüger, M., and Linke, W.A. (2009). Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *46*, 490–498.
- Krüger, M., Kötter, S., Grützner, A., Lang, P., Andresen, C., Redfield, M.M., Butt, E., dos Remedios, C.G., and Linke, W.A. (2009). Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ. Res.* *104*, 87–94.
- Krüger Martina, Kötter Sebastian, Grützner Anika, Lang Patrick, Andresen Christian, Redfield Margaret M., Butt Elke, dos Remedios Cris G., and Linke Wolfgang A. (2009). Protein Kinase G Modulates Human Myocardial Passive Stiffness by Phosphorylation of the Titin Springs. *Circulation Research* *104*, 87–94.
- Kulandavelu, S., and Hare, J.M. (2012). Alterations in β 3-Adrenergic Cardiac Innervation and Nitric Oxide Signaling in Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* *59*, 1988–1990.
- Kurmani, S., and Squire, I. (2017). Acute Heart Failure: Definition, Classification and Epidemiology. *Curr Heart Fail Rep* *14*, 385–392.
- Kushnir, A., and Marks, A.R. (2010). The ryanodine receptor in cardiac physiology and disease. *Adv Pharmacol* *59*, 1–30.
- Laina, A., Stellos, K., and Stamatelopoulos, K. (2018). Vascular ageing: Underlying mechanisms and clinical implications. *Exp. Gerontol.* *109*, 16–30.
- Lam, C.S.P., and Brutsaert, D.L. (2012). Endothelial dysfunction: a pathophysiologic factor in heart failure with preserved ejection fraction. *J. Am. Coll. Cardiol.* *60*, 1787–1789.
- Lam, C.S.P., Lyass, A., Kraigher-Krainer, E., Massaro, J.M., Lee, D.S., Ho, J.E., Levy, D., Redfield, M.M., Pieske, B.M., Benjamin, E.J., et al. (2011). Cardiac dysfunction and

REFERENCES

noncardiac dysfunction as precursors of heart failure with reduced and preserved ejection fraction in the community. *Circulation* 124, 24–30.

Lam Carolyn S.P., Roger Véronique L., Rodeheffer Richard J., Bursi Francesca, Borlaug Barry A., Ommen Steve R., Kass David A., and Redfield Margaret M. (2007). Cardiac Structure and Ventricular–Vascular Function in Persons With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction From Olmsted County, Minnesota. *Circulation* 115, 1982–1990.

Lamb, G. (2000). Excitation–Contraction Coupling In Skeletal Muscle: Comparisons With Cardiac Muscle. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 27, 216–224.

Landmesser, U., Dikalov, S., Price, S.R., McCann, L., Fukai, T., Holland, S.M., Mitch, W.E., and Harrison, D.G. (2003). Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J. Clin. Invest.* 111, 1201–1209.

Lauzier, B., Vaillant, F., Gélinas, R., Bouchard, B., Brownsey, R., Thorin, E., Tardif, J.-C., and Des Rosiers, C. (2011). Ivabradine reduces heart rate while preserving metabolic fluxes and energy status of healthy normoxic working hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300, H845–852.

Lee, D.S., Gona, P., Vasan, R.S., Larson, M.G., Benjamin, E.J., Wang, T.J., Tu, J.V., and Levy, D. (2009). Relation of disease pathogenesis and risk factors to heart failure with preserved or reduced ejection fraction: insights from the framingham heart study of the national heart, lung, and blood institute. *Circulation* 119, 3070–3077.

Leem (2017). Tout savoir sur le cycle du médicament.

Levy, D., Larson, M.G., Vasan, R.S., Kannel, W.B., and Ho, K.K. (1996). The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA* 275, 1557–1562.

LeWinter, M.M., and Granzier, H.L. (2013). Titin is a major human disease gene. *Circulation* 127, 938–944.

Li, S., and Gupte, A.A. (2017). The Role of Estrogen in Cardiac Metabolism and Diastolic Function. *Methodist Debaque Cardiovasc J* 13, 4–8.

Li, J., Jubair, S., and Janicki, J.S. (2015). Estrogen inhibits mast cell chymase release to prevent pressure overload-induced adverse cardiac remodeling. *Hypertension* 65, 328–334.

Liao, J.K., Zulueta, J.J., Yu, F.S., Peng, H.B., Cote, C.G., and Hassoun, P.M. (1995). Regulation of bovine endothelial constitutive nitric oxide synthase by oxygen. *J. Clin. Invest.* 96, 2661–2666.

Liedtke A J, DeMaison L, Eggleston A M, Cohen L M, and Nellis S H (1988). Changes in substrate metabolism and effects of excess fatty acids in reperfused myocardium. *Circulation Research* 62, 535–542.

Lim, S.L., Lam, C.S.P., Segers, V.F.M., Brutsaert, D.L., and De Keulenaer, G.W. (2015). Cardiac endothelium-myocyte interaction: clinical opportunities for new heart failure therapies regardless of ejection fraction. *European Heart Journal* 36, 2050–2060.

REFERENCES

- Linz, D., Hohl, M., Schütze, J., Mahfoud, F., Speer, T., Linz, B., Hübschle, T., Juretschke, H.-P., Dechend, R., Geisel, J., et al. (2015). Progression of kidney injury and cardiac remodeling in obese spontaneously hypertensive rats: the role of renal sympathetic innervation. *Am. J. Hypertens.* 28, 256–265.
- Littre, E. (1839). *Oeuvres complètes d’Hippocrate*.
- Litwin Sheldon E., Katz Sarah E., Weinberg Ellen O., Lorell Beverly H., Aurigemma Gerard P., and Douglas Pamela S. (1995). Serial Echocardiographic-Doppler Assessment of Left Ventricular Geometry and Function in Rats With Pressure-Overload Hypertrophy. *Circulation* 91, 2642–2654.
- Liu, V.W.T., and Huang, P.L. (2008). Cardiovascular roles of nitric oxide: A review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc Res* 77, 19–29.
- Liu, H., Pedram, A., and Kim, J.K. (2011). Oestrogen prevents cardiomyocyte apoptosis by suppressing p38 α -mediated activation of p53 and by down-regulating p53 inhibition on p38 β . *Cardiovasc Res* 89, 119–128.
- Lommi, J., Pulkki, K., Koskinen, P., Näveri, H., Leinonen, H., Härkönen, M., and Kupari, M. (1997). Haemodynamic, neuroendocrine and metabolic correlates of circulating cytokine concentrations in congestive heart failure. *Eur Heart J* 18, 1620–1625.
- Lourenço, A.P., Leite-Moreira, A.F., Balligand, J.-L., Bauersachs, J., Dawson, D., de Boer, R.A., de Windt, L.J., Falcão-Pires, I., Fontes-Carvalho, R., Franz, S., et al. (2018). An integrative translational approach to study heart failure with preserved ejection fraction: a position paper from the Working Group on Myocardial Function of the European Society of Cardiology. *Eur. J. Heart Fail.* 20, 216–227.
- Maaten, J.M. ter, Damman, K., Verhaar, M.C., Paulus, W.J., Duncker, D.J., Cheng, C., Heerebeek, L. van, Hillege, H.L., Lam, C.S.P., Navis, G., et al. (2016). Connecting heart failure with preserved ejection fraction and renal dysfunction: the role of endothelial dysfunction and inflammation. *European Journal of Heart Failure* 18, 588–598.
- Maisel, A., Mueller, C., Adams, K., Anker, S.D., Aspromonte, N., Cleland, J.G.F., Cohen-Solal, A., Dahlstrom, U., DeMaria, A., Di Somma, S., et al. (2008). State of the art: using natriuretic peptide levels in clinical practice. *Eur. J. Heart Fail.* 10, 824–839.
- Makino, N., Oyama, J., Maeda, T., Koyanagi, M., Higuchi, Y., and Tsuchida, K. (2015). Calorie restriction increases telomerase activity, enhances autophagy, and improves diastolic dysfunction in diabetic rat hearts. *Mol Cell Biochem* 403, 1–11.
- Malhotra, A., and Sanghi, V. (1997). Regulation of contractile proteins in diabetic heart. *Cardiovasc Res* 34, 34–40.
- Mant, J., Doust, J., Roalfe, A., Barton, P., Cowie, M.R., Glasziou, P., Mant, D., McManus, R.J., Holder, R., Deeks, J., et al. (2009). Systematic review and individual patient data meta-analysis of diagnosis of heart failure, with modelling of implications of different diagnostic strategies in primary care. *Health Technol Assess* 13, 1–207, iii.

REFERENCES

- Manzano-Fernández, S., Mueller, T., Pascual-Figal, D., Truong, Q.A., and Januzzi, J.L. (2011). Usefulness of Soluble Concentrations of Interleukin Family Member ST2 as Predictor of Mortality in Patients With Acutely Decompensated Heart Failure Relative to Left Ventricular Ejection Fraction. *The American Journal of Cardiology* 107, 259–267.
- Marx, S.O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosemblyt, N., and Marks, A.R. (2000). PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101, 365–376.
- Marzak, H., Ayme-Dietrich, E., Lawson, R., Mokni, W., Combe, R., Becker, J., Fertak, L.E., Champy, M.-F., and Monassier, L. (2014). Old spontaneously hypertensive rats gather together typical features of human chronic left-ventricular dysfunction with preserved ejection fraction. *Journal of Hypertension* 32, 1307–1316.
- Maslov, P.Z., Kim, J.K., Argulian, E., Ahmadi, A., Narula, N., Singh, M., Bax, J., and Narula, J. (2019). Is Cardiac Diastolic Dysfunction a Part of Post-Menopausal Syndrome? *JACC: Heart Failure* 7, 192–203.
- Massie, B.M., Nelson, J.J., Lukas, M.A., Greenberg, B., Fowler, M.B., Gilbert, E.M., Abraham, W.T., Lottes, S.R., Franciosa, J.A., and COHERE Participant Physicians (2007). Comparison of outcomes and usefulness of carvedilol across a spectrum of left ventricular ejection fractions in patients with heart failure in clinical practice. *Am. J. Cardiol.* 99, 1263–1268.
- 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.
- Matori, H., Umar, S., Nadadur, R.D., Sharma, S., Partow-Navid, R., Afkhami, M., Amjadi, M., and Eghbali, M. (2012). Genistein, a Soy Phytoestrogen, Reverses Severe Pulmonary Hypertension and Prevents Right Heart Failure in Rats. *Hypertension* 60, 425–430.
- Mattiello, J.A., Margulies, K.B., Jeevanandam, V., and Houser, S.R. (1998). Contribution of reverse-mode sodium-calcium exchange to contractions in failing human left ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* 37, 424–431.
- Mátyás, C., Németh, B.T., Oláh, A., Török, M., Ruppert, M., Kellermayer, D., Barta, B.A., Szabó, G., Kökény, G., Horváth, E.M., et al. (2017). Prevention of the development of heart failure with preserved ejection fraction by the phosphodiesterase-5A inhibitor vardenafil in rats with type 2 diabetes. *Eur. J. Heart Fail.* 19, 326–336.
- Mauvais-Jarvis, F., Arnold, A.P., and Reue, K. (2017). A guide for the design of pre-clinical studies on sex differences in metabolism. *Cell Metab* 25, 1216–1230.
- McKee, P.A., Castelli, W.P., McNamara, P.M., and Kannel, W.B. (1971). The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N. Engl. J. Med.* 285, 1441–1446.
- McKinley, and Michael (2014). Anatomie et physiologie : une approche intégrée.
- McMurray, J.J., and Pfeffer, M.A. (2005). Heart failure. *The Lancet* 365, 1877–1889.

REFERENCES

- McMurray, J.J.V., Adamopoulos, S., Anker, S.D., Auricchio, A., Böhm, M., Dickstein, K., Falk, V., Filippatos, G., Fonseca, C., Gomez-Sanchez, M.A., et al. (2012). ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur. Heart J.* 33, 1787–1847.
- van der Meer, R.W., Rijzewijk, L.J., Diamant, M., Hammer, S., Schär, M., Bax, J.J., Smit, J.W.A., Romijn, J.A., de Roos, A., and Lamb, H.J. (2008). The ageing male heart: myocardial triglyceride content as independent predictor of diastolic function. *Eur Heart J* 29, 1516–1522.
- Melduni, R.M., and Cullen, M.W. (2012). Role of Left Ventricular Diastolic Dysfunction in Predicting Atrial Fibrillation Recurrence after Successful Electrical Cardioversion. *J Atr Fibrillation* 5, 654.
- Melenovsky, V., Hwang, S.-J., Redfield, M.M., Zakeri, R., Lin, G., and Borlaug, B.A. (2015). Left atrial remodeling and function in advanced heart failure with preserved or reduced ejection fraction. *Circulation: Heart Failure* 8, 295–303.
- Mentz, R.J., Kelly, J.P., von Lueder, T.G., Voors, A.A., Lam, C.S.P., Cowie, M.R., Kjeldsen, K., Jankowska, E.A., Atar, D., Butler, J., et al. (2014). Noncardiac Comorbidities in Heart Failure With Reduced Versus Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol* 64, 2281–2293.
- Mercadier, J.J., Lompré, A.M., Duc, P., Boheler, K.R., Fraysse, J.B., Wisnewsky, C., Allen, P.D., Komajda, M., and Schwartz, K. (1990). Altered sarcoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *J Clin Invest* 85, 305–309.
- Merlet, N., Piriou, N., Rozec, B., Grabherr, A., Lauzier, B., Trochu, J.-N., and Gauthier, C. (2013a). Increased beta2-adrenoceptors in doxorubicin-induced cardiomyopathy in rat. *PLoS ONE* 8, e64711.
- Merlet, N., Piriou, N., Rozec, B., Grabherr, A., Lauzier, B., Trochu, J.-N., and Gauthier, C. (2013b). Increased beta2-adrenoceptors in doxorubicin-induced cardiomyopathy in rat. *PLoS ONE* 8, e64711.
- Merrill, M., Sweitzer, N.K., Lindenfeld, J., and Kao, D.P. (2019). Sex Differences in Outcomes and Responses to Spironolactone in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Secondary Analysis of TOPCAT Trial. *JACC Heart Fail* 7, 228–238.
- Metra, M., and Teerlink, J.R. (2017). Heart failure. *Lancet*.
- Meyer, M., and Dillmann, W.H. (1998). Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase overexpression by adenovirus mediated gene transfer and in transgenic mice. *Cardiovasc. Res.* 37, 360–366.
- Moens, A.L., Takimoto, E., Tocchetti, C.G., Chakir, K., Bedja, D., Cormaci, G., Ketner, E.A., Majmudar, M., Gabrielson, K., Halushka, M.K., et al. (2008). Reversal of cardiac

REFERENCES

hypertrophy and fibrosis from pressure overload by tetrahydrobiopterin: efficacy of recoupling nitric oxide synthase as a therapeutic strategy. *Circulation* 117, 2626–2636.

Moens, A.L., Yang, R., Watts, V.L., and Barouch, L.A. (2010). Beta 3-adrenoreceptor Regulation of Nitric Oxide in the Cardiovascular System. *J Mol Cell Cardiol* 48, 1088–1095.

Mohammed, S.F., Borlaug, B.A., Roger, V.L., Mirzoyev, S.A., Rodeheffer, R.J., Chirinos, J.A., and Redfield, M.M. (2012). Comorbidity and ventricular and vascular structure and function in heart failure with preserved ejection fraction: a community-based study. *Circ Heart Fail* 5, 710–719.

Mohammed, S.F., Mirzoyev, S.A., Edwards, W.D., Dogan, A., Grogan, D.R., Dunlay, S.M., Roger, V.L., Gertz, M.A., Dispenzieri, A., Zeldenrust, S.R., et al. (2014). Left ventricular amyloid deposition in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *JACC Heart Fail* 2, 113–122.

Mohammed, S.F., Hussain, S., Mirzoyev, S.A., Edwards, W.D., Maleszewski, J.J., and Redfield, M.M. (2015). Coronary microvascular rarefaction and myocardial fibrosis in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation* 131, 550–559.

Moniotte, S., Kobzik, L., Feron, O., Trochu, J.N., Gauthier, C., and Balligand, J.L. (2001). Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation* 103, 1649–1655.

Moore, S.A., and Januzzi, J.L. (2010). Found in Translation: Soluble ST2 and Heart Disease**Editorials published in the Journal of the American College of Cardiology reflect the views of the authors and do not necessarily represent the views of JACC or the American College of Cardiology. *Journal of the American College of Cardiology* 55, 251–253.

Mootha, V.K., Lindgren, C.M., Eriksson, K.-F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Laurila, E., et al. (2003). PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* 34, 267–273.

Morito, K., Hirose, T., Kinjo, J., Hirakawa, T., Okawa, M., Nohara, T., Ogawa, S., Inoue, S., Muramatsu, M., and Masamune, Y. (2001). Interaction of Phytoestrogens with Estrogen Receptors α and β . *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 24, 351–356.

Mozaffarian Dariush, Benjamin Emelia J., Go Alan S., Arnett Donna K., Blaha Michael J., Cushman Mary, Das Sandeep R., de Ferranti Sarah, Després Jean-Pierre, Fullerton Heather J., et al. (2016). Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update. *Circulation* 133, e38–e360.

Münzel, T., Daiber, A., Ullrich, V., and Mülsch, A. (2005). Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1551–1557.

Murase, T., Hattori, T., Ohtake, M., Abe, M., Amakusa, Y., Takatsu, M., Murohara, T., and Nagata, K. (2012). Cardiac remodeling and diastolic dysfunction in DahlS.Z-

REFERENCES

- Lepr(fa)/Lepr(fa) rats: a new animal model of metabolic syndrome. *Hypertens. Res.* 35, 186–193.
- Nakamura, M., and Sadoshima, J. (2018). Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nature Reviews Cardiology* 15, 387–407.
- Nascimben, L., Ingwall, J.S., Pauletto, P., Friedrich, J., Gwathmey, J.K., Saks, V., Pessina, A.C., and Allen, P.D. (1996). Creatine kinase system in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation* 94, 1894–1901.
- Neubauer, S. (2007). The failing heart--an engine out of fuel. *N. Engl. J. Med.* 356, 1140–1151.
- Nguyen, I.T.N., Brandt, M.M., van de Wouw, J., van Drie, R.W.A., Wesseling, M., Cramer, M.J., de Jager, S.C.A., Merkus, D., Duncker, D.J., Cheng, C., et al. (2020). Both male and female obese ZSF1 rats develop cardiac dysfunction in obesity-induced heart failure with preserved ejection fraction. *PLoS One* 15.
- Nguyen, T.D., Shingu, Y., Amorim, P.A., Schenkl, C., Schwarzer, M., and Doenst, T. (2018). GLP-1 Improves Diastolic Function and Survival in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *J Cardiovasc Transl Res* 11, 259–267.
- Nieminen, M.S., Böhm, M., Cowie, M.R., Drexler, H., Filippatos, G.S., Jondeau, G., Hasin, Y., Lopez-Sendon, J., Mebazaa, A., Metra, M., et al. (2005). Executive summary of the guidelines on the diagnosis and treatment of acute heart failureThe Task Force on Acute Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 26, 384–416.
- Niu, X., Watts, V.L., Cingolani, O.H., Sivakumaran, V., Leyton-Mange, J.S., Ellis, C.L., Miller, K.L., Vandegaer, K., Bedja, D., Gabrielson, K.L., et al. (2012). Cardioprotective Effect of Beta-3 Adrenergic Receptor Agonism: Role of Neuronal Nitric Oxide Synthase. *J Am Coll Cardiol* 59, 1979–1987.
- Obokata, M., Reddy, Y.N.V., Pislaru, S.V., Melenovsky, V., and Borlaug, B.A. (2017). Evidence Supporting the Existence of a Distinct Obese Phenotype of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation* 136, 6–19.
- Obokata, M., Reddy, Y.N.V., and Borlaug, B.A. (2020). Diastolic Dysfunction and Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Understanding Mechanisms by Using Noninvasive Methods. *JACC Cardiovasc Imaging* 13, 245–257.
- Ogata, T., Miyauchi, T., Sakai, S., Takanashi, M., Irukayama-Tomobe, Y., and Yamaguchi, I. (2004). Myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats is ameliorated by the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator fenofibrate, partly by suppressing inflammatory responses associated with the nuclear factor-kappa-B pathway. *J. Am. Coll. Cardiol.* 43, 1481–1488.
- Ogut, O., and Brozovich, F.V. (2003). Regulation of force in vascular smooth muscle. *J Mol Cell Cardiol* 35, 347–355.

REFERENCES

- Okonko, D.O., Mandal, A.K.J., Missouris, C.G., and Poole-Wilson, P.A. (2011). Disordered iron homeostasis in chronic heart failure: prevalence, predictors, and relation to anemia, exercise capacity, and survival. *J. Am. Coll. Cardiol.* 58, 1241–1251.
- Oktaý, A.A., Rich, J.D., and Shah, S.J. (2013). The emerging epidemic of heart failure with preserved ejection fraction. *Curr Heart Fail Rep* 10, 401–410.
- Omori, Y., Ohtani, T., Sakata, Y., Mano, T., Takeda, Y., Tamaki, S., Tsukamoto, Y., Kamimura, D., Aizawa, Y., Miwa, T., et al. (2012). L-Carnitine prevents the development of ventricular fibrosis and heart failure with preserved ejection fraction in hypertensive heart disease. *Journal of Hypertension* 30, 1834–1844.
- Oudejans, I., Mosterd, A., Bloemen, J.A., Valk, M.J., van Velzen, E., Wielders, J.P., Zuithoff, N.P., Rutten, F.H., and Hoes, A.W. (2011). Clinical evaluation of geriatric outpatients with suspected heart failure: value of symptoms, signs, and additional tests. *Eur. J. Heart Fail.* 13, 518–527.
- Pacher, P., Beckman, J.S., and Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 87, 315–424.
- Pagel, P.S., Kehl, F., Gare, M., Hettrick, D.A., Kersten, J.R., and Warltier, D.C. (2003). Mechanical Function of the Left Atrium New Insights Based on Analysis of Pressure–Volume Relations and Doppler Echocardiography. *Anesthesiology* 98, 975–994.
- Pandey, A., Patel, K.V., Vaduganathan, M., Sarma, S., Haykowsky, M.J., Berry, J.D., and Lavie, C.J. (2018). Physical Activity, Fitness, and Obesity in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol HF* 6, 975–982.
- Paneni, F., Diaz Cañestro, C., Libby, P., Lüscher, T.F., and Camici, G.G. (2017). The Aging Cardiovascular System: Understanding It at the Cellular and Clinical Levels. *Journal of the American College of Cardiology* 69, 1952–1967.
- Pascual-Figal, D.A., and Januzzi, J.L. (2015). The Biology of ST2: The International ST2 Consensus Panel. *The American Journal of Cardiology* 115, 3B–7B.
- Patisaul, H.B., and Jefferson, W. (2010). The pros and cons of phytoestrogens. *Front Neuroendocrinol* 31, 400–419.
- Paulus, W.J., and Tschöpe, C. (2013a). A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62, 263–271.
- Paulus, W.J., and Tschöpe, C. (2013b). A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62, 263–271.
- Paulus, W.J., and Tschöpe, C. (2013c). A Novel Paradigm for Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Journal of the American College of Cardiology* 62, 263–271.
- Paulus, W.J., Tschöpe, C., Sanderson, J.E., Rusconi, C., Flachskampf, F.A., Rademakers, F.E., Marino, P., Smiseth, O.A., De Keulenaer, G., Leite-Moreira, A.F., et al. (2007). How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure

REFERENCES

with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 28, 2539–2550.

Payne, R.M., Stone, H.L., and Engelken, E.J. (1971). Atrial function during volume loading. *Journal of Applied Physiology* 31, 326–331.

Pelzer, T., Neumann, M., de Jager, T., Jazbutyte, V., and Neyses, L. (2001). Estrogen Effects in the Myocardium: Inhibition of NF- κ B DNA Binding by Estrogen Receptor- α and - β . *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286, 1153–1157.

Perreault, C.L., Meuse, A.J., Bentivegna, L.A., and Morgan, J.P. (1990). Abnormal intracellular calcium handling in acute and chronic heart failure: role in systolic and diastolic dysfunction. *Eur Heart J* 11, 8–21.

Phan, T.T., Abozguia, K., Shivu, G.N., Mahadevan, G., Ahmed, I., Williams, L., Dwivedi, G., Patel, K., Steendijk, P., Ashrafian, H., et al. (2009). Heart Failure With Preserved Ejection Fraction Is Characterized by Dynamic Impairment of Active Relaxation and Contraction of the Left Ventricle on Exercise and Associated With Myocardial Energy Deficiency. *J Am Coll Cardiol* 54, 402–409.

Pieske, B., Tschöpe, C., de Boer, R.A., Fraser, A.G., Anker, S.D., Donal, E., Edelmann, F., Fu, M., Guazzi, M., Lam, C.S.P., et al. (2019). How to diagnose heart failure with preserved ejection fraction: the HFA-PEFF diagnostic algorithm: a consensus recommendation from the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 40, 3297–3317.

Pitt, B., Pfeffer, M.A., Assmann, S.F., Boineau, R., Anand, I.S., Claggett, B., Clausell, N., Desai, A.S., Diaz, R., Fleg, J.L., et al. (2014). Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction. *The New England Journal of Medicine* 370, 1383–1392.

Ponikowski, P., Anker, S.D., AlHabib, K.F., Cowie, M.R., Force, T.L., Hu, S., Jaarsma, T., Krum, H., Rastogi, V., Rohde, L.E., et al. (2014). Heart failure: preventing disease and death worldwide. *ESC Heart Fail* 1, 4–25.

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. (2016a). 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 spec. *European Journal of Heart Failure* 18, 891–975.

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. (2016b). 2016 ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 69, 1167.

Primessnig, U., Schönleitner, P., Höll, A., Pfeiffer, S., Bracic, T., Rau, T., Kapl, M., Stojakovic, T., Glasnov, T., Leineweber, K., et al. (2016). Novel pathomechanisms of cardiomyocyte dysfunction in a model of heart failure with preserved ejection fraction. *European Journal of Heart Failure* 18, 987–997.

REFERENCES

- Prioli, A., Marino, P., Lanzoni, L., and Zardini, P. (1998). Increasing degrees of left ventricular filling impairment modulate left atrial function in humans. *The American Journal of Cardiology* 82, 756–761.
- Qin, W., Du, N., Zhang, L., Wu, X., Hu, Y., Li, X., Shen, N., Li, Y., Yang, B., Xu, C., et al. (2015). Genistein alleviates pressure overload-induced cardiac dysfunction and interstitial fibrosis in mice. *Br J Pharmacol* 172, 5559–5572.
- Raij, L., Azar, S., and Keane, W. (1984). Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney International* 26, 137–143.
- Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., Sakthisekaran, D., Sethi, G., and Nishigaki, I. (2013). The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci* 9, 1057–1069.
- Rand, M.J., and Li, C.G. (1995). Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 659–682.
- Ravassa, S., Trippel, T., Bach, D., Bachran, D., González, A., López, B., Wachter, R., Hasenfuss, G., Delles, C., Dominiczak, A.F., et al. (2018). Biomarker-based phenotyping of myocardial fibrosis identifies patients with heart failure with preserved ejection fraction resistant to the beneficial effects of spironolactone: results from the Aldo-DHF trial. *Eur J Heart Fail* 20, 1290–1299.
- Ray, P., Lefort, Y., Achkar, R., and Riou, B. (2003). Intérêt du dosage du peptide natriurétique de type-B en médecine d’urgenceUsefulness of B-type natriuretic peptide in emergency medicine. *Réanimation* 12, 475–481.
- Reddy, Y.N.V., Andersen, M.J., Obokata, M., Koepp, K.E., Kane, G.C., Melenovsky, V., Olson, T.P., and Borlaug, B.A. (2017). Arterial Stiffening With Exercise in Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol* 70, 136–148.
- Reddy, Y.N.V., Carter, R.E., Obokata, M., Redfield, M.M., and Borlaug, B.A. (2018). A Simple, Evidence-Based Approach to Help Guide Diagnosis of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Circulation* 138, 861–870.
- Reddy Yogesh N.V., Obokata Masaru, Gersh Bernard J., and Borlaug Barry A. (2018). High Prevalence of Occult Heart Failure With Preserved Ejection Fraction Among Patients With Atrial Fibrillation and Dyspnea. *Circulation* 137, 534–535.
- Redfield, M.M. (2016). Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *New England Journal of Medicine* 375, 1868–1877.
- Redfield, M.M., Jacobsen, S.J., Burnett, J.C., Mahoney, D.W., Bailey, K.R., and Rodeheffer, R.J. (2003). Burden of Systolic and Diastolic Ventricular Dysfunction in the Community: Appreciating the Scope of the Heart Failure Epidemic. *JAMA* 289, 194–202.
- Redfield, M.M., Jacobsen, S.J., Borlaug, B.A., Rodeheffer, R.J., and Kass, D.A. (2005). Age- and gender-related ventricular-vascular stiffening: a community-based study. *Circulation* 112, 2254–2262.

REFERENCES

- Redfield, M.M., Anstrom, K.J., Levine, J.A., Koepp, G.A., Borlaug, B.A., Chen, H.H., LeWinter, M.M., Joseph, S.M., Shah, S.J., Semigran, M.J., et al. (2015). Isosorbide Mononitrate in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *N. Engl. J. Med.* 373, 2314–2324.
- Reed, A.L., Tanaka, A., Sorescu, D., Liu, H., Jeong, E.-M., Sturdy, M., Walp, E.R., Dudley, S.C., and Sutliff, R.L. (2011). Diastolic dysfunction is associated with cardiac fibrosis in the senescence-accelerated mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301, H824–H831.
- Regan, J.A., Mauro, A.G., Carbone, S., Marchetti, C., Gill, R., Mezzaroma, E., Valle Raleigh, J., Salloum, F.N., Van Tassell, B.W., Abbate, A., et al. (2015). A mouse model of heart failure with preserved ejection fraction due to chronic infusion of a low subpressor dose of angiotensin II. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 309, H771-778.
- Regitz-Zagrosek, V., Oertelt-Prigione, S., Seeland, U., and Hetzer, R. (2010). Sex and Gender Differences in Myocardial Hypertrophy and Heart Failure. *Circulation Journal* 74, 1265–1273.
- Reho, J.J., and Rahmouni, K. (2017). Oxidative and inflammatory signals in obesity-associated vascular abnormalities. *Clin. Sci.* 131, 1689–1700.
- Reil, J.-C., Hohl, M., Reil, G.-H., Granzier, H.L., Kratz, M.T., Kazakov, A., Fries, P., Müller, A., Lenski, M., Custodis, F., et al. (2013). Heart rate reduction by If-inhibition improves vascular stiffness and left ventricular systolic and diastolic function in a mouse model of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur. Heart J.* 34, 2839–2849.
- Richfield, D. (2014).
- Rienks, M., Papageorgiou, A.-P., Frangogiannis, N.G., and Heymans, S. (2014). Myocardial extracellular matrix: an ever-changing and diverse entity. *Circ Res* 114, 872–888.
- Rijzewijk, L.J., van der Meer, R.W., Smit, J.W.A., Diamant, M., Bax, J.J., Hammer, S., Romijn, J.A., de Roos, A., and Lamb, H.J. (2008). Myocardial steatosis is an independent predictor of diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 52, 1793–1799.
- Roberts, E., Ludman, A.J., Dworzynski, K., Al-Mohammad, A., Cowie, M.R., McMurray, J.J.V., Mant, J., and NICE Guideline Development Group for Acute Heart Failure (2015). The diagnostic accuracy of the natriuretic peptides in heart failure: systematic review and diagnostic meta-analysis in the acute care setting. *BMJ* 350, h910.
- Rodier, F., Coppé, J.-P., Patil, C.K., Hoeijmakers, W.A.M., Muñoz, D.P., Raza, S.R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A.R., and Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.* 11, 973–979.
- Rodrigues, B., Cam, M.C., and McNeill, J.H. (1998). Metabolic disturbances in diabetic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 180, 53–57.
- Roger, V.L. (2013). Epidemiology of Heart Failure. *Circ Res* 113, 646–659.

REFERENCES

- Ronco, C., Haapio, M., House, A.A., Anavekar, N., and Bellomo, R. (2008). Cardiorenal syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* 52, 1527–1539.
- Ropelle, E.R., Pauli, J.R., Cintra, D.E., da Silva, A.S., De Souza, C.T., Guadagnini, D., Carvalho, B.M., Caricilli, A.M., Katashima, C.K., Carvalho-Filho, M.A., et al. (2013). Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against aging, S-nitrosation, and insulin resistance in muscle of male mice. *Diabetes* 62, 466–470.
- Rosas, P.C., Liu, Y., Abdalla, M.I., Thomas, C.M., Kidwell, D.T., Dusio, G.F., Mukhopadhyay, D., Kumar, R., Baker, K.M., Mitchell, B.M., et al. (2015). Phosphorylation of cardiac Myosin-binding protein-C is a critical mediator of diastolic function. *Circ Heart Fail* 8, 582–594.
- Rosenkranz, S., Kramer, T., Gerhardt, F., Opitz, C., Olsson, K.M., and Hoeper, M.M. (2019). Pulmonary hypertension in HFpEF and HFrEF: Pathophysiology, diagnosis, treatment approaches. *Herz* 44, 483–490.
- Rossi, G. (1967). [Nomenclature and diagnostic criteria in cardiology set by the New York Heart Association. Considerations on the 6th edition]. *Cuore Circ* 51, 287–293.
- Roth Flach, R.J., Matevossian, A., Akie, T.E., Negrin, K.A., Paul, M.T., and Czech, M.P. (2013). β 3-Adrenergic Receptor Stimulation Induces E-Selectin-mediated Adipose Tissue Inflammation. *J Biol Chem* 288, 2882–2892.
- Roul, D., Rozec, B., André, G., Merlet, N., Tran Quang, T., Lauzier, B., Ferron, M., Blanloeil, Y., Loirand, G., Sauzeau, V., et al. (2015a). Increased β 2-adrenergic vasorelaxation at the early phase of endotoxemic shock in rats. *Vascul. Pharmacol.* 72, 181–189.
- Roul, D., Rozec, B., André, G., Merlet, N., Tran Quang, T., Lauzier, B., Ferron, M., Blanloeil, Y., Loirand, G., Sauzeau, V., et al. (2015b). Increased β 2-adrenergic vasorelaxation at the early phase of endotoxemic shock in rats. *Vascul. Pharmacol.* 72, 181–189.
- S, S.W., V, van E., N, D., Mt, M., R, H., Me, P., Hp, B.-L.R., and undefined (2015). Circulating biomarkers of distinct pathophysiological pathways in heart failure with preserved vs. reduced left ventricular ejection fraction. *Eur J Heart Fail* 17, 1006–1014.
- Saiki, H., Moulay, G., Guenzel, A.J., Liu, W., Decklever, T.D., Classic, K.L., Pham, L., Chen, H.H., Burnett, J.C., Russell, S.J., et al. (2017). Experimental cardiac radiation exposure induces ventricular diastolic dysfunction with preserved ejection fraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 313, H392–H407.
- Sala, V., Margaria, J.P., Murabito, A., Morello, F., Ghigo, A., and Hirsch, E. (2017). Therapeutic Targeting of PDEs and PI3K in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction (HFpEF). *Curr Heart Fail Rep* 14, 187–196.
- Salah, E.M., Bastacky, S.I., Jackson, E.K., and Tofovic, S.P. (2018). Captopril Attenuates Cardiovascular and Renal Disease in a Rat Model of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 71, 205–214.

REFERENCES

- Saldanha, A.J. (2004). Java Treeview—extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics* 20, 3246–3248.
- Salerno, J.C., Frey, C., McMillan, K., Williams, R.F., Masters, B.S., and Griffith, O.W. (1995). Characterization by electron paramagnetic resonance of the interactions of L-arginine and L-thiocitrulline with the heme cofactor region of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 270, 27423–27428.
- Santos, A.B.S., Kraigher-Krainer, E., Gupta, D.K., Claggett, B., Zile, M.R., Pieske, B., Voors, A.A., Lefkowitz, M., Bransford, T., Shi, V., et al. (2014). Impaired left atrial function in heart failure with preserved ejection fraction. *European Journal of Heart Failure* 16, 1096–1103.
- Sartori, M., Conti, F.F., Dias, D. da S., dos Santos, F., Machi, J.F., Palomino, Z., Casarini, D.E., Rodrigues, B., De Angelis, K., and Irigoyen, M.-C. (2017). Association between Diastolic Dysfunction with Inflammation and Oxidative Stress in Females ob/ob Mice. *Front Physiol* 8.
- Savarese, G., and Lund, L.H. (2017). Global Public Health Burden of Heart Failure. *Card Fail Rev* 3, 7–11.
- Savji, N., Meijers, W.C., Bartz, T.M., Bhambhani, V., Cushman, M., Naylor, M., Kizer, J.R., Sarma, A., Blaha, M.J., Gansevoort, R.T., et al. (2018). The Association of Obesity and Cardiometabolic Traits With Incident HFpEF and HFrEF. *JACC Heart Fail* 6, 701–709.
- Saxl, P., and Heiling, R. (1920). Über die diuretische Wirkung von Novasurol und anderen Quecksilberpreparaten. *Wein Klin Wchnschr* 33, 943.
- Scantlebury, D.C., and Borlaug, B.A. (2011). Why are women more likely than men to develop heart failure with preserved ejection fraction? *Current Opinion in Cardiology* 26, 562–568.
- Scatton, B. (2009). Le processus de découverte du médicament dans l'industrie pharmaceutique. *J. Soc. Biol.* 203, 249–269.
- Schauer, A., Draskowski, R., Jannasch, A., Kirchhoff, V., Goto, K., Männel, A., Barthel, P., Augstein, A., Winzer, E., Tugtekin, M., et al. (2020). ZSF1 rat as animal model for HFpEF: Development of reduced diastolic function and skeletal muscle dysfunction. *ESC Heart Fail.*
- Schiattarella, G.G., Altamirano, F., Tong, D., French, K.M., Villalobos, E., Kim, S.Y., Luo, X., Jiang, N., May, H.I., Wang, Z.V., et al. (2019). Nitrosative Stress Drives Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Nature* 568, 351–356.
- Schiattarella Gabriele G., Tong Dan, and Hill Joseph A. (2020). Can HFpEF and HFrEF Coexist? *Circulation* 141, 709–711.
- Schmederer, Z., Rolim, N., Bowen, T.S., Linke, A., Wisloff, U., and Adams, V. (2018). Endothelial function is disturbed in a hypertensive diabetic animal model of HFpEF: Moderate continuous vs. high intensity interval training. *International Journal of Cardiology.*
- Schmidt, U., del Monte, F., Miyamoto, M.I., Matsui, T., Gwathmey, J.K., Rosenzweig, A., and Hajjar, R.J. (2000). Restoration of diastolic function in senescent rat hearts through

REFERENCES

- adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. *Circulation* 101, 790–796.
- Schober, K.E., and Chetboul, V. (2015). Echocardiographic evaluation of left ventricular diastolic function in cats: Hemodynamic determinants and pattern recognition. *J Vet Cardiol* 17 Suppl 1, S102-133.
- Schulz, R., Smith, J.A., Lewis, M.J., and Moncada, S. (1991). Nitric oxide synthase in cultured endocardial cells of the pig. *Br. J. Pharmacol.* 104, 21–24.
- Schwarzl, M., Hamdani, N., Seiler, S., Alogna, A., Manninger, M., Reilly, S., Zirngast, B., Kirsch, A., Steendijk, P., Verderber, J., et al. (2015). A porcine model of hypertensive cardiomyopathy: implications for heart failure with preserved ejection fraction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 309, H1407-1418.
- Schwinger, R.H.G., Münch, G., Bölk, B., Karczewski, P., Krause, E.-G., and Erdmann, E. (1999). Reduced Ca²⁺-Sensitivity of SERCA 2a in Failing Human Myocardium due to Reduced Serin-16 Phospholamban Phosphorylation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 31, 479–491.
- Seferović, P.M., Polovina, M., Bauersachs, J., Arad, M., Gal, T.B., Lund, L.H., Felix, S.B., Arbustini, E., Caforio, A.L.P., Farmakis, D., et al. (2019). Heart failure in cardiomyopathies: a position paper from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur. J. Heart Fail.* 21, 553–576.
- Serrano, M., and Blasco, M.A. (2001). Putting the stress on senescence. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 748–753.
- Sessa, W.C., Pritchard, K., Seyedi, N., Wang, J., and Hintze, T.H. (1994). Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ. Res.* 74, 349–353.
- Setaro, J.F., Zaret, B.L., Schulman, D.S., Black, H.R., and Soufer, R. (1990). Usefulness of verapamil for congestive heart failure associated with abnormal left ventricular diastolic filling and normal left ventricular systolic performance. *Am. J. Cardiol.* 66, 981–986.
- Shah, A.M., and Pfeffer, M.A. (2012). The many faces of heart failure with preserved ejection fraction. *Nature Reviews Cardiology* 9, 555–556.
- Shah, A.M., Shah, S.J., Anand, I.S., Sweitzer, N.K., O'Meara, E., Heitner, J.F., Sopko, G., Li, G., Assmann, S.F., McKinlay, S.M., et al. (2014). Cardiac structure and function in heart failure with preserved ejection fraction: baseline findings from the echocardiographic study of the Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure with an Aldosterone Antagonist trial. *Circ Heart Fail* 7, 104–115.
- Shah, R.U., Klein, L., and Lloyd-Jones, D.M. (2009). Heart failure in women: epidemiology, biology and treatment. *Womens Health (Lond)* 5, 517–527.
- Shah, R.V., Desai, A.S., and Givertz, M.M. (2010). The Effect of Renin-Angiotensin System Inhibitors on Mortality and Heart Failure Hospitalization in Patients With Heart Failure and

REFERENCES

- Preserved Ejection Fraction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Cardiac Failure* 16, 260–267.
- Shah, S.J., Kitzman, D.W., Borlaug, B.A., van Heerebeek, L., Zile, M.R., Kass, D.A., and Paulus, W.J. (2016). PHENOTYPE-SPECIFIC TREATMENT OF HEART FAILURE WITH PRESERVED EJECTION FRACTION: A MULTIORGAN ROADMAP. *Circulation* 134, 73–90.
- Shah, S.J., Lam, C.S.P., Svedlund, S., Saraste, A., Hage, C., Tan, R.-S., Beussink-Nelson, L., Ljung Faxén, U., Fermer, M.L., Broberg, M.A., et al. (2018). Prevalence and correlates of coronary microvascular dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction: PROMIS-HFpEF. *Eur. Heart J.* 39, 3439–3450.
- Shand, D.G. (2010). Propranolol (Massachusetts Medical Society).
- Shibata, K., Yatera, Y., Furuno, Y., Sabanai, K., Morisada, N., Nakata, S., Morishita, T., Yamazaki, F., Tanimoto, A., Sasaguri, Y., et al. (2010). Spontaneous development of left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in mice lacking all nitric oxide synthases. *Circ J* 74, 2681–2692.
- Shirazi, L.F., Bissett, J., Romeo, F., and Mehta, J.L. (2017). Role of Inflammation in Heart Failure. *Curr Atheroscler Rep* 19, 27.
- Silberman, G.A., Fan, T.-H.M., Liu, H., Jiao, Z., Xiao, H.D., Lovelock, J.D., Boulden, B.M., Widder, J., Fredd, S., Bernstein, K.E., et al. (2010). Uncoupled cardiac nitric oxide synthase mediates diastolic dysfunction. *Circulation* 121, 519–528.
- Simon, J.N., Duglan, D., Casadei, B., and Carnicer, R. (2014). Nitric oxide synthase regulation of cardiac excitation–contraction coupling in health and disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 73, 80–91.
- Skeggs, L.T., Kahn, J.R., and Shumway, N.P. (1956). THE PREPARATION AND FUNCTION OF THE HYPERTENSIN-CONVERTING ENZYME. *J Exp Med* 103, 295–299.
- Slavic, S., Lauer, D., Sommerfeld, M., Kemnitz, U.R., Grzesiak, A., Trappiel, M., Thöne-Reineke, C., Baulmann, J., Paulis, L., Kappert, K., et al. (2013). Cannabinoid receptor 1 inhibition improves cardiac function and remodelling after myocardial infarction and in experimental metabolic syndrome. *J. Mol. Med.* 91, 811–823.
- Smith, D.H., Thorp, M.L., Gurwitz, J.H., McManus, D.D., Goldberg, R.J., Allen, L.A., Hsu, G., Sung, S.H., Magid, D.J., and Go, A.S. (2013). Chronic kidney disease and outcomes in heart failure with preserved versus reduced ejection fraction: the Cardiovascular Research Network PRESERVE Study. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 6, 333–342.
- Solomon, S.D., Zile, M., Pieske, B., Voors, A., Shah, A., Kraigher-Krainer, E., Shi, V., Bransford, T., Takeuchi, M., Gong, J., et al. (2012). The angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 in heart failure with preserved ejection fraction: a phase 2 double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 380, 1387–1395.

REFERENCES

- Solomon, S.D., Rizkala, A.R., Gong, J., Wang, W., Anand, I.S., Ge, J., Lam, C.S.P., Maggioni, A.P., Martinez, F., Packer, M., et al. (2017). Angiotensin Receptor Neprilysin Inhibition in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Rationale and Design of the PARAGON-HF Trial. *JACC Heart Fail* 5, 471–482.
- Srivaratharajah, K., Coutinho, T., deKemp, R., Liu, P., Haddad, H., Stadnick, E., Davies, R.A., Chih, S., Dwivedi, G., Guo, A., et al. (2016). Reduced Myocardial Flow in Heart Failure Patients With Preserved Ejection Fraction. *Circ Heart Fail* 9.
- Stanley, W.C., Recchia, F.A., and Lopaschuk, G.D. (2005). Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol. Rev.* 85, 1093–1129.
- Starling, E.H. (1918). The Linacre lecture on the law of the heart (Longmans, Green, & Company).
- Starling, E.H., and Visscher, M.B. (1927). The regulation of the energy output of the heart. *J. Physiol. (Lond.)* 62, 243–261.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 15545–15550.
- Sueta, D., Yamamoto, E., Nishihara, T., Tokitsu, T., Fujisue, K., Oike, F., Takae, M., Usuku, H., Takashio, S., Arima, Y., et al. (2019). H2FPEF Score as a Prognostic Value in HFpEF Patients. *Am J Hypertens* 32, 1082–1090.
- Suganya, N., Bhakkiyalakshmi, E., Sarada, D.V.L., and Ramkumar, K.M. (2016). Reversibility of endothelial dysfunction in diabetes: role of polyphenols. *British Journal of Nutrition* 116, 223–246.
- Sweitzer, N.K., Lopatin, M., Yancy, C.W., Mills, R.M., and Stevenson, L.W. (2008). Comparison of Clinical Features and Outcomes of Patients Hospitalized with Heart Failure and Normal Ejection Fraction ($\geq 55\%$) –vs- Those with Mildly Reduced (40–55%) and Moderately to Severely Reduced ($< 40\%$) Fractions. *Am J Cardiol* 101, 1151–1156.
- Takimoto, E. (2012). Cyclic GMP-Dependent Signaling in Cardiac Myocytes. *Circulation Journal* 76, 1819–1825.
- Tan, Y.T., Wenzelburger, F., Lee, E., Nightingale, P., Heatlie, G., Leyva, F., and Sanderson, J.E. (2010). Reduced left atrial function on exercise in patients with heart failure and normal ejection fraction. *Heart* 96, 1017–1023.
- Tchkonia, T., Zhu, Y., Deursen, J. van, Campisi, J., and Kirkland, J.L. (2013). Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 123, 966–972.
- Tessier, F.J. (2010). The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. *Pathologie Biologie* 58, 214–219.
- Thenappan, T., Prins, K.W., Cogswell, R., and Shah, S.J. (2015). Pulmonary hypertension secondary to heart failure with preserved ejection fraction. *Can J Cardiol* 31, 430–439.

REFERENCES

- Thomas, J.T., Kelly, R.F., Thomas, S.J., Stamos, T.D., Albasha, K., Parrillo, J.E., and Calvin, J.E. (2002). Utility of history, physical examination, electrocardiogram, and chest radiograph for differentiating normal from decreased systolic function in patients with heart failure. *The American Journal of Medicine* 112, 437–445.
- Thompson, D.R., Ski, C.F., Garside, J., and Astin, F. (2016). A review of health-related quality of life patient-reported outcome measures in cardiovascular nursing. *Eur J Cardiovasc Nurs* 15, 114–125.
- Tong Dan, Schiattarella Gabriele G., Jiang Nan, May Herman I., Lavandro Sergio, Gillette Thomas G., and Hill Joseph A. (2019). Female Sex Is Protective in a Preclinical Model of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation* 140, 1769–1771.
- Torre-Amione, G., Kapadia, S., Benedict, C., Oral, H., Young, J.B., and Mann, D.L. (1996). Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: A report from the studies of left ventricular dysfunction (SOLVD). *Journal of the American College of Cardiology* 27, 1201–1206.
- Trappanese, D.M., Liu, Y., McCormick, R.C., Cannavo, A., Nanayakkara, G., Baskharoun, M.M., Jarrett, H., Woitek, F.J., Tillson, D.M., Dillon, A.R., et al. (2015a). Chronic β 1-adrenergic blockade enhances myocardial β 3-adrenergic coupling with nitric oxide-cGMP signaling in a canine model of chronic volume overload: new insight into mechanisms of cardiac benefit with selective β 1-blocker therapy. *Basic Res Cardiol* 110, 456.
- Trappanese, D.M., Liu, Y., McCormick, R.C., Cannavo, A., Nanayakkara, G., Baskharoun, M.M., Jarrett, H., Woitek, F.J., Tillson, D.M., Dillon, A.R., et al. (2015b). Chronic β 1-adrenergic blockade enhances myocardial β 3-adrenergic coupling with nitric oxide-cGMP signaling in a canine model of chronic volume overload: new insight into mechanisms of cardiac benefit with selective β 1-blocker therapy. *Basic Res Cardiol* 110, 456.
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly-Y, M., Gidlöf, S., Oldfors, A., Wibom, R., et al. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429, 417–423.
- Trippel, T.D., Van Linthout, S., Westermann, D., Lindhorst, R., Sandek, A., Ernst, S., Bobenko, A., Kasner, M., Spillmann, F., González, A., et al. (2018). Investigating a biomarker-driven approach to target collagen turnover in diabetic heart failure with preserved ejection fraction patients. Effect of torasemide versus furosemide on serum C-terminal propeptide of procollagen type I (DROP-PIP trial). *Eur J Heart Fail* 20, 460–470.
- Tsuji, K., Sakata, Y., Nochioka, K., Miura, M., Yamauchi, T., Onose, T., Abe, R., Oikawa, T., Kasahara, S., Sato, M., et al. (2017). Characterization of heart failure patients with mid-range left ventricular ejection fraction-a report from the CHART-2 Study. *Eur. J. Heart Fail.* 19, 1258–1269.
- Tusher, V.G., Tibshirani, R., and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *PNAS* 98, 5116–5121.
- Vaduganathan, M., Patel, R.B., Michel, A., Shah, S.J., Senni, M., Gheorghiade, M., and Butler, J. (2017). Mode of Death in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Journal of the American College of Cardiology* 69, 556–569.

REFERENCES

- Vaillant, F., Lauzier, B., Poirier, I., Gélinas, R., Rivard, M.-E., Robillard Frayne, I., Thorin, E., and Des Rosiers, C. (2013). Mouse strain differences in metabolic fluxes and function of ex vivo working hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 306, H78–H87.
- Valero-Muñoz, M., Backman, W., and Sam, F. (2017). Murine Models of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: a “Fishing Expedition.” *JACC Basic Transl Sci* 2, 770–789.
- Vasan, R.S., Xanthakis, V., Lyass, A., Andersson, C., Tsao, C., Cheng, S., Aragam, J., Benjamin, E.J., and Larson, M.G. (2018). Epidemiology of Left Ventricular Systolic Dysfunction and Heart Failure in the Framingham Study: An Echocardiographic Study Over 3 Decades. *JACC Cardiovasc Imaging* 11, 1–11.
- Vijg, J., and Suh, Y. (2013). Genome Instability and Aging. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 645–668.
- Vos, T., Flaxman, A.D., Naghavi, M., Lozano, R., Michaud, C., Ezzati, M., Shibuya, K., Salomon, J.A., Abdalla, S., Aboyans, V., et al. (2012). Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380, 2163–2196.
- Wallner, M., Eaton, D.M., Berretta, R.M., Borghetti, G., Wu, J., Baker, S.T., Feldsott, E.A., Sharp, T.E., Mohsin, S., Oyama, M.A., et al. (2017). A Feline HFpEF Model with Pulmonary Hypertension and Compromised Pulmonary Function. *Sci Rep* 7.
- Wang, Y., Branicky, R., No  , A., and Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J. Cell Biol.* 217, 1915–1928.
- Watts, V.L., Sepulveda, F.M., Cingolani, O.H., Ho, A.S., Niu, X., Kim, R., Miller, K.L., Vandegaer, K., Bedja, D., Gabrielson, K.L., et al. (2013). Anti-hypertrophic and anti-oxidant effect of beta3-adrenergic stimulation in myocytes requires differential neuronal NOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 62, 8–17.
- Wei, C.-C., Wang, Z.-Q., Durra, D., Hemann, C., Hille, R., Garcin, E.D., Getzoff, E.D., and Stuehr, D.J. (2005). The three nitric-oxide synthases differ in their kinetics of tetrahydrobiopterin radical formation, heme-dioxy reduction, and arginine hydroxylation. *J. Biol. Chem.* 280, 8929–8935.
- Weinberg E O, Schoen F J, George D, Kagaya Y, Douglas P S, Litwin S E, Schunkert H, Benedict C R, and Lorell B H (1994). Angiotensin-converting enzyme inhibition prolongs survival and modifies the transition to heart failure in rats with pressure overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. *Circulation* 90, 1410–1422.
- Westberg, G., Shultz, P.J., and Raij, L. (1994). Exogenous nitric oxide prevents endotoxin-induced glomerular thrombosis in rats. *Kidney International* 46, 711–716.
- Westermann, D., Lindner, D., Kasner, M., Zietsch, C., Savvatis, K., Escher, F., von Schlippenbach, J., Skurk, C., Steendijk, P., Riad, A., et al. (2011). Cardiac inflammation contributes to changes in the extracellular matrix in patients with heart failure and normal ejection fraction. *Circ Heart Fail* 4, 44–52.

REFERENCES

- Wilkins, E., Wilson, L., Wickramasinghe, K., Bhatnagar, P., Leal, J., Luengo-Fernandez, R., Burns, R., Rayner, M., and Townsend, N. (2017). European Cardiovascular Disease Statistics 2017.
- Williams, B., Mancia, G., Spiering, W., Agabiti Rosei, E., Azizi, M., Burnier, M., Clement, D.L., Coca, A., de Simone, G., Dominiczak, A., et al. (2018). 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur. Heart J.* 39, 3021–3104.
- Woodcock, E.A., and Matkovich, S.J. (2005). Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1746–1751.
- Xiao, R.P. (2001). Beta-adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins. *Sci STKE* 2001, re15.
- Xiao, Y., Zhang, S., Tong, H., and Shi, S. (2018). Comprehensive evaluation of the role of soy and isoflavone supplementation in humans and animals over the past two decades. *Phytotherapy Research* 32, 384–394.
- Yamamoto, K., Origasa, H., Hori, M., and J-DHF Investigators (2013). Effects of carvedilol on heart failure with preserved ejection fraction: the Japanese Diastolic Heart Failure Study (J-DHF). *Eur. J. Heart Fail.* 15, 110–118.
- Yang, L.-K., and Tao, Y.-X. (2019). Physiology and pathophysiology of the β 3-adrenergic receptor. *Prog Mol Biol Transl Sci* 161, 91–112.
- Yao, N.A., Niazi, Z.R., Najmanová, I., Kamagaté, M., Said, A., Chabert, P., Auger, C., Die-Kakou, H., and Schini-Kerth, V. (2020). Preventive Beneficial Effect of an Aqueous Extract of *Phyllanthus amarus* Schum. and Thonn. (Euphorbiaceae) on DOCA-Salt-Induced Hypertension, Cardiac Hypertrophy and Dysfunction, and Endothelial Dysfunction in Rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 75, 573–583.
- Yim, J., Cho, H., and Rabkin, S.W. (2018). Gene expression and gene associations during the development of heart failure with preserved ejection fraction in the Dahl salt sensitive model of hypertension. *Clinical and Experimental Hypertension* 40, 155–166.
- Yusuf, S., Pfeffer, M.A., Swedberg, K., Granger, C.B., Held, P., McMurray, J.J.V., Michelson, E.L., Olofsson, B., Ostergren, J., and CHARM Investigators and Committees (2003). Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial. *Lancet* 362, 777–781.
- Zaccolo, M., and Movsesian, M.A. (2007). cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circ. Res.* 100, 1569–1578.
- Zaglia, T., and Mongillo, M. (2017). Cardiac sympathetic innervation, from a different point of (re)view. *The Journal of Physiology* 595, 3919–3930.
- Zakeri, R., Moulay, G., Chai, Q., Ogut, O., Hussain, S., Takahama, H., Lu, T., Wang, X.-L., Linke, W.A., Lee, H.-C., et al. (2016). Left Atrial Remodeling and Atrioventricular Coupling in a Canine Model of Early Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circ Heart Fail* 9.

REFERENCES

- Zakeri Rosita, Chamberlain Alanna M., Roger Véronique L., and Redfield Margaret M. (2013). Temporal Relationship and Prognostic Significance of Atrial Fibrillation in Heart Failure Patients With Preserved Ejection Fraction. *Circulation* 128, 1085–1093.
- Zakeri Rosita, Borlaug Barry A., McNulty Steven E., Mohammed Selma F., Lewis Gregory D., Semigran Marc J., Deswal Anita, LeWinter Martin, Hernandez Adrian F., Braunwald Eugene, et al. (2014). Impact of Atrial Fibrillation on Exercise Capacity in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation: Heart Failure* 7, 123–130.
- Zaphiriou, A., Robb, S., Murray-Thomas, T., Mendez, G., Fox, K., McDonagh, T., Hardman, S.M.C., Dargie, H.J., and Cowie, M.R. (2005). The diagnostic accuracy of plasma BNP and NTproBNP in patients referred from primary care with suspected heart failure: results of the UK natriuretic peptide study. *Eur. J. Heart Fail.* 7, 537–541.
- Zhang, M., Perino, A., Ghigo, A., Hirsch, E., and Shah, A.M. (2012). NADPH Oxidases in Heart Failure: Poachers or Gamekeepers? *Antioxidants & Redox Signaling* 18, 1024–1041.
- Zhang, N., Feng, B., Ma, X., Sun, K., Xu, G., and Zhou, Y. (2019). Dapagliflozin improves left ventricular remodeling and aorta sympathetic tone in a pig model of heart failure with preserved ejection fraction. *Cardiovasc Diabetol* 18, 107.
- Zhang, W., Qu, X., Chen, B., Snyder, M., Wang, M., Li, B., Tang, Y., Chen, H., Zhu, W., Zhan, L., et al. (2016). Critical Roles of STAT3 in β -Adrenergic Functions in the Heart. *Circulation* 133, 48–61.
- Zhao, Z., Wang, H., Lin, M., and Groban, L. (2015). GPR30 decreases cardiac chymase/angiotensin II by inhibiting local mast cell number. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 459, 131–136.
- Zhazykbayeva, S., Pabel, S., Mügge, A., Sossalla, S., and Hamdani, N. (2020). The molecular mechanisms associated with the physiological responses to inflammation and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Biophysical Reviews* 12, 947–968.
- Zhou, P., and Pu, W.T. (2016). Recounting cardiac cellular composition. *Circ Res* 118, 368–370.
- Zile, M.R., Baicu, C.F., Ikonomidis, J., Stroud, R.E., Nietert, P.J., Bradshaw, A.D., Slater, R., Palmer, B.M., Van Buren, P., Meyer, M., et al. (2015). Myocardial Stiffness in Patients with Heart Failure and a Preserved Ejection Fraction: Contributions of Collagen and Titin. *Circulation* 131, 1247–1259.
- Zile Michael R., Gaasch William H., Carroll John D., Feldman Marc D., Aurigemma Gerard P., Schaer Gary L., Ghali Jalal K., and Liebson Philip R. (2001). Heart Failure With a Normal Ejection Fraction. *Circulation* 104, 779–782.
- Zile Michael R., Gottdiener John S., Hetzel Scott J., McMurray John J., Komajda Michel, McKelvie Robert, Baicu Catalin F., Massie Barry M., and Carson Peter E. (2011). Prevalence and Significance of Alterations in Cardiac Structure and Function in Patients With Heart Failure and a Preserved Ejection Fraction. *Circulation* 124, 2491–2501.

REFERENCES

- (2007). How isoflavone levels in common rodent diets can interfere with the value of animal models and with experimental results. *Lab Anim* 41, 1–18.
- (2015). Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 385, 117–171.

ANNEXES

1. Annexes 1 : Données complémentaires de l'article 1

Over-expression of endothelial β_3 – adrenergic receptor induces diastolic dysfunction in rats

Justine Dhot^{1*}, Marine Ferron^{1*}, Valentine Prat^{1*}, Antoine Persello¹, David Roul¹, David Stévant¹, Damien Guijarro¹, Nicolas Piriou¹, Virginie Aillerie¹, Angélique Erraud¹, Gilles Toumaniantz¹, Morteza Erfanian¹, Angela Tesse¹, Amandine Grabherr¹, Laurent Tesson^{2, 3}, Séverine Menoret^{2, 3, 4}, Ignacio Anegon^{2, 3}, Jean-Noël Trochu¹, Marja Steenman¹, Michel De Waard^{1,5}, Bertrand Rozec¹, Benjamin Lauzier^{1*}, Chantal Gauthier^{1*}.

¹l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, Nantes, France

²Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR1064, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France

³Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), CHU Nantes, Nantes, France

⁴CNRS, SFR de Nantes, Nantes, France

⁵LabEx “Ion Channels, Science & Therapeutics”, Nice, France.

*: These authors contributed equally to this work.

Address for correspondence: Benjamin Lauzier, Université de Nantes, l'institut du thorax, Inserm UMR 1087 / CNRS UMR 6291, IRS –UN, 8 quai Moncousu, BP 70721, 44007 Nantes Cedex 1 France

Tel: +33 2 28 08 01 57 – benjamin.lauzier@univ-nantes.fr

1. Materials and methods

1.1. Animal model

The transgenic rat model overexpressing h β_3 -AR in endothelial cells was generated by microinjection of a linearized plasmid consisting of the h β_3 -AR cDNA under the control of the endothelial cell-specific intercellular adhesion molecule-2 (ICAM-2) promoter into Sprague-Dawley zygotes. As previously described in detail for another transgene, the ICAM-2 promoter drives endothelial-specific expression (Charreau et al., 1999).

1.2. Echocardiography

Echocardiography was performed on anesthetized rats (1.5% isoflurane in 2% O₂ with delivery rate of 1 L/min) at 15, 30 and 45 weeks of age, using a Vingmed-General Electric ultrasound system (VIVID 7, Horten, Norway) equipped with a 10 MHz imaging probe and off-line cine loop analysis software (Echopac TVI, GE-Vingmed Ultrasound) on the Nantes city Therassay platform, as previously described (Merlet et al., 2013b).

1.3. Pressure measurements

Arterial and left ventricular end diastolic pressure (LVEDP) were recorded on anesthetized rat (3% isoflurane and 2% O₂ with delivery rate of 1 L/min) using a pressure probe SPR 838 size 2F (Millar Instruments Inc., Houston, Texas) with IOX1.5.7 software (EMKA Technologies, Paris, France), as previously described (Slavic et al., 2013).

1.4. Vascular reactivity

Isolated aortas were placed in physiological Krebs solution, gassed with 95% O₂-5% CO₂ (pH 7.4) and maintained at 37.5°C. Aorta were contracted with phenylephrine and relaxation in response was studied using isoproterenol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA).

1.5. Working heart studies

Isolated working hearts were perfused as previously described (Lauzier et al., 2011). To mimic stress, either systolic function was challenged by increasing afterload from 60 to 140 mm Hg, by 10 mm Hg steps or diastolic function was challenged by increasing preload from 5 to 25 mm Hg, by 5 mm Hg steps.

1.6. Tissue collection

Heart apexes were embedded in OCT (optimal cutting temperature) compound (Tissue-Tek, Sakura) to enable histological analyses. The left ventricle (LV), right ventricle (RV) and septum of heart bases were dissected and frozen. Aortas were gently removed, separated into 4-mm rings, and the endothelium was removed. Rings were then snap-frozen. Kidneys were harvested and fixed in 10% formalin. The right lung was harvested and fixed by infusion of formalin through the bronchi, prior to immersion in formalin solution.

1.7. Cardiomyocyte isolation

Cardiomyocytes were isolated as previously described (Lauzier et al., 2011). Briefly, hearts were excised, mounted on a Langerdorff perfusion apparatus and perfused with an oxygenated Tyrode solution containing collagenase to perform the heart digestion. Hearts were dissected by gentle manual agitation and cardiomyocytes were filtered and placed in Tyrode solution.

1.8. RT-qPCR

Total RNA was extracted from LV powder and isolated cells for RT-PCR as previously described (Roul et al., 2015b). The expression of h β_3 -AR transcripts was detected using primers targeting the human sequence (*Supplemental Table S1*). In heart extracts, rat β_1 -AR, β_2 -AR, β_3 -AR and Hprt1, and human β_3 -AR transcripts were quantified by RT-qPCR using Taqman technology (references of Taqman primers: Rn00824536_s1, Rn00560650_s1, Hs00609046_m1, Rn00565393_m1, Rn01527840_m1, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA). Gene expression of nNOS (Nos1), iNOS (Nos2) and eNOS (Nos3) were analyzed with normalization by a geometric average of H2afz

and *Sdha* genes, which were deemed the most stable by geNorm (Sequences in *Supplemental Table S1*).

1.9. Western blots

Western blotting experiments were performed using LV tissue as previously described (Merlet et al., 2013b). Briefly, protein extraction was performed in the presence of phosphatase inhibitors (PhosSTOP, Roche, Bâle, France) in T-PER buffer, and migration was performed in 4-15% polyacrylamide stainfree gels (#4568084, BioRad, Hercules, USA). We used different primary antibodies for Western blotting (antibodies described in *Supplemental Table S2*).

1.10. Electronic paramagnetic resonance (EPR)

Dissected aortas were incubated 45 min at 37°C in a Krebs-HEPES colloid solution containing Fe^{2+} diethyldithio-carbamate (DETC, Sigma-Aldrich) as spin trap for $\cdot\text{NO}$ detection and in a Krebs-HEPES solution containing 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine, (CMH, Noxygen, Germany), deferoxamin (Sigma-Aldrich, France) and DETC (Sigma-Aldrich) as spin probe for $\text{O}_2^{\cdot-}$ detection. Then, each sample was frozen in liquid nitrogen and analyzed in a Dewar flask at 77°K by EPR Miniscope MS5000 (Friebert Instruments, Germany). The instrument settings were microwave power of 10 mW, amplitude modulation of 1 mT ($\cdot\text{NO}$) and 0.400 mT ($\text{O}_2^{\cdot-}$), modulation frequency of 100 kHz, sweep time of 150 s and 3 scans ($\cdot\text{NO}$) or 60 s and 3 scans ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Signals were quantified by measuring the total amplitude of the peaks of the spectra obtained, expressed in arbitrary units (A.U.) and corrected for the dry weight of the sample (Agouni et al., 2009).

1.11. Transcriptome analysis

RNA from LV from a total of 9 animals (4 WT and 5 $\text{Tg}\beta_3$) was hybridized to Agilent Rat Gene Expression Microarrays. Two technical replicates were added to both the WT and the $\text{Tg}\beta_3$ group. Fluorescence values corresponding to raw expression data were extracted using Feature Extraction Software (Agilent). Positive and negative control probes were removed. Non-linear effects such as background or saturation were corrected by Lowess. Values of replicate probes were averaged and the data matrix was filtered to 20,000 probes based on highest median expression values. Microarray data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Series Accession Number GSE149297. Two-class Significant Analysis of Microarrays (SAM) (Tusher et al., 2001) was used to identify genes with statistically significant differential expression between sample groups. Hierarchical clustering was performed using Gene Cluster 3.0 and heatmaps were displayed using Java Treeview (Saldanha, 2004). Data were analyzed using the Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) method (Mootha et al., 2003; Subramanian et al., 2005). GSEA is a computational method that determines whether an a priori defined set of genes shows statistically significant, concordant differences between two phenotypes. In GSEA, genes are ranked by their correlation with phenotype and every enrichment gene set will get an enrichment score. Permutation was set to 'geneset'. Gene sets were considered significantly enriched when $\text{FDR} < 0.25$.

1.12. Statistical analyses

Data are expressed as mean $\pm$ SEM. For the comparisons involving two groups of animals with $n < 10$, group significance was defined using a Mann-Whitney test. For groups of 10 or more animals, a Student *t*-test was applied. In *ex vivo* studies, differences between repeated measurements were evaluated using a two-way ANOVA followed by the Bonferroni selected-comparison test. $P < 0.05$ was considered significant.

1.13. Ovariectomy

At the age of 8 weeks, female rats underwent an ovariectomy or a sham surgery. Briefly, the animals were anesthetized through inhaled anesthesia with isoflurane (isoflurane 2%, 1 L/min Vetflurane®, Virbac, Carros, France). Analgesia was insured by a subcutaneous injection of buprenorphine (Buprecare®, 0.02 mg/kg, Animalcare, York, United Kingdom) and meloxicam (Metacam®, 1 mg/kg, Boehringer Ingelheim, Ingelheim-Am-Rhein, Germany) during the surgery. Animal lied on

sternal decubitus, and skin was incised on 1 cm, about 1 cm caudally to the rib cage. Subcutaneous tissue and abdominal muscles were gently dissected. Ovary was then exteriorized, uterine and ovarian vessels were ligatured with Vicryl 4.0 (Johnson & Johnson, New Brunswick, USA) and removed. Abdominal muscle layer, subcutaneous and skin were sewn, before repeating the same procedure on the other side. During the three days after procedure, animals received subcutaneous injection of buprenorphine twice a day, and injection of meloxicam once per day to avoid post-operative pain. All the animals were housed according to standard living conditions and were fed with a specific diet to avoid estrogen-like effects of phytoestrogen present in standard diet (Envigo, #2014, Huntingdon, United Kingdom).

1.14. Small pulmonary artery remodeling

Fixed lungs were embedded in paraffin, sectioned at 7 μm and stained with elastin-orcein stain, allowing the visualization of elastic fiber of small pulmonary arteries. Remodeling of small pulmonary arteries was blindly assessed on 20 arterioles of 60 μm diameter per rat at 600X (Nikon eclipse 600 with Nikon DS-Ri1), as previously described (Hsia et al., 2010). Percentage of the media area was determined as following: $\% \text{ media area} = 1 - (\text{lumen area})/(\text{total area})$ (*Figure S3A*).

1.15. Glomerular score

Fixed kidneys were embedded in paraffin and sectioned at 7 μm . Sections, stained with the Periodic Acid Schiff (PAS) technique (Sigma-Aldrich, #395-2016), were used to evaluate the pathological changes in renal structure. Glomerulosclerosis scoring was performed according to Raij and collaborators (Raij et al., 1984). Briefly, blinding acquisition and analysis of sclerosis and damages of 20 glomeruli per animal are performed at 200X (Nikon eclipse 600 with Nikon DS-Ri1) and according to semi-quantitative score from 0 (healthy glomeruli) to 4 (full damaged glomeruli) (*Figure S3B*). The extent of the injury for each individual tissue specimen was then evaluated by histological examination.

1.16. Fibrosis

Fibrosis quantification was performed as previously described (Junqueira et al., 1979). Forty and 20 images of the LV and septum respectively were taken at 200X magnification per animal and analyzed by a blinded manipulator. The percent area of type I and type III collagen fibers were determined for each animal, obtained by the addition of these scores (Westberg et al., 1994).

1.17. Treadmill tolerance test

Treadmill tolerance test was performed on a small group of animals. Treadmill parameter was: Slope of 5°; speed increase of 3 cm/s every 3 minutes.

1.18. Lung weight

Lungs were weighed during sampling then dried at 60°C and weighed.

1.19. Quantitative determination of rat IL-6; TNF- α and IL-1 β on plasma.

Quantikine® ELISA kit from R&D systems were used on plasma to determined rat IL-1 β concentration (N° RLB00, R&D systems - biotechne), IL-6 concentration (N° R6000B, R&D systems - biotechne) and TNF- α (N° RTA00, R&D systems - biotechne).

1.20. Vascular density.

Fixed aortas were embedded in paraffin, sectioned at 7 μm and stained with CD31 antibodies.

2. References

1. Charreau B, Ménoret S, Tesson L, Azimzadeh A, Audet M, Wolf P, et al. Protection against hyperacute xenograft rejection of transgenic rat hearts expressing human decay accelerating factor (DAF) transplanted into primates. *Mol Med Camb Mass*. sept 1999;5(9):617-30.
2. Merlet N, Piriou N, Rozec B, Grabherr A, Lauzier B, Trochu J-N, et al. Increased beta2-adrenoceptors in doxorubicin-induced cardiomyopathy in rat. *PloS One*. 2013;8(5):e64711.
3. Slavic S, Lauer D, Sommerfeld M, Kemnitz UR, Grzesiak A, Trappiel M, et al. Cannabinoid receptor 1 inhibition improves cardiac function and remodelling after myocardial infarction and in experimental metabolic syndrome. *J Mol Med Berl Ger*. juill 2013;91(7):811-23.
4. Lauzier B, Vaillant F, Gélinas R, Bouchard B, Brownsey R, Thorin E, et al. Ivabradine reduces heart rate while preserving metabolic fluxes and energy status of healthy normoxic working hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. mars 2011;300(3):H845-852.
5. Roul D, Rozec B, André G, Merlet N, Tran Quang T, Lauzier B, et al. Increased β 2-adrenergic vasorelaxation at the early phase of endotoxemic shock in rats. *Vascul Pharmacol*. sept 2015;72:181-9.
6. Agouni A, Lagrue-Lak-Hal A-H, Mostefai HA, Tesse A, Mulder P, Rouet P, et al. Red Wine Polyphenols Prevent Metabolic and Cardiovascular Alterations Associated with Obesity in Zucker Fatty Rats (Fa/Fa). *PLoS ONE* [Internet]. 18 mai 2009 [cité 7 nov 2019];4(5). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2679212/>
7. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci*. 24 avr 2001;98(9):5116-21.
8. Saldanha AJ. Java Treeview—extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics*. 22 nov 2004;20(17):3246-8.
9. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci*. 25 oct 2005;102(43):15545-50.
10. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K-F, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*. juill 2003;34(3):267-73.
11. Hsia CCW, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER, ATS/ERS Joint Task Force on Quantitative Assessment of Lung Structure. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 févr 2010;181(4):394-418.
12. Raij L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int*. 1 août 1984;26(2):137-43.
13. Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1 juill 1979;11(4):447-55.
14. Westberg G, Shultz PJ, Raij L. Exogenous nitric oxide prevents endotoxin-induced glomerular thrombosis in rats. *Kidney Int*. 1 sept 1994;46(3):711-6.

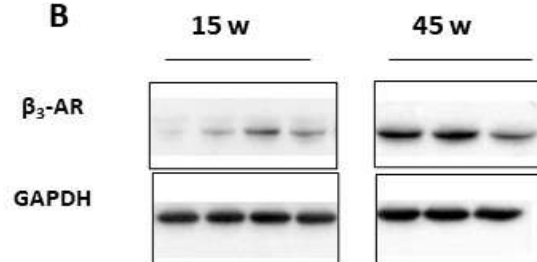
3. Supplementary data

Supplementary data, Figure S1.

A

Target	Reference	Results
β_3 -AR	SAB4500584 (Sigma-Aldrich)	

B



C

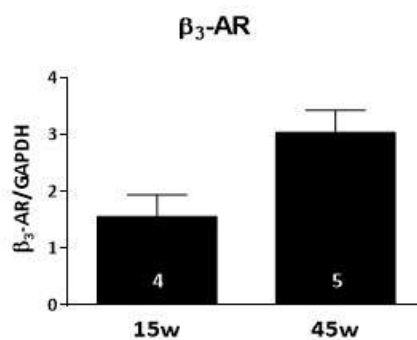


Figure S1: β_3 -AR antibody (A). Western-Blot of β_3 -AR protein at 15 and 45 weeks (B). β_3 -AR protein level at 15 (Tg β_3 ; n=4) and 45 weeks (Tg β_3 ; n=5) (C). Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Supplementary data, Figure S2.

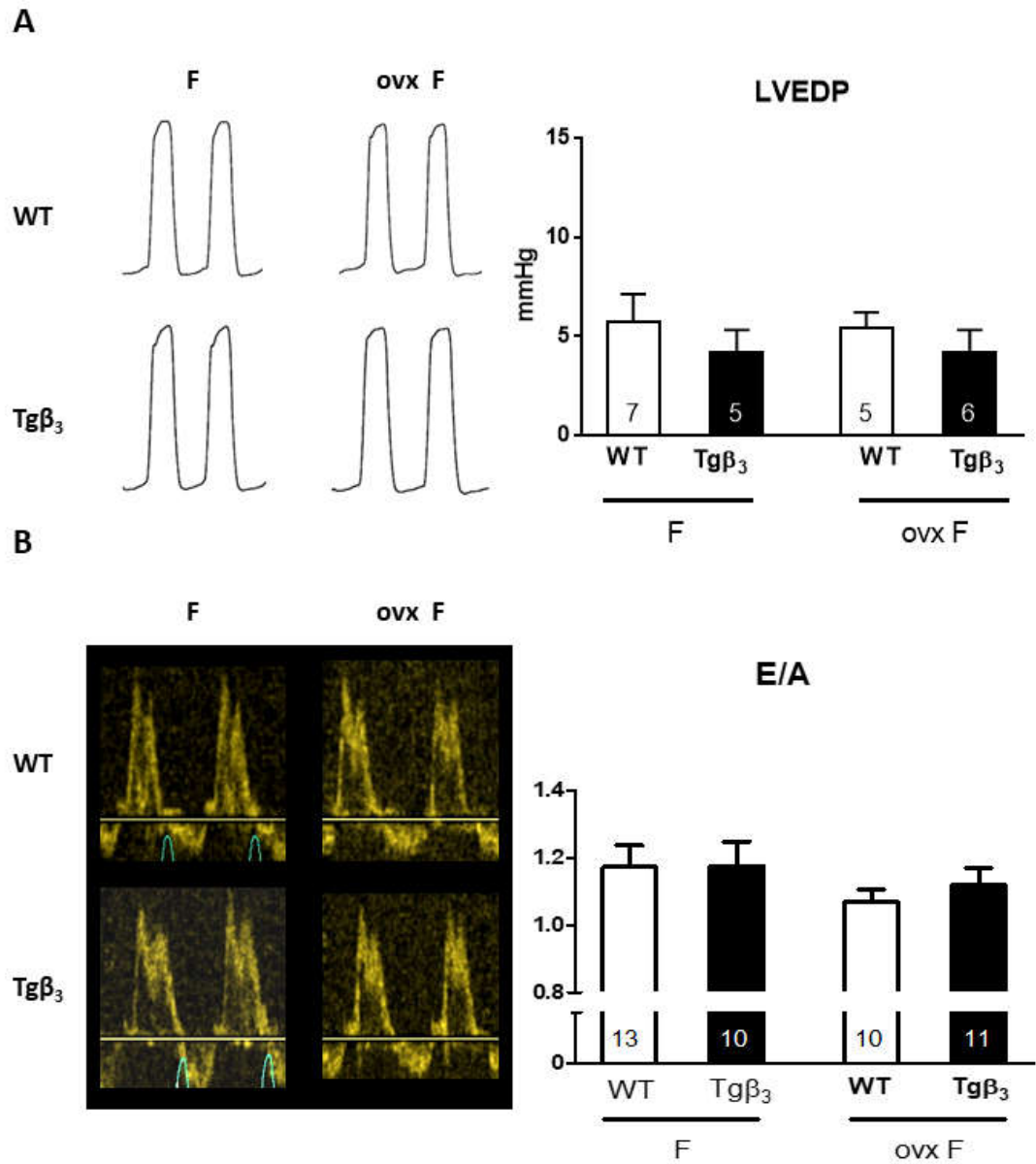


Figure S2: LV pressure measurements of 45 weeks WT (n=8) and Tg β_3 (n=9) rats (A). Evolution of diastolic function between 15 and 45 weeks measured by echocardiography (B). Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Supplementary data, Figure S3.

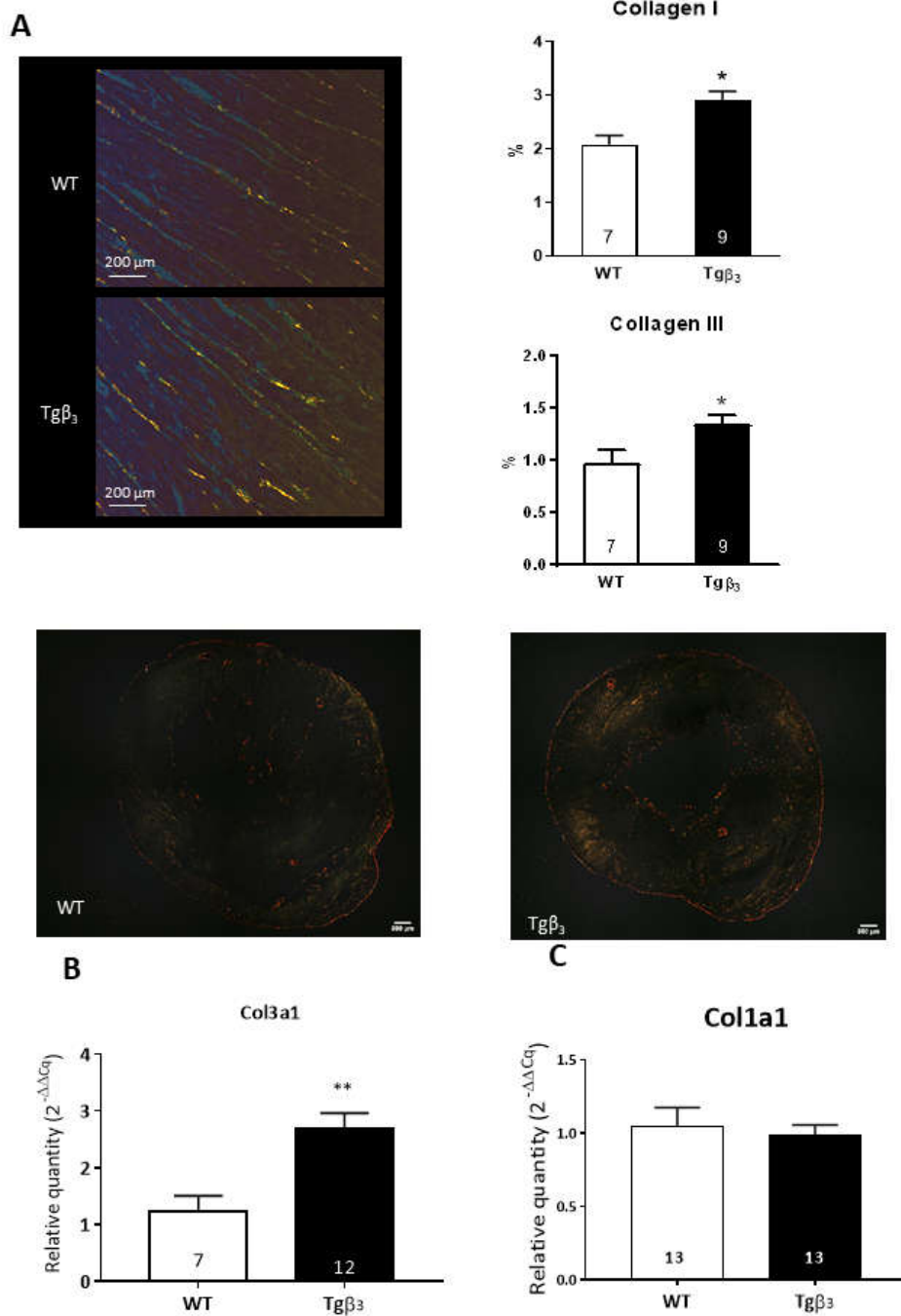


Figure S3: Fibrosis quantification. (A) Cryosections were stained with picrosirius red and viewed under polarized light to distinguish type I (red) from type III (green) collagen. Representative views from WT and Tg β_3 samples are presented. (B) Changes in Col3a1 transcript in WT (n=7) and Tg β_3 (n=12) rats. (C) Changes in Col1a1 transcript in WT (n=7) and Tg β_3 (n=13) rats. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *: $p < 0.05$.

Supplementary data, Figure S4.

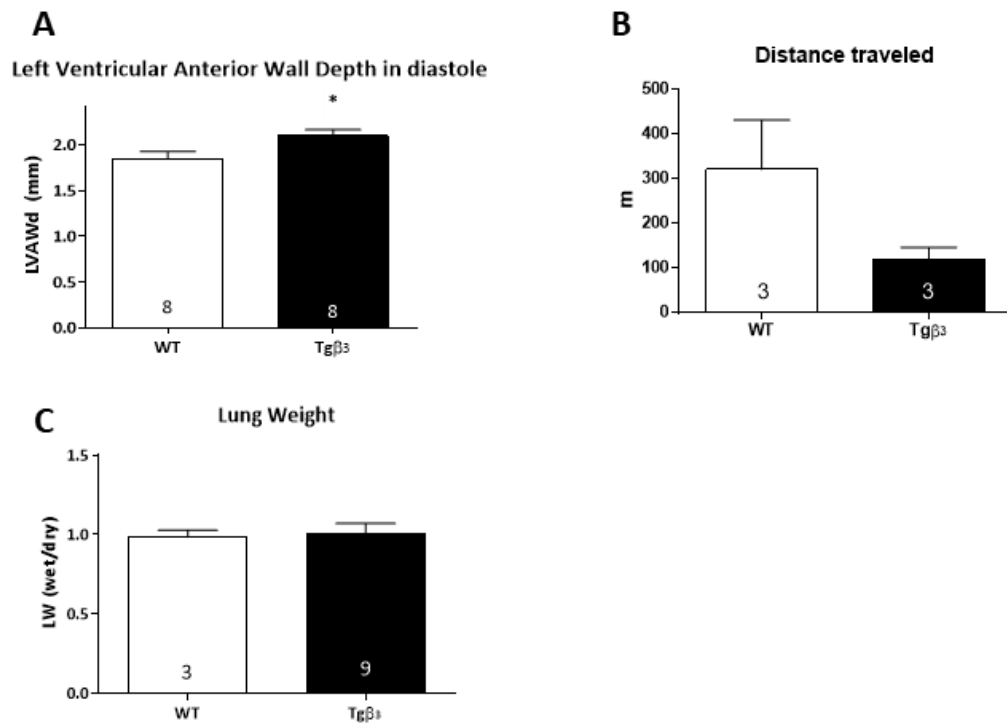


Figure S4: A) Left ventricular anterior wall depth in diastole at 60 weeks. B) Treadmill tolerance test with the evaluation of travelled distance. C) Lung weight (wet/dry). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *: $p < 0.05$.

Supplementary data, Figure S5.

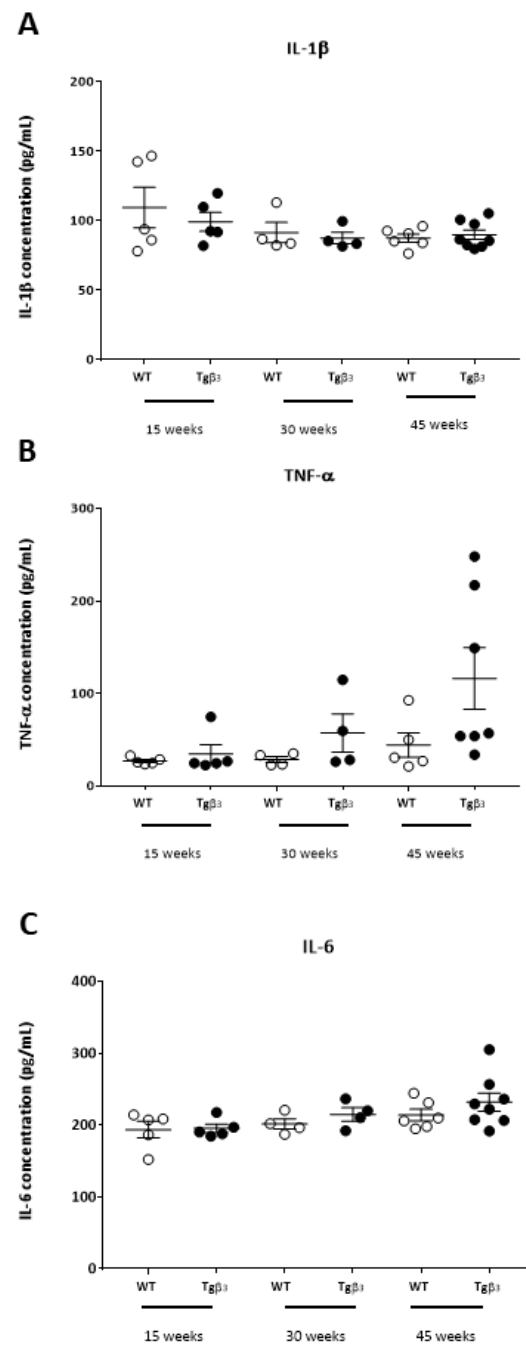


Figure S5: A) Rat IL-1 β plasma concentration B) Rat TNF- α plasma concentration C) Rat IL-6 plasma concentration. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *: $p < 0.05$.

Supplementary data, Figure S6.

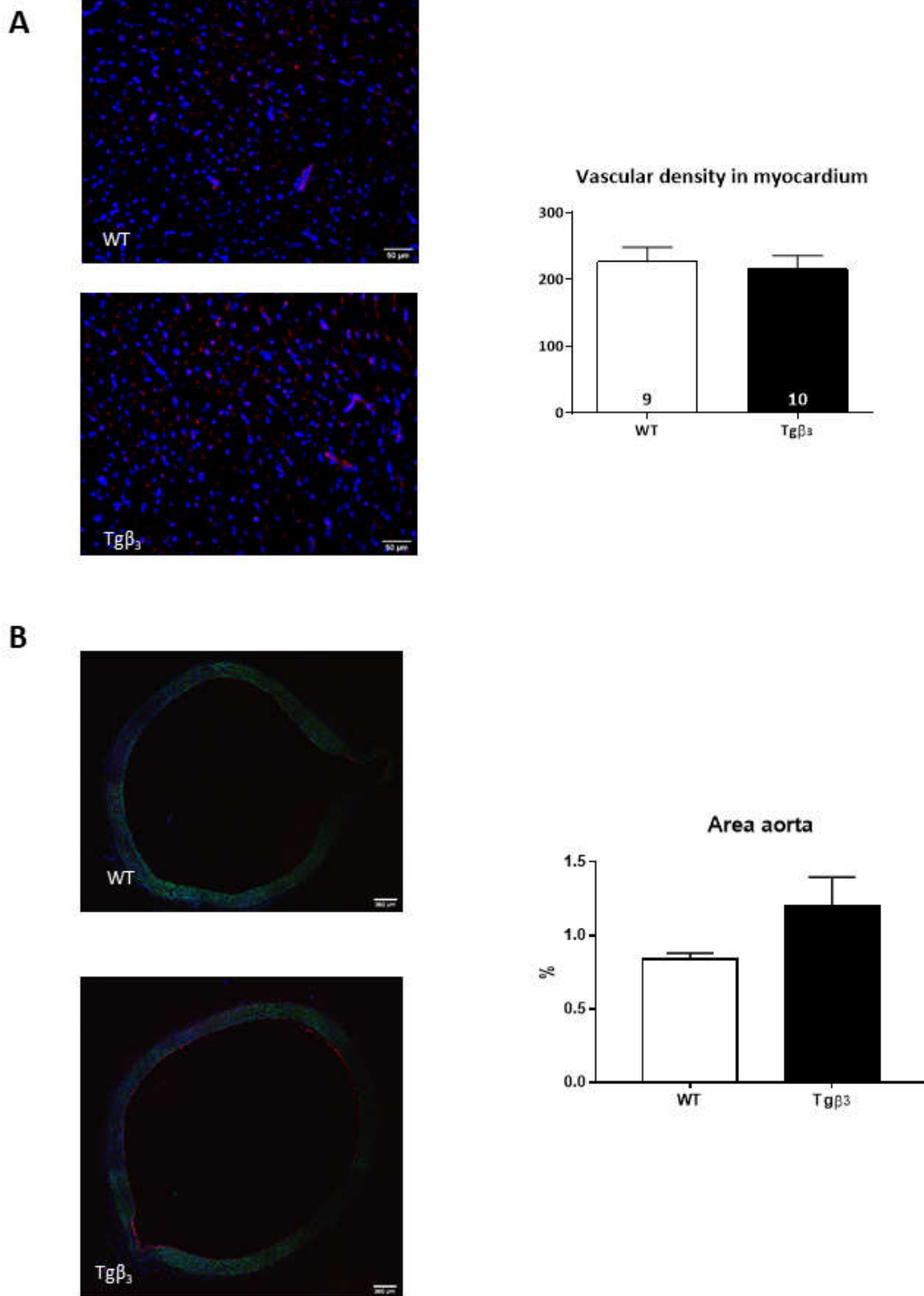


Figure S6: A) Vascular density in myocardium B) Mean area aorta. Representative views from WT and Tgβ₃ samples are presented. Data are expressed as mean ± SEM. *: p<0.05.

Supplementary data, Figure S7.

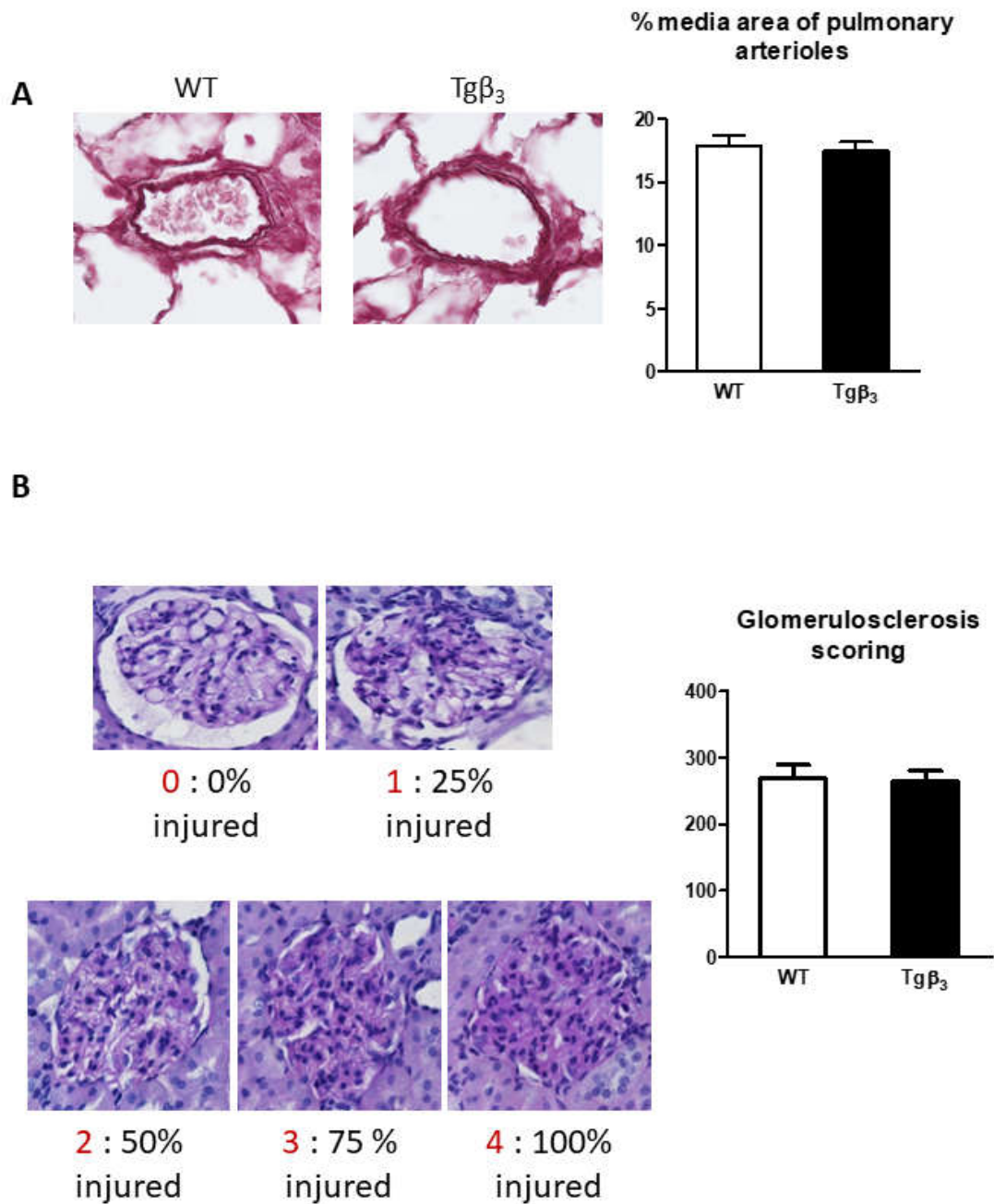


Figure S7: Vascular injuries of lungs and kidneys from WT (n=8) and Tg β_3 (n=9) rats. (A) Renal injuries were evaluated using the glomerular score (B). Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Supplementary data, Figure S7.

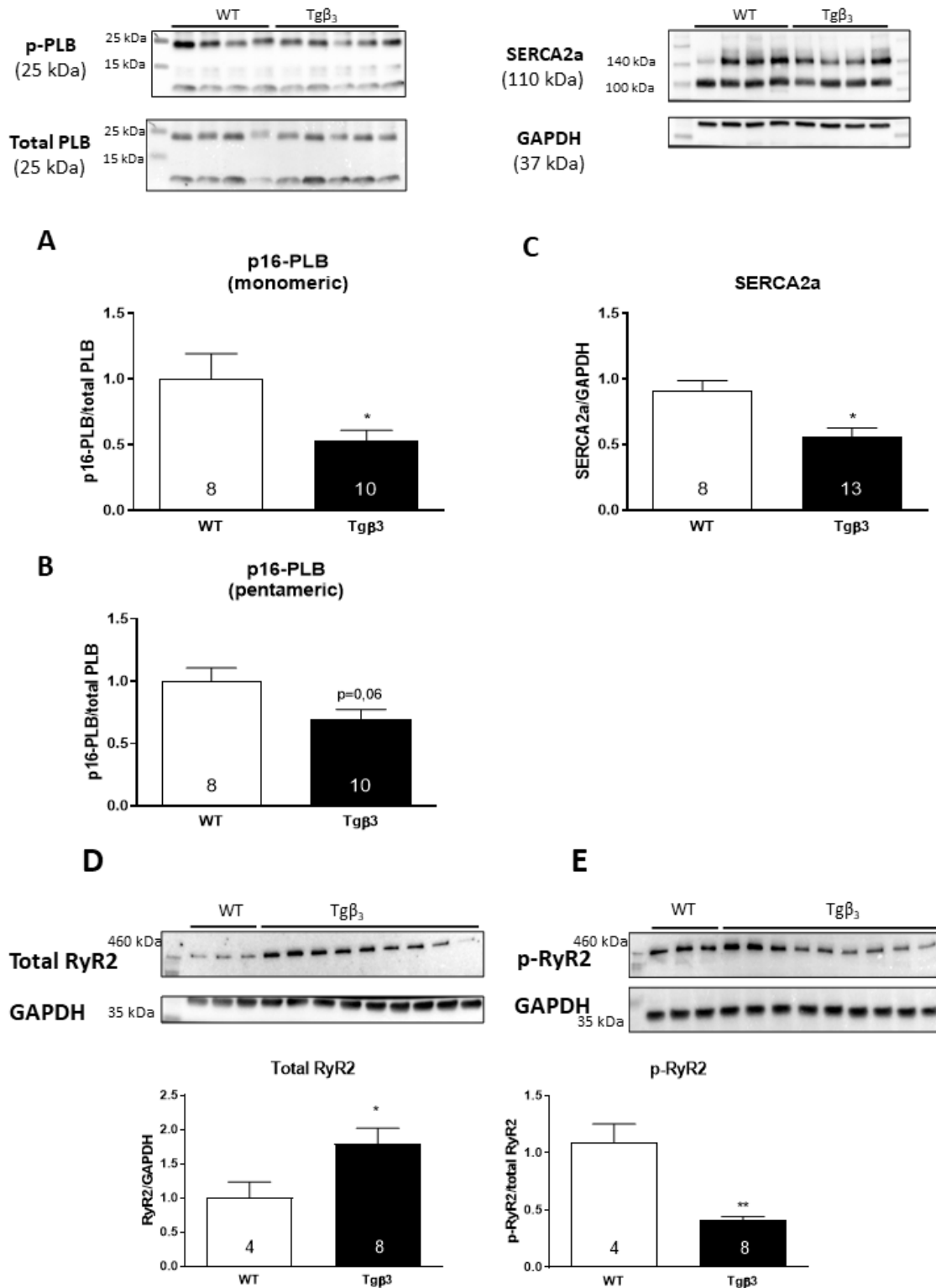


Figure S8: Protein expression of PLB (A), of serine 16 phosphorylated PLB (B), of SERCA2 (C), of RyR2 (D) and of serine 2808 phosphorylated RyR2 (E) all evaluated on whole heart tissue extracts at 45 weeks in WT (n=4-8) and Tgβ₃ (n=10). Data are expressed as mean ± SEM. *: p<0.05.

Table S1: Primers used for RT-qPCR experiments.

mRNA	Lenght (pb)	Sequence (5'-3')
hβ3-AR (F)	17	AGCTCTCTTGCCCATG
hβ3-AR (R)	19	ACTGGCTCATGATGGGCGC
Gapdh (F)	30	ACTGGCGTCTTCACCACCATGGAGAAGGCT
Gapdh (R)	30	CTCCTTGGAGGCCATGTAGGCCATGAGGTC
eNOS (F)	20	CCTTGAGTTGGCTCATCCAT
eNOS (R)	20	AGCTGTGCTGGCATAACAGAA
iNOS (F)	20	AGTCTTGGTGTAAAGCGGTGT
iNOS (R)	19	GAGGACTGTGGCTCTGACG
nNOS (F)	21	CAGCCAACACAGGAGCTACAA
nNOS (R)	20	TGCCCAAAGGCACAGAAGTG
H2afz (F)	20	CCTCACCGCAGAGGTACTTG
H2afz (R)	20	GTTGCAAGTGACGAGGGGTA
Sdha (F)	20	TACTGTTGCAGCACAGGGAG
Sdha (R)	20	CAGTCAGAGCCTTTCACGGT
Col3a1 (F)	20	GGGCCTCCCAGAACATTACA
Col3a1 (R)	20	CACCAGTGTGTTTAGTGCAGC
Col1a1 (F)	20	GGTGAGACGTGGAAACCTGA
Col1a1 (R)	20	TGGGTCCCTCGACTCCTATG

Table S2: Antibodies used for Western-Blot analyses.

Antibody	Reference
Anti-eNOS	610296, BD Biosciences, San Diego, USA
Anti-phosphorylated Ser1177 eNOS (P-eNOS)	#9571, Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-iNOS	AB5382, Millipore, USA
Anti-nNOS	#4231S, Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-RyR2 phospho Serine-2808	A010-30, Badrilla, United Kingdom
Anti-RyR2	ab2868, Abcam, United Kingdom
Anti-SERCA2	ab2817, Abcam, United Kingdom
Anti-PLB	ab2865, Abcam, United Kingdom
Anti-PLB phospho-serine 16	A010-12, Badrilla, United Kingdom
Anti-mouse IgG	SC 2055, Santa Cruz, Dallas, USA
Anti-rabbit IgG	SC 2054, Santa Cruz, Dallas, USA

Table S3: Cardiovascular parameters of WT and Tg β_3 females at 45 weeks of age. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Parameters	Females (F)		Ovariectomized females (ovx F)	
	WT (n=13)	Tg β_3 (n=13)	WT (n=12)	Tg β_3 (n=10)
LV morphological parameters				
Posterior wall thickness in diastole (mm)	1.70 $\pm$ 0.04	1.75 $\pm$ 0.07	1.75 $\pm$ 0.07	1.76 $\pm$ 0.07
Posterior wall thickness in systole (mm)	2.73 $\pm$ 0.06	2.79 $\pm$ 0.14	2.75 $\pm$ 0.01	2.70 $\pm$ 0.09
Anterior wall thickness in diastole (mm)	1.63 $\pm$ 0.06	1.50 $\pm$ 0.05	1.54 $\pm$ 0.05	1.46 $\pm$ 0.03
Anterior wall thickness in systole (mm)	2.87 $\pm$ 0.10	2.87 $\pm$ 0.12	2.78 $\pm$ 0.08	2.65 $\pm$ 0.06
Interventricular septal wall thickness in diastole (mm)	1.59 $\pm$ 0.04	1.54 $\pm$ 0.05	1.59 $\pm$ 0.07	1.56 $\pm$ 0.05
Interventricular septal wall thickness in systole (mm)	2.97 $\pm$ 0.08	2.79 $\pm$ 0.10	2.82 $\pm$ 0.09	2.71 $\pm$ 0.08
LV diameter in diastole (mm)	7.29 $\pm$ 0.13	7.09 $\pm$ 0.22	7.18 $\pm$ 0.12	7.13 $\pm$ 0.19
LV diameter in systole (mm)	3.86 $\pm$ 0.17	3.43 $\pm$ 0.23	3.81 $\pm$ 0.21	3.93 $\pm$ 0.24
Systolic function				
Ejection fraction (%)	84.9 $\pm$ 0.9	82.9 $\pm$ 1.6	80.5 $\pm$ 2.7	78.5 $\pm$ 2.7

Table S4: Arterial blood pressure values measured for WT and Tg β_3 female rats at 45 weeks. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Parameters	Females (F)		Ovariectomized females (ovx F)	
	WT (n=9)	Tg β_3 (n=5)	WT (n=5)	Tg β_3 (n=5)
Blood pressure				
Systolic blood pressure (mm Hg)	143.8 $\pm$ 5.2	148.4 $\pm$ 7.0	134.6 $\pm$ 5.0	124.5 $\pm$ 7.8
Diastolic blood pressure (mm Hg)	99.6 $\pm$ 2.7	104.2 $\pm$ 4.7	101.2 $\pm$ 2.9	91.3 $\pm$ 7.6
Mean blood pressure (mm Hg)	114.3 $\pm$ 3.5	118.9 $\pm$ 5.5	112.3 $\pm$ 3.5	102.3 $\pm$ 7.6

Table S5: Physiological and cardiovascular parameters recorded for WT and Tg β_3 males at 45 weeks of age. E/A: early-to-late filing ratio. Data are expressed as mean $\pm$ SEM *: p<0.05.

Parameters	WT (n=11)	Tg β_3 (n=12)
Body weight (g)	599 $\pm$ 63	622 $\pm$ 36
Tibia length (mm)	59.58 $\pm$ 1.03	60.75 $\pm$ 0.75
Heart Weight (g)	1.85 $\pm$ 0.10	1.89 $\pm$ 0.04
Heart rate (bpm)	337 $\pm$ 6	336 $\pm$ 7
LV morphological parameters		
Posterior wall thickness in diastole (mm)	1.83 $\pm$ 0.05	1.82 $\pm$ 0.04
Posterior wall thickness in systole (mm)	2.85 $\pm$ 0.05	2.76 $\pm$ 0.12
Anterior wall thickness in diastole (mm)	1.73 $\pm$ 0.06	1.59 $\pm$ 0.06
Anterior wall thickness in systole (mm)	3.27 $\pm$ 0.17	2.09 $\pm$ 0.08
Interventricular septal wall thickness in diastole (mm)	1.75 $\pm$ 0.08	1.67 $\pm$ 0.06
Interventricular septal wall thickness in systole (mm)	2.95 $\pm$ 0.09	2.87 $\pm$ 0.09
LV diameter in diastole (mm)	8.51 $\pm$ 0.14	8.86 $\pm$ 0.14
LV diameter in systole (mm)	4.93 $\pm$ 0.17	5.24 $\pm$ 0.21
Systolic function		
Ejection fraction (%)	78.03 $\pm$ 1.52	77.89 $\pm$ 0.83
LV diastolic parameters		
E-wave (m/s)	1.150 $\pm$ 0.039	1.139 $\pm$ 0.051
A-wave (m/s)	0.990 $\pm$ 0.031	0.862 $\pm$ 0.037 *
E/A ratio	1.155 $\pm$ 0.015	1.332 $\pm$ 0.041 *
E-wave deceleration time (ms)	43.37 $\pm$ 1.853	43.80 $\pm$ 2.239
Isovolumic relaxation time (ms)	22.30 $\pm$ 1.324	21.76 $\pm$ 0.887

Table S6: Cardiovascular parameters from WT and Tg β_3 males at 15 and 30 weeks of age. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Parameters	15 weeks		30 weeks	
	WT (n=13)	Tg β_3 (n=13)	WT (n=12)	Tg β_3 (n=10)
LV morphological parameters				
Posterior wall thickness in diastole (mm)	1.684 $\pm$ 0.070	1.613 $\pm$ 0.063	1.882 $\pm$ 0.181	1.804 $\pm$ 0.176
Posterior wall thickness in systole (mm)	2.413 $\pm$ 0.090	2.391 $\pm$ 0.042	3.078 $\pm$ 0.176	2.838 $\pm$ 0.145
Anterior wall thickness in diastole (mm)	1.526 $\pm$ 0.044	1.536 $\pm$ 0.106	1.617 $\pm$ 0.081	1.628 $\pm$ 0.064
Anterior wall thickness in systole (mm)	2.433 $\pm$ 0.174	2.131 $\pm$ 0.134	2.852 $\pm$ 0.167	2.968 $\pm$ 0.116
Interventricular septal wall thickness in diastole (mm)	1.505 $\pm$ 0.038	1.531 $\pm$ 0.049	1.913 $\pm$ 0.126	1.772 $\pm$ 0.103
Interventricular septal wall thickness in systole (mm)	2.246 $\pm$ 0.121	2.199 $\pm$ 0.094	3.226 $\pm$ 0.140	3.150 $\pm$ 0.111
LV diameter in diastole (mm)	7.232 $\pm$ 0.191	7.750 $\pm$ 0.179	7.843 $\pm$ 0.205	7.878 $\pm$ 0.204
LV diameter in systole (mm)	4.332 $\pm$ 0.196	4.659 $\pm$ 0.230	4.035 $\pm$ 0.302	4.205 $\pm$ 0.164
Systolic function				
Ejection fraction (%)	76.0 $\pm$ 1.8	76.2 $\pm$ 2.0	83.7 $\pm$ 2.2	82.7 $\pm$ 1.4
LV diastolic parameters				
E-wave (m/s)	1.116 $\pm$ 0.029	1.075 $\pm$ 0.014	1.108 $\pm$ 0.037	1.050 $\pm$ 0.076
A-wave (m/s)	1.067 $\pm$ 0.031	0.919 $\pm$ 0.037	1.024 $\pm$ 0.029	0.793 $\pm$ 0.049
E/A ratio	1.056 $\pm$ 0.032	1.180 $\pm$ 0.038	1.088 $\pm$ 0.044	1.261 $\pm$ 0.059
E-wave deceleration time (ms)	39.42 $\pm$ 2.01	43.25 $\pm$ 2.99	46.43 $\pm$ 3.17	45.42 $\pm$ 4.87
Isovolumic relaxation time (ms)	19.53 $\pm$ 0.36	20.79 $\pm$ 0.73	18.76 $\pm$ 0.74	20.31 $\pm$ 1.33

Table S7: Arterial blood pressure values measured for WT and Tg β_3 male rats at 45 weeks of age measured by arterial catheterism. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Parameters	WT (n=11)	Tg β_3 (n=12)
Systolic blood pressure (mmHg)	136.3 $\pm$ 4.0	133.4 $\pm$ 4.6
Diastolic blood pressure (mmHg)	95.29 $\pm$ 2.0	92.75 $\pm$ 3.1
Mean blood pressure (mmHg)	109.0 $\pm$ 2.6	106.3 $\pm$ 3.5

Table S8: Characteristics of perfused isolated working hearts under physiological condition in WT and Tg β_3 male rats at 45 weeks of age. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. Afterload was set at 80 mmHg and preload at 12.5 mmHg *: $p < 0.05$.

Parameter	WT (n=26)	Tg β_3 (n=23)
Heart rate (bpm)	255 $\pm$ 4	275 $\pm$ 5 *
Maximal pressure (mmHg)	150.0 $\pm$ 2.3	137.9 $\pm$ 2.0 *
Minimal pressure (mmHg)	-4.9 $\pm$ 1.5	-0.5 $\pm$ 0.8 *
EDP (mmHg)	8.8 $\pm$ 0.8	12.5 $\pm$ 1.5 *
Systolic ejection period (ms)	70.1 $\pm$ 2.5	70.5 $\pm$ 1.2
Contraction time (ms)	33.3 $\pm$ 3.1	26.5 $\pm$ 3.3
Diastolic filling period (ms)	90.4 $\pm$ 5.8	64.9 $\pm$ 5.5 *
Relaxation time (ms)	46.5 $\pm$ 1.2	53.4 $\pm$ 1.2 *
dP/dtmax (mmHg/s)	6.211 $\pm$ 184	5.569 $\pm$ 194 *
dP/dtmin (mmHg/s)	-4.936 $\pm$ 109	-4.453 $\pm$ 109 *
Cardiac output (mL/min)	77.7 $\pm$ 1.7	74.1 $\pm$ 2.4
Aortic flow (mL/min)	54.7 $\pm$ 1.4	53.1 $\pm$ 2.7
Coronary flow (mL/min)	22.7 $\pm$ 1.0	22.0 $\pm$ 1.0

45wk males differential**Significant Positive**

Agilent oligonucleotide	Gene Symbol	Name
A_42_P633958	Col4a2	Collagen, type IV, alpha 2
A_42_P638620	Lcn2	Lipocalin 2
A_42_P835462	Ak1	Adenylate kinase 1
A_43_P10689	Synm	Synemin, intermediate filament protein
A_44_P124733	Zp2	Zona pellucida glycoprotein 2
A_44_P170524	Tpcn1	Two pore segment channel 1
A_44_P375553	Lrp1	Low density lipoprotein receptor-related protein 1
A_44_P539156	Dus3l	Dihydrouridine synthase 3-like
A_64_P016828	Myo1b	Myosin IB
A_64_P043033	Cbr3	Carbonyl reductase 3
A_64_P062373	Vps37d	VPS37D, ESCRT-I subunit
A_64_P108210		
A_64_P133967	Abcd2	ATP-binding cassette, sub-family D, member 2
A_64_P140000		
A_64_P147724		

**Significant
Negative**

Agilent oligonucleotide	Gene Symbol	Name
A_42_P482051		
A_42_P483564	Ptpcr	Protein tyrosine phosphatase, receptor type c
A_42_P542727	Ano4	Anoctamin 4
A_42_P554722	Pigp	Phosphatidylinositolglycan anchor biosynthesis, class P
A_42_P598602	Cd3g	CD3g molecule
A_42_P602724	Ubd	Ubiquitin D
A_42_P606890	Abi2	Abl-interactor 2
A_42_P661992		
A_42_P663871	Gzma	Granzyme A
A_42_P669388	Cnksr1	Connector enhancer of kinase suppressor of Ras 1
A_42_P768024	Spn	sialophorin
A_42_P803673		
A_42_P804822	Scn7a	Sodium voltage-gated channel alpha subunit 7
A_43_P10011	Pnlsr	PNN-interacting serine/arginine-rich protein
A_43_P11839	Meox2	mesenchyme homeobox 2
A_43_P22744	Adcy9	Adenylate cyclase 9
A_43_P22811	Cd6	CD6 molecule
A_44_P1011391	Usp40	Ubiquitin specific peptidase 40
A_44_P1011687	Tfpi	Tissue factor pathway inhibitor
A_44_P1013330	Arpp21	cAMP regulated phosphoprotein 21 kDa
A_44_P1029397	Bst2	Bone marrow stromal cell antigen 2
A_44_P1039994	Irf7	Interferon regulatory factor 7
A_44_P104361	Fam35a	Family with sequence similarity 35 member a
A_44_P1046054	Brd4	Bromodomain containing 4
A_44_P1059966	Sdf2	Stromal cell derived factor 2
A_44_P107596	Ctsw	Cathepsin W
A_44_P168569	Srsf11	Serine/arginine-rich splicing factor 11
A_44_P184465	Calm3	Calmodulin 3
A_44_P191784	Calm1	Calmodulin 1

ANNEXES

A_44_P214811	Tfrc	Transferrin receptor
A_44_P229277	Amhr2	Anti-mullerian hormone receptor type 2
A_44_P236636		
A_44_P283941	Arhgdib	Rho GDP dissociation inhibitor beta
A_44_P290734		
A_44_P294675	Slfn3	
A_44_P299870	Hsp90aa1	Heat shock protein 90kDa alpha family class A member 1
A_44_P301963	Psmb9	Proteasome subunit beta 9
A_44_P302536	Pnn	Pinin, desmosome associated protein
A_44_P324707	RT1-EC2	HLA
A_44_P332606	C2	Complement component 2
		CCZ1 homolog, vacuolar protein trafficking and biogenesis associated
A_44_P339881	Ccz1	
A_44_P344928		
A_44_P367586	Olr390	
A_44_P370855	Bmpr2	Bone morphogenetic protein receptor, type II
A_44_P384628		
A_44_P423528	Ndufa8	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A8
A_44_P423691	Lgals5	
A_44_P443500		
		USH1 protein network component harmonin binding protein 1
A_44_P464065	Ushbp1	
A_44_P477116	Pcytl1a	Phosphate cytidylyltransferase 1, choline, alpha
A_44_P487910	Lrrc33	
A_44_P494741	Tbc1d5	TBX1 domain family member 5
A_44_P508992		
A_44_P527556	Taf7	TATA-box binding protein associated factor 7
A_44_P570046		
A_44_P592221	Sox7	SRY-box 7
A_44_P790417	Spert	Spermatid associated
A_44_P868963	Tnfrsf14	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 14
A_44_P899264	Lhfp12	Lipoma HMGIC fusion partner-like 2
A_44_P945862	Trub2	TruB pseudouridine synthase family member 2
A_44_P959259		
A_64_P000761		
A_64_P000762		
A_64_P001647		
A_64_P002029		
A_64_P002924	Asrgl1	Asparaginase like 1
A_64_P003255	RT1-M6-1	HLA
A_64_P003261	Tbc1d5	TBC1 domain family member 5
A_64_P003514		
A_64_P003913		
A_64_P008091	Slc15a3	Solute carrier family 15 member 3
A_64_P008406	Cx3cr1	C-X3-C motif chemokine receptor 1
A_64_P010748		
A_64_P010860		
A_64_P010902	Msra	Methionine sulfoxide reductase a
A_64_P010960		
A_64_P012252		
A_64_P012444	Peo1	Chromosome 10 ORF 2
A_64_P012661	Ghrh	Growth hormone releasing hormone
A_64_P013565		
A_64_P015380	Mfsd1	Major facilitator superfamily domain containing 1

ANNEXES

A_64_P016245		
A_64_P017660		
A_64_P017761	Morn1	MORN repeat containing 1
A_64_P019007	Calm3	Calmodulin 3
A_64_P023120		
A_64_P023481	Pcdhg@	Protocadherin gamma cluster
A_64_P024419	Parp14	Poly(ADP-ribose) polymerase family member 14
A_64_P024464		
A_64_P025329		
A_64_P027138		
A_64_P027550		
A_64_P029962		
A_64_P030145	Tmem47	Transmembrane protein 47
A_64_P030554	Mbd3	Methyl-CpG binding domain protein 3
A_64_P031906		
A_64_P032405	Vmac	Vimentin-type intermediate filament associated coiled-coil protein
A_64_P033205	Tpt1	Tumor protein, translationally-controlled 1
A_64_P037848		
A_64_P037993	Rps4y2	Ribosomal protein S4, Y-linked 2
A_64_P038342	Snrpn	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N
A_64_P040940		
A_64_P041536	Rassf2	Ras association domain family member 2
A_64_P042099		
A_64_P042152	Zim1	
A_64_P043377		
A_64_P044221		
A_64_P045716	Hsp90ab1	Heat shock protein 90kDa alpha family class b member 1
A_64_P047264		
A_64_P047281	Prkcb	protein kinase C beta
A_64_P047764		
A_64_P048637	Cnfn	Cornifelin
A_64_P048939		
A_64_P049085		
A_64_P049584	Sdpr	Serum deprivation response
A_64_P049738		
A_64_P050969		
A_64_P053636	Gla2	Glycine receptor alpha 2
A_64_P056549		
A_64_P056831	Inpp1	Inositol polyphosphate-1-phosphatase
A_64_P057222	RT1-S2	HLA
A_64_P057225	RT1-S2	HLA
A_64_P058953	Defb43	
A_64_P059032	Susd3	Sushi domain containing 3
A_64_P059790		
A_64_P062852		
A_64_P062924		
A_64_P063045		
A_64_P064976		
A_64_P065422		
A_64_P065631		
A_64_P065837		
A_64_P067000	Prima1	Proline rich membrane anchor 1
A_64_P069071	Lpar6	Lysophosphatidic acid receptor 6

ANNEXES

A_64_P070502		
A_64_P070826		
A_64_P070841		
A_64_P072308		
A_64_P072633	Olr59	
A_64_P074490	Wipi1	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1
A_64_P075647	Lmnbl	Lamin B1
A_64_P079638		
A_64_P080756		
A_64_P082097	Nit2	Nitrilase family member 2
A_64_P083625		
A_64_P084218		
A_64_P084445	Prr22	Proline rich 22
A_64_P084563		
A_64_P084856		
A_64_P086214		
A_64_P088331		
A_64_P090203		
A_64_P090475	RT1-CE5	HLA
A_64_P090593	RT1-CE13	HLA
A_64_P090739		
A_64_P092052	Snurf	SNRPN upstream reading frame
A_64_P092055	Snurf	SNRPN upstream reading frame
A_64_P092718	B2m	Beta-2-microglobulin
A_64_P094474	Snrpn	Small nuclear ribonucleoprotei polypeptide N
A_64_P095392		
A_64_P095920	Ccl6	
A_64_P097168		
A_64_P097881		
A_64_P098290		
A_64_P098892		
A_64_P099225	Dnah10	Dynein axonemal heavy chain 10
A_64_P099424		
A_64_P100634	Noxa1	NADPH oxidase activator 1
A_64_P100669	E2f8	E2f transcription factor 8
A_64_P101013		
A_64_P101296		
A_64_P101573		
A_64_P102533	Tmem229a	Transmembrane protein 229a
A_64_P102807	RT1-T18	HLA
A_64_P103493		
A_64_P104206		
A_64_P104242	Ttc3	Tetratricopeptide repeat domain 3
A_64_P105872	Acin1	Apoptotic chromatin condensation inducer 1
A_64_P106221	Plekho2	Pleckstrin homology domain containing O2
A_64_P106414		
A_64_P107737	Tnfrsf13c	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 13c
A_64_P107798		
A_64_P110018	Rapgef6	Rap guanine nucleotide exchange factor 6
A_64_P113257		
A_64_P113743	Gimap9	
A_64_P115060	Ccl5	C-C motif chemokine ligand 5
A_64_P115114		
A_64_P117031	Abcc1	ATP binding cassette subfamily c member 1

ANNEXES

A_64_P124215				
A_64_P124781				
A_64_P126772	Flywch1	FLYWCH-type zinc finger 1		
A_64_P127753				
A_64_P130578	RT1-Db1	HLA		
A_64_P133134				
A_64_P133508				
A_64_P133642				
A_64_P134440				
A_64_P135745				
A_64_P137828	Stambp	STAM binding protein		
A_64_P138420	Cldn19	Claudin 19		
A_64_P138435	Mettl11b	Methyltransferase like 11b		
A_64_P138534				
A_64_P138949	Wasl	Wiskott-Aldrich syndrome like		
A_64_P139225				
A_64_P141675				
A_64_P142640	Gjc3	Gap junction protein gamma 3		
A_64_P142867				
A_64_P143614	Paip2l1			
A_64_P150726	Ahsp	Alpha hemoglobin stabilizing protein		
A_64_P152637				
A_64_P153273	Mcpt10			
A_64_P155240				
A_64_P155716	Pms1	PMS1 homolog 1, mismatch repair system component		
A_64_P158118				
A_64_P158858				
A_64_P159685				
A_64_P161808	Extl3	Exostosin like glycosyltransferase 3		
A_64_P162391				
A_64_P162705	Ceacam9			
A_64_P162860				
A_64_P165666	Siglec5	Sialic acid binding Ig like lectin 5		
A_64_P181176				
A_64_P183242				
A_64_P249046	Pik3c2b	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 beta		
A_64_P296417				
A_64_P395054				

2. Annexes 2 : Publications, communications orales et posters

Publications :

Dhot J, Ferron M, Prat V, Persello A, Roul D, Stévant D, Guijarro D, Piriou N, Aillerie V, Erraud A, Toumaniantz G, Erfanian M, Tesse A, Grabherr A, Tesson L, Menoret S, Anegón I, Trochu JN, Steenman M, De Waard M, Rozec B, Lauzier B, Gauthier C. Overexpression of endothelial β_3 -adrenergic receptor induces diastolic dysfunction in rats. ESC Heart Fail. 2020 Oct 9. doi: 10.1002/ehf2.13040. Epub ahead of print. PMID: 33034410.

Publications en préparation :

J Dhot, A Tesse, M Burban, V Aillerie, A Erraud, D Stevant, C Menguy, V Sauzeau, B Rozec, M De Waard, C Gauthier, B Lauzier. Endothelial dysfunction: as trigger to diastolic dysfunction?

J Dhot, V Prat, M Ferron, V Aillerie, A Erraud, B Rozec, M De Waard, C Gauthier, B Lauzier. Implication of soy-based diet for animal models.

Communications orales :

J Dhot, V Prat, D Stévant, M Ferron, A Persello, V Aillerie, A Erraud, M Erfanian, M De Waard, B Rozec, JN Trochu, C Gauthier, B Lauzier. Phytoestrogen: protective effect in HFpEF through ageing? (GRRC, Lille, France), 2019

Présentation posters commentés :

J Dhot, V Prat, D Stévant, M Ferron, A Persello, V Aillerie, A Erraud, M Erfanian, M De Waard, B Rozec, J-N Trochu, C Gauthier, B Lauzier. Phytoestrogen: protective effect in HFpEF through ageing? (GRRC, Lille, France), 2019

J Dhot, D Stevant, A Persello, M Ferron, M Burban, V Prat, V Aillerie, A Erraud, A Tesse, M De Waard, B Rozec, C Gauthier, B Lauzier. Endothelium as a new target in HFpEF? (Autumn school (DHU), Nantes, France), 2018.

M Burban, **J Dhot**, V Bon-Barret, A Erraud, A Tesse, V Prat, B Rozec, M De Waard, C Gauthier, B Lauzier. Endothelium alteration is a key process in the development of heart failure with preserved ejection fraction (Printemps de la cardiologie, Montpellier, France), 2018.

J Dhot, V Prat, A Persello, V Aillerie, M Burban, B Rozec, M De Waard, C Gauthier, B Lauzier. Identification of potential target involved in the development of heart failure with preserved ejection fraction (Printemps de la cardiologie, Montpellier, France), 2018.

J Dhot, V Prat, M Ferron, A Erraud, V Aillerie, M Erfanian, A Tesse, B Rozec, M Steenman, C Gauthier, B Lauzier. Identification of metabolic targets and signalling pathways involved in the pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction (JESFC, Paris, France), 2018.

J Dhot, V Prat, M Ferron, A Persello, M Burban, A Erraud, V Aillerie, B Rozec, M Steenman, C Gauthier, B Lauzier. Metabolic involvement in the pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction (Autumn school (DHU), Nantes, France), 2017.

J Dhot, V Prat, M Ferron, A Erraud, V Aillerie, B Rozec, A Tesse, M Steenman, C Gauthier, B Lauzier. Identification of targets involved in the pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction (SHVM, Weimar, Allemagne), 2017.

J Dhot, M Steenman, V Prat, M Ferron, A Persello, A Erraud, B Rozec, B Lauzier, C Gauthier. Identification of signalling pathways potentially involved in the development of heart failure with preserved ejection fraction (Printemps de la Cardiologie, Nantes, France), 2017.

Posters :

T Dupas, M Denis, J Dontaine, A Persello, L Bultot, A Erraud, D Vertommen, B Bouchard, A Tessier, **J Dhot**, M De Waard, A Olson, C Gauthier, B Rozec, C Des Rosiers, L Bertrand, T Issad, B Lauzier. Régulation tissue et temps spécifique de l'O-GlcNAcylation en post-natal (Société Française de Pédiatrie, Lille, France), Novembre 2020.

T Dupas, M Denis, J Dontaine, A Persello, L Bultot, A Erraud, D Vertommen, B Bouchard, **J Dhot**, M De Waard, A Olson, B Rozec, C Des Rosiers, L Bertrand, T Issad, B Lauzier. O-GlcNAc levels are regulated in a tissue and time specific manner during post-natal development, independently of dietary intake (Printemps de la Cardiologie, Grenoble, France), 2020.

A Bangy--Letheule, F Souab, S Bourgoïn, S Michelland, V Cunin, M Seve, V Aillerie, **J Dhot**, J Montnach, A Persello, B Rozec, B Lauzier, M De Waard. A non-targeted quantitative mass spectrometry approach for the identification of new blood biomarkers of septic shock in the secretory of a rat model of endotoxemic shock (Printemps de la Cardiologie, Grenoble, France), 2020.

M Denis, M Ferron, A persello, **J Dhot**, A Erraud, V Aillerie, A Tessier, JC Chatham, B Rozec, B Lauzier. O-GlcNAcylation: a new treatment for septic shock for child? (Normand Pediatrics Congress, France), 2018.

M Ferron, **A Persello**, **J Dhot**, M Denis, J Cadiet, V Aillerie, A Erraud, M Rivière, A tessier, J Lebreton, JC Chatham, M De Waard, C gauthier, B rozec, B Lauzier. O-GlcNAc stimulation is beneficial in septic shock (Printemps de la cardiologie, Montpellier, France), 2018.

M Burban, **J Dhot**, M Ferron, V Prat, A Erraud, V Aillerie, B Rozec, A Tesse, C Gauthier, B Lauzier. Endothelial function in heart failure with preserved ejection fraction (Autumn school (DHU), Nantes, France), 2017.

A Persello, M Ferron, A Erraud, V Aillerie, **J Dhot**, M Burban, V Prat, JC Chatham, B Rozec, C Gauthier, B Lauzier. Deciphering the cardiovascular beneficial effects of O-GlcNAc stimulation in the septic shock: from the function to the pathways. (Printemps de la Cardiologie, Nantes, France), 2017.

M Ferron, M Erfanian, V Prat, A Erraud, **J Dhot**, D Guijarro, V Aillerie, B Rozec, B Lauzier, C Gauthier. Cardiac contractility in heart failure with preserved ejection fraction: implication of endothelium and calcium pathway (Printemps de la Cardiologie, Nantes, France), 2017.

Titre : Implication de l'endothélium dans le développement de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

Mots clés : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée, dysfonction endothéliale, récepteur β_3 -adrenergique

Résumé : L'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (ICFEP) est l'une des pathologies cardiovasculaires des plus courantes dans le monde. Les patients, souvent des femmes âgées, présentent de nombreuses comorbidités comme l'hypertension artérielle, l'obésité, le diabète, l'hypertension artérielle pulmonaire, l'insuffisance rénale ou l'anémie. A ce jour la mortalité et la morbidité associées sont élevées et aucun traitement n'est disponible. Il est donc nécessaire de comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Depuis une dizaine d'années, les études mettent en avant l'inflammation bas grade comme étant à l'origine de l'ICFEP. Cette inflammation entraînerait une dysfonction endothéliale puis des altérations au niveau de la fonction cardiaque.

Les objectifs de ma thèse ont été de caractériser un nouveau modèle animal d'ICFEP induite par une dysfonction endothéliale afin par la suite d'identifier des cibles thérapeutiques. Nous avons montré que le rat Tg β_3 développe bien une dysfonction diastolique caractéristique de l'ICFEP sur le long terme. En conclusion nous avons pu mettre en avant que l'augmentation de l'expression du récepteur β_3 -adrenergique entraîne une augmentation de la production de $\bullet\text{NO}$ et de $\text{O}_2\bullet^-$ qui serait à l'origine de la dysfonction endothéliale et donc possiblement de l'ICFEP. Enfin, grâce à une étude transcriptomique chez ces animaux pathologiques, nous avons mis en évidence une cible potentielle qui est augmentée au niveau circulant. Cette cible est en cours d'évaluation en clinique comme potentiel biomarqueur de l'ICFEP.

Title: Involvement of the endothelium in the development of heart failure with preserved ejection fraction

Keywords: heart failure with preserved ejection fraction, endothelial dysfunction, β_3 -adrenergic receptor

Abstract: Heart Failure with preserved Ejection Fraction (HFpEF) is one of the most common cardiovascular diseases in the world. Patients, often elderly women, have many co-morbidities such as high blood pressure, obesity, diabetes, pulmonary arterial hypertension, renal failure or anemia. To date the associated mortality and morbidity are high and no treatment is available. It is therefore necessary to understand the pathophysiological mechanisms involved, in order to identify new therapeutic targets. Over the last ten years, studies have highlighted low-grade inflammation as the cause of HFpEF. This inflammation is believed to lead to endothelial dysfunction and alterations in cardiac function.

The objectives of my thesis were to characterize a new animal model of HFpEF triggered by endothelial dysfunction in order to identify therapeutic targets thereafter. We showed that the Tg β_3 rat develops diastolic dysfunction, characteristic of HFpEF, over the long term. In conclusion, we were able to show that the increase in the expression of the receptor β_3 -adrenergic leads the increase in the production of $\bullet\text{NO}$ and $\text{O}_2\bullet^-$ that would be at the origin of the endothelial dysfunction and thus possibly of the HFpEF. Finally, thanks to a transcriptomic study in pathological animals, we have identified a potential target which is increased at circulating level. This target is currently being evaluated in the clinic as a potential biomarker of HFpEF.