



HAL
open science

Rôle de la dysfonction endothéliale dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque

Sarah Guimbal

► **To cite this version:**

Sarah Guimbal. Rôle de la dysfonction endothéliale dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université de Bordeaux, 2020. Français. NNT : 2020BORD0263 . tel-03163539

HAL Id: tel-03163539

<https://theses.hal.science/tel-03163539>

Submitted on 9 Mar 2021

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

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

THESE

Pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Bordeaux

Spécialité : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Ecole doctorale n°154 : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement le 15 Décembre 2020 par

Sarah GUIMBAL

**Le rôle de la dysfonction endothéliale dans
la physiopathologie de
l'Insuffisance Cardiaque**

Travail réalisé au sein de l'unité de recherche INSERM U1034
Biologie des maladies cardiovasculaires

Sous la supervision du Dr. Marie-Ange RENAULT

Soutenue la 15 Décembre 2020

Membres du Jury :

M. Jean-François ARNAL Pr. de l'Université de Toulouse	Président
Mme Ebba BRAKENHIELM, DR2 Inserm	Rapporteur
M. Benjamin LAUZIER, MC de l'Université de Nantes	Rapporteur
Mme Marie-Ange RENAULT, CR Inserm	Directrice de thèse

Remerciements

Je remercie le Dr. Brakenhielm ainsi que le Dr. Lauzier d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et de me faire l'honneur de rapporter mon travail. Je remercie également le Pr. Arnal de participer à mon jury et d'examiner mon travail.

Je tiens à remercier le Pr Thierry Couffinhal pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de l'INSERM U1034 et de nous avoir fait confiance avec Pauline pour le compte Twitter. C'était un réel plaisir d'évoluer dans ce laboratoire.

A Marie-Ange, merci pour la thèse, et pour avoir supporté ma lourdeur ! Evidemment, je te remercie pour toutes les techniques que tu m'as apprises (surtout la PCR), tous ces moments où tu m'as encouragé et les conseils chics que tu m'as donnés. Mais bien plus encore, je te remercie pour ta confiance pendant ces trois années et je te dois énormément. Never forget, « à jamais la première thésarde ».

A Alain, merci pour vos conseils, vos corrections et vos questions qui m'ont été très précieux en cette fin de thèse. Merci aussi pour le rock à la NSFA !

A Candice, une image vaut mieux que mille mots, mais merci d'être une amie et pour tous nos cafés et latte, le soutien, tes conseils et tes blagues de trentenaire. Je suis heureuse de t'avoir rencontré et de t'avoir vu devenir une mini-chef.

A Pauline : c'est difficile de résumer trois ans en quelques lignes, je te remercie pour toutes nos discussions en culture, les Y, les expressions bretonnes, la bonne musique et sache que je t'oublierai jamais malgré le post-doc, les strass et les paillettes, et nos souvenirs, je les garde en mémoire. Change rien Popo.

A Pierre-Louis, merci pour tout le soutien mutuel, l'ambiance sonore que tu installais dans le labo, les bolas et l'assassymphonie. Surtout l'assassymphonie.

A mes collègues thésards, Alice, Pierre, Paul, Lauriane, Caroline, Florian, Sébastien, Laura : merci pour tous ces bons moments ensemble que ce soit à la cafet, en congrès ou en histo. Merci pour tout le drama, le gossip, les info manips et la bonne ambiance !

Je te remercie Annabel, pour ta bonne humeur et pour tout le travail que tu as réalisé, et l'aide que cela m'a apporté dans la réalisation de ces travaux.

Je remercie chaleureusement Sylvain, Maxime et Philippe pour votre travail précieux au cours de ma thèse et tous nos chahutages.

A Omar et Carole : merci pour tous ces bons moments, ta franchise Carole et ta beauté Omar (fashion week everyday).

Christelle, merci pour le travail que tu fournis tous les jours pour toute l'unité, et pour ta gentillesse et bienveillance envers les étudiants.

Je remercie tous les membres de l'unité avec qui j'ai pu échanger : Cécile, Pascale, Marie-Lise, Jean-Paul, Etienne, Béatrice, Chloé, Olivier, Virginie et Virginie, Sylvie et Sylvie, Jérôme, Jérémie, Harmonie, Clélia, Ninon, Soizic.

A mes amis montpelliérains, Siko, Leïla, David, Laurent, Nicos, Romain : merci d'être là depuis tout ce temps et d'avoir soutenu la pitchoune ! Dr Pitchoune maintenant.

A Lucas, merci d'avoir été quotidiennement une présence réconfortante au milieu de tout ce stress et pour tout ce qu'on vit ensemble.

A mes parents, Jean-Jo, Janine et ma famille, merci pour votre soutien infailible lors des hauts et des bas et de m'avoir permis d'arriver jusqu'ici !

A Agathe, une femme like you, on en fait plus, merci d'être amie en or.

A Julien, merci d'être mon horcrux depuis dix ans déjà. One heart, one love, one way.

Pessac's the limit.

Liste des abréviations

•NO : monoxyde d'azote

ADP : Adenosine Diphosphate

ANP : Atrial Natriuretic Peptide

ATP : Adenosine Triphosphate

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BNP : Brain Natriuretic Peptide

BPCO : Bronchopneumopathie Chronique Obstructive

CCL2 : Chemokine (C-C motif) Ligand 2

CD31 : Cluster of Differentiation 31

CD34 : Cluster of Differentiation 34

CDH5 : Cadherin-5 ou Vascular endothelial cadherin

CE : Cellule Endothéliale

DHH : Desert Hedgehog

FcεRI : type I Fcε receptor

FEVG : Fraction d'Ejection Ventriculaire Gauche

FGF2 : Fibroblast Growth Factor 2

FHL2 : Four and a Half Lim domain 2

HH : Hedgehog

HIF-1 : Hypoxia-Inducible Factor 1

HTA : Hypertension Artérielle

HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cell

IC : Insuffisance Cardiaque

ICC : Insuffisance Cardiaque Chronique

ICFEp : Insuffisance Cardiaque à Fraction d'Ejection préservée

ICFEr : Insuffisance Cardiaque à Fraction d'Ejection réduite

IFN- γ : Interferon γ

IHH : Indian Hedgehog

IL-1 : Interleukin-1

IL-6 : interleukin 6

JAM : Junction Adhesion Molecule

MEC : Matrice Extracellulaire

MMP : Matrix metalloproteinase

NCX : Sodium-calcium exchanger

NG2 : Neural/Glial antigen 2

NOS : NO-synthase

PDGF-Rb : Platelet-derived growth factor receptor beta

PKA : Protéine Kinase A

PKG : Protéine Kinase G

SAP97 : Synapse-Associated Protein 97

SERCA2 : Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase

SGLT-2 : Sodium/Glucose cotransporteur 2

SHH : Sonic Hedgehog

SmMHC : Smooth muscle Myosin Heavy Chain

SMO : Smoothened

SRAA : Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone

TGF- β : Transforming Growth Factor- β

TIMPs : Tissue Inhibitor of MetalloProteinases 3

TNF- α : Tumor necrosis factor α

VD : Ventricule Droit

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VES : Volume d'Ejection Systolique

VG : Ventricule Gauche

VTD : Volume Télédiastolique du ventricule gauche

VTS : Volume Télésystolique du ventricule gauche

α -SMA : α Smooth Muscle Actin

Tables des matières

Remerciements	2
Liste des abréviations	5
Tables des matières	8
1. Introduction	14
1.1 Physiopathologie cardiaque	14
1.1.1 Description/Physiologie	14
1.1.1.1 Anatomie.....	14
1.1.1.2 Propriétés mécaniques du cœur	16
1.1.1.3 Propriétés électriques et conduction.....	17
1.1.1.4 Cycle cardiaque	19
1.1.1.5 Volumes et débit cardiaque	20
1.1.1.6 Méthodes d'étude de la structure et fonction cardiaque.....	21
1.1.2 L'insuffisance cardiaque chronique	25
1.1.2.1 Définition générale et épidémiologie.....	25
1.1.2.1 L'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite.....	28
1.1.2.1.1 Physiopathologie.....	29
1.1.2.1.2 Systèmes compensateurs	29
1.1.2.1.3 Remodelage cardiaque	31
1.1.2.1.4 Traitements.....	32
1.1.2.2 L'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée	33
1.1.2.2.1 Hémodynamiques	34
1.1.2.2.1 Facteurs de risque	35
1.1.2.2.2 Remodelage cardiaque	38
1.1.2.3 Paradigme.....	41
1.1.2.4 Traitements	43
1.2 Les vaisseaux.....	45
1.2.1 Structure générale/organisation	45
1.2.1.1 Les cellules endothéliales	47
1.2.1.1.1 Les cellules périvasculaires.....	48

1.2.1.1.2	La matrice extracellulaire des vaisseaux sanguins.....	49
1.2.2	Fonctions	49
1.2.2.1	Perméabilité	50
1.2.2.1.1	Les jonctions communicantes	51
1.2.2.1.2	Les jonctions serrées	51
1.2.2.1.3	Les jonctions adhérentes	52
1.2.2.2	Vasomotricité	52
1.2.2.2.1	Le monoxyde d'azote (\bullet NO)	53
1.2.2.3	Activation des cellules endothéliales	54
1.2.2.3.1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1)	55
1.2.2.3.2	Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1)	55
1.2.2.3.3	Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1)	55
1.2.2.3.4	Sélectine E.....	55
	Sélectine P.....	56
1.2.3	La dysfonction endothéliale	56
1.2.3.1	Généralités.....	56
1.2.3.2	La dysfonction endothéliale dans le diabète	57
1.2.3.3	La dysfonction endothéliale dans l'ICFEP	58
1.2.3.3.1	Le \bullet NO	58
1.2.3.3.2	Activation	59
1.2.3.3.3	Raréfaction microvasculaire	60
1.2.4	Résumé/Conclusion	61
1.3	Inflammation et IC	62
1.3.1	Les Monocytes/Macrophages.....	62
1.3.1.1	Généralités.....	62
1.3.1.2	Implication des macrophages dans le développement de maladies cardiovasculaires	64
1.3.2	Les mastocytes	65
1.3.2.1	Généralités.....	65
1.3.2.2	Activité des mastocytes.....	69

1.3.2.3	Fonctions effectrices des mastocytes.....	70
1.3.2.3.1	Les granules du mastocyte et la réponse dégranulatoire	70
1.3.2.3.2	Les dérivés des phospholipides membranaires, les lipides bioactifs	73
1.3.2.3.3	Les cytokines et chimiokines produites par les mastocytes.....	73
1.3.2.4	Implication des mastocytes dans le développement de maladies cardiovasculaires	73
1.4	La signalisation Hedgehog	76
1.4.1	Généralités.....	76
1.4.1.1	Structure des protéines Hh.....	76
1.4.1.1.1	Gènes et protéines Hh de mammifères.....	76
1.4.1.1.2	Modifications post-transcriptionnelles des protéines HH	77
1.4.1.2	Signalisation.....	78
1.4.1.2.1	La voie canonique.....	79
1.4.1.2.2	Les voies non canoniques.....	83
1.4.1.3	Rôle dans le développement.....	85
1.4.1.4	Rôle dans le cancer	85
1.4.1.4.1	Mutations de Ptch1	85
1.4.1.4.2	Surexpression des ligands Hh.....	86
1.4.1.4.3	Surexpression des facteurs de transcription Gli	87
1.4.1.5	Les modulateurs pharmacologiques de la voie Hh dans les essais cliniques	87
1.4.1.5.1	Antagonistes de la voie de signalisation Hh	87
1.4.1.5.2	Agonistes de la voie de signalisation Hh	88
1.4.2	Signalisation Hh et système vasculaire	88
1.4.2.1	Rôle dans le développement du système vasculaire	89
1.4.2.2	Rôle dans l'angiogenèse	89
1.4.2.3	Rôle dans le maintien de l'intégrité vasculaire.....	90
1.4.2.3.1	Maintien des jonctions inter cellules endothéliales	90
1.4.2.3.2	Régulation de l'Activation des CE	91
1.4.2.3.3	Régulation de la vasomotricité	91

1.4.2.4	Signalisation Hh dans les CE	91
1.5	ADAM17	92
1.5.1	Rôles physiologiques et pathologiques d'ADAM17.....	93
1.5.2	Structure et expression	95
1.5.3	Régulation d'ADAM17	96
1.5.3.1	Régulation de son expression	96
1.5.3.2	Régulation de son activité	97
1.5.3.2.1	La maturation d'ADAM17 par la furine	97
1.5.3.2.2	La phosphorylation.....	97
1.5.3.2.3	Interaction avec des protéines cytoplasmiques et localisation cellulaire	98
1.5.3.2.4	Régulation de l'activation d'ADAM17 par des inhibiteurs naturels	98
2.	Objectif de l'étude.....	100
3.	Matériels et Méthodes	101
3.1	Souris transgéniques.....	101
3.1.1	Souris diabétiques et obèses Leprdb/db.....	101
3.1.2	Souris Dhh ^{ECKO}	102
3.1.3	Hébergement	102
3.2	Thérapies	103
3.2.1	Cromoglycate de sodium.....	103
3.2.2	Cétirizine	103
3.3	Test de fatigue.....	103
3.3.1	Immunohistochimie	103
3.3.2	Aortes en face.....	104
3.4	Biologie cellulaire.....	104
3.4.1	Culture	104
3.4.2	Transfection siRNA	104
3.4.3	Transfection de plasmides.....	105
3.4.4	Co-immunoprécipitation/Western Blot	105
3.4.5	RTqPCR.....	105
3.4.6	Migration cellulaire	106
3.4.7	Prolifération cellulaire/survie.....	106

3.4.8	Perméabilité/ Transwell®	107
3.4.9	Séquençage aléatoire du transcriptome entier	107
3.5	Autres techniques.....	107
4.	Résultats	108
4.1	Les mastocytes déclenchent la maladie des microvaisseaux et la dysfonction diastolique dans les souris diabétiques et obèses.....	108
4.1.1	Travaux et résultats obtenus	108
4.1.1.1	La maladie des petits vaisseaux cardiaques est caractérisée par un profil pro-activation, pro-perméabilité et pro-inflammation chez les souris Lepr ^{db/db}	108
4.1.1.2	Les mastocytes participent au développement de la maladie des petits vaisseaux cardiaques chez les souris Lepr ^{db/db}	109
4.1.1.3	Conclusion	109
4.1.2	Manuscrit	111
4.2	Le rôle de la dysfonction endothéliale seule dans le développement de l'ICFep	165
4.2.1	Rationnel et résultats obtenus	165
4.2.1.1	Les souris Dhh ^{ECKO} présentent une dysfonction des microvaisseaux cardiaques.....	165
4.2.1.2	Le KO endothéliale de Dhh est suffisant pour induire une dysfonction diastolique.	171
4.2.1.3	Mécanismes ?.....	173
4.2.1.4	Conclusion	177
4.3	Les mécanismes impliqués dans le maintien de l'intégrité vasculaire dépendant de DHH.....	178
4.3.1	Rationnel et résultats obtenus.....	178
4.3.1.1	ADAM17 est un partenaire du récepteur Ptch1 et Dhh favorise sa dégradation.....	178
4.3.1.2	Dhh régule le maintien de l'intégrité vasculaire via ADAM17	180
4.3.1.3	Conclusion	181
4.4	Perspectives.....	182
4.4.1	Mastocytes et ICFep	182
4.4.1	Dysfonction endothéliale et ICFep	183
4.4.2	Hypertrophie cardiaque et ICFep	185

4.4.3	Signalisation Hh et maintien cellulaire	186
5.	Bibliographie	188
	Liste des publications & Prix.....	219
	Résumé.....	222

1.Introduction

1.1 Physiopathologie cardiaque

1.1.1 Description/Physiologie

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde selon l'Organisation Mondiale de la Santé avec plus de 17 millions de décès en 2015. Parmi eux, 7 millions sont attribués à une cardiopathie coronarienne et plus de 6 millions à un accident vasculaire cérébral. Les facteurs de risques comportementaux (tabagisme, mauvaise alimentation et obésité, sédentarité, ...) seraient à l'origine d'un pourcentage non négligeable de ces maladies cardiovasculaires qui pourraient ainsi être prévenues.

1.1.1.1 Anatomie

Le cœur est un organe musculaire situé dans le médiastin antérieur. Il est responsable, par l'intermédiaire de la circulation sanguine, de l'apport en oxygène et éléments nutritifs dans les tissus de l'organisme et assure l'élimination des déchets métaboliques.

Le cœur est un muscle strié composé de quatre cavités : deux oreillettes, l'oreillette droite et l'oreillette gauche situées à la base du cœur, séparées par le septum inter-auriculaire, et deux ventricules, le ventricule droit (VD) et le ventricule gauche (VG), situés à l'apex du cœur et séparés par le septum inter-ventriculaire (Figure 1). Le cœur d'un homme adulte pèse de 250 à 300 grammes. Le cœur est entouré par le péricarde, un sac à double paroi contenant le cœur et la racine des gros vaisseaux. Le péricarde est constitué de deux feuillets : le feuillet profond, appelé péricarde viscéral, et le feuillet superficiel, appelé péricarde pariétal.

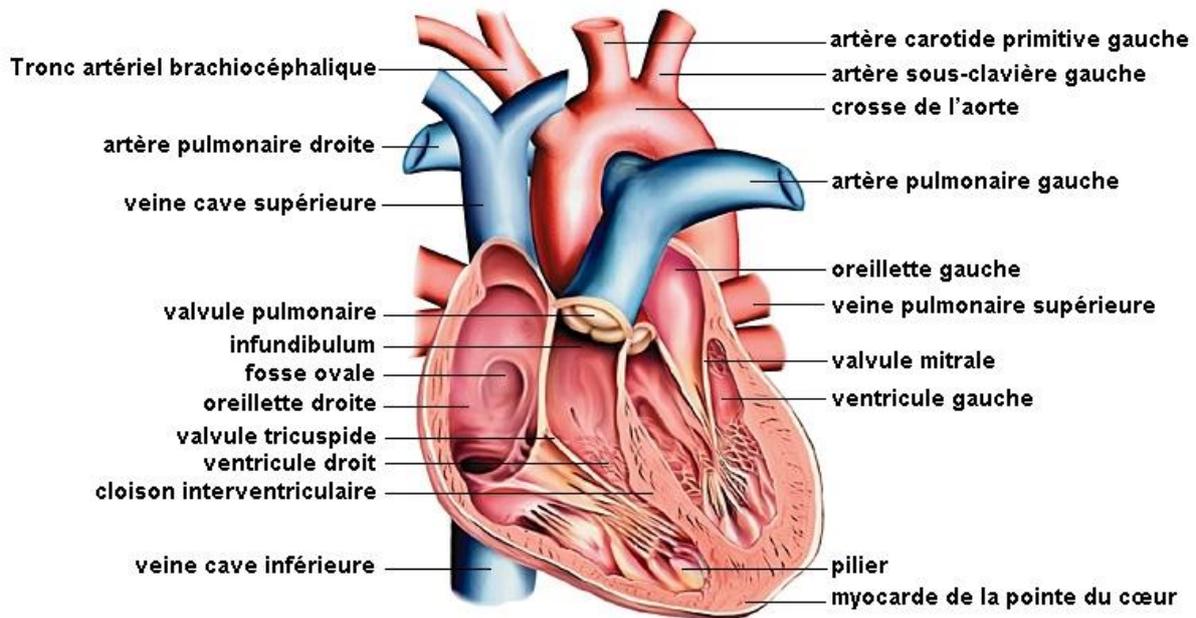


Figure 1. Schéma de cœur humain représentant les diverses cavités et vaisseaux (Dessin Michel Saemann - Archives Larousse).

Le cœur est formé de trois couches distinctes : une couche interne (l'endocarde), une couche médiane (le myocarde) et une couche externe (l'épicarde). L'endocarde est une membrane séreuse d'une épaisseur d'environ 100 µm tapissant l'intérieur des quatre cavités cardiaques. L'épicarde est la couche protectrice externe du cœur, avec une épaisseur semblable à l'endocarde. Le myocarde constitue l'essentiel de la paroi cardiaque et correspond au tissu fonctionnel de la paroi, responsable de la contraction musculaire.

La circulation sanguine se compose de la circulation systémique, qui relie le cœur aux organes, et de la circulation pulmonaire, qui relie le cœur aux poumons (Figure 2). Les artères et les veines de la circulation systémique transportent respectivement du sang riche et pauvre en dioxygène ; la circulation pulmonaire fonctionne en miroir de la circulation systémique. L'irrigation sanguine du myocarde est quant à elle assurée par la circulation coronarienne.

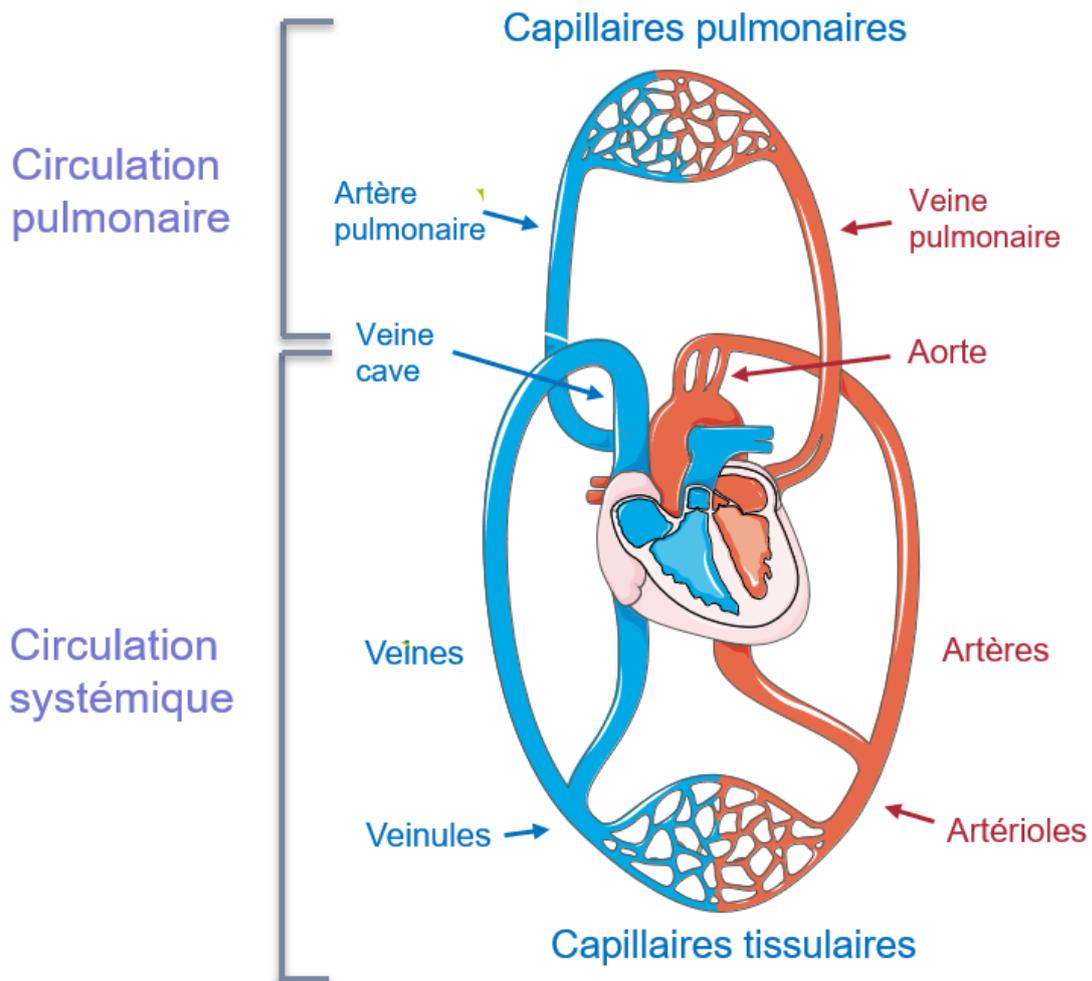


Figure 2. Représentation de la circulation systémique et la circulation pulmonaire (SMART Servier).

1.1.1.2 Propriétés mécaniques du cœur

Le sang veineux arrive par la veine cave supérieure et inférieure et entre dans l'oreillette droite qui communique avec le ventricule droit par le biais de la valve tricuspide. La contraction du ventricule droit permet l'éjection du sang veineux dans la circulation pulmonaire à travers la valve pulmonaire et l'artère pulmonaire. Le sang veineux pauvre en oxygène est ainsi envoyé vers les poumons où il se réapprovisionne en oxygène et se décharge du dioxyde de carbone.

Le sang oxygéné revient vers l'oreillette gauche par les quatre veines pulmonaires, puis il passe dans le ventricule gauche par l'intermédiaire de la valve mitrale. La contraction du ventricule gauche permet l'éjection de sang dans la circulation systémique via la valve aortique puis l'aorte.

1.1.1.3 Propriétés électriques et conduction

Le tissu cardiaque est doué d'automatisme qui dépend de cellules musculaires cardiaques particulières appelées cellules pacemaker. Ces cellules ont la propriété de produire une activité électrique répétitive spontanée et de la diffuser dans tout le myocarde. L'ensemble de ces cellules forment le tissu nodal, on parle ainsi de système nerveux intrinsèque du cœur (Figure 3).

Lors d'une activité cardiaque normale, la stimulation électrique du myocarde part du nœud sinusal de Keith et Flack qui est un amas de cellules situé dans la paroi atriale droite, dont la dépolarisation commande le rythme cardiaque normal dit rythme sinusal. Il est responsable d'une fréquence cardiaque entre 60 et 100 bpm (battements par minute) en situation normale. Son activité est influencée par les systèmes nerveux sympathique (accélération du rythme cardiaque) et parasympathique (ralentissement du rythme cardiaque).

L'influx électrique normal se propage ensuite à l'ensemble des oreillettes pour atteindre le nœud atrio-ventriculaire d'Aschoff-Tawara, situé à proximité de la valve tricuspide. Il agit à la fois comme ralentisseur de l'onde de dépolarisation du passage atrio-ventriculaire et comme relais de l'onde de dépolarisation vers les ventricules. Ce nœud est également régulé par les systèmes nerveux sympathique et parasympathique.

Enfin, l'influx électrique se propage aux ventricules par le faisceau de His ; les branches gauche et droite de Tawara et le réseau distal de Purkinje. Cet ensemble du tissu nodal est sous l'influence du seul système sympathique.

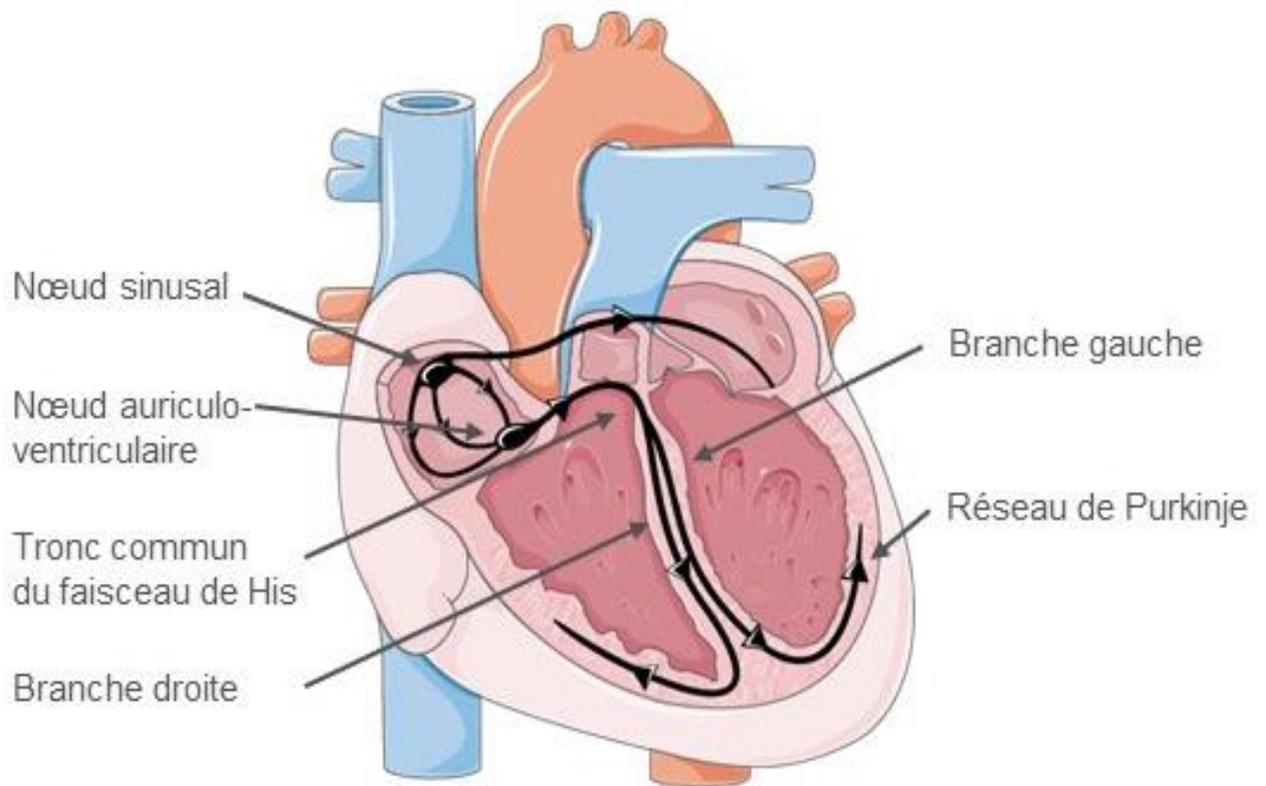


Figure 3. Le tissu nodal cardiaque (SMART Servier).

1.1.1.4 Cycle cardiaque

Le cycle cardiaque correspond à l'ensemble des évènements affectant le cœur entre deux systoles atriales consécutives. Elle se décompose en quatre temps :

- La contraction iso-volumique est le début de la systole ventriculaire, une phase de contraction du muscle cardiaque due aux cardiomyocytes contractiles. Le sang intraventriculaire est comprimé, la pression dans la cavité ventriculaire augmente rapidement (Figure 4, courbe verte) et dépasse la pression de l'oreillette (Figure 4, courbe violette). Cela ferme les valves auriculo-ventriculaires empêchant un reflux. Un certain temps est nécessaire pour que la pression intraventriculaire égale et dépasse la pression aortique et ouvre les valves sigmoïdes. Ainsi, au début de la systole ventriculaire, le volume sanguin du ventricule est emprisonné par la fermeture de la valve mitrale et ne peut être éjecté par l'aorte.
- L'éjection systolique débute dès que la pression ventriculaire dépasse la pression aortique ou pulmonaire, permettant l'ouverture des valves aortiques et pulmonaires et l'expulsion du sang hors des ventricules
- La relaxation isovolumétrique se passe juste après la fermeture des valves aortiques et pulmonaires, le sang reste dans le ventricule dans lequel la pression diminue rapidement mais reste trop élevée pendant quelques centièmes de seconde pour l'ouverture des valves auriculo-ventriculaires. Il s'agit du premier temps de diastole ventriculaire.
- Le remplissage ventriculaire est divisé en deux phases, une de remplissage rapide et une de remplissage lent. Une fois la pression intraventriculaire inférieure à la pression auriculaire, les valves atrio-ventriculaires s'ouvrent et le sang accumulé dans les oreillettes passe dans les ventricules. Le volume du ventricule augmente, rapidement, puis de plus en plus lentement jusqu'à la contraction auriculaire. Tout à la fin de la diastole ventriculaire, il y a la contraction auriculaire, donc la systole auriculaire. Du sang est alors brusquement déplacé de l'oreillette vers le ventricule, augmentant transitoirement la pression auriculo-ventriculaire.

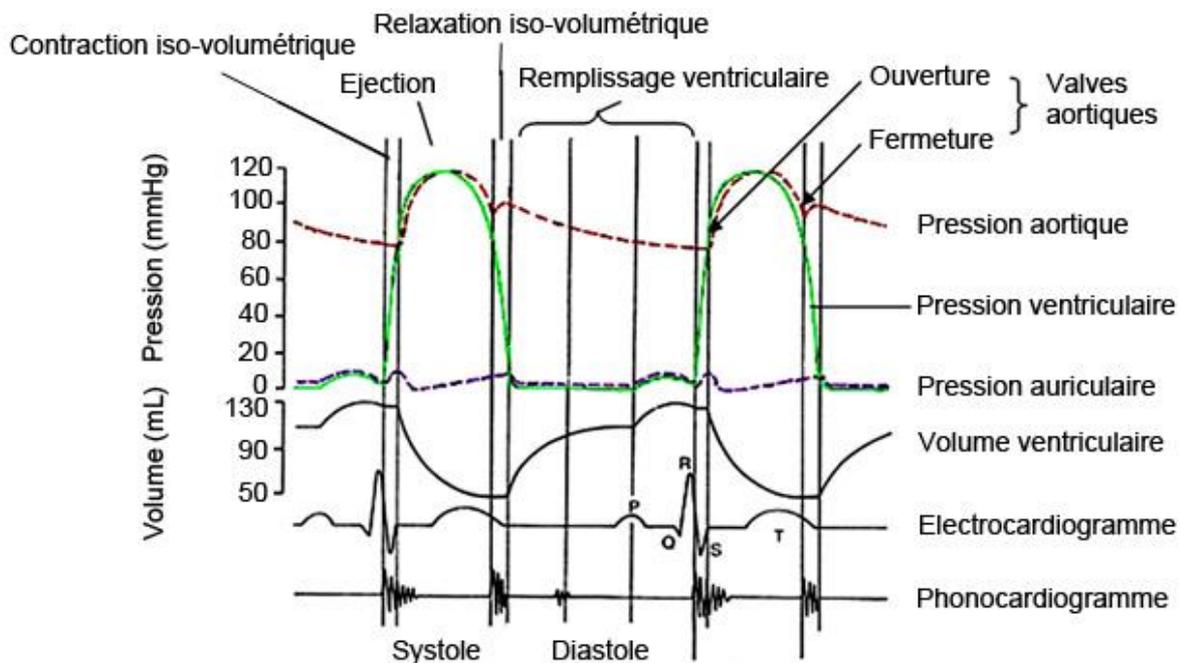


Figure 4. Schéma des courbes de pression aortique (rouge), ventriculaire (verte) et auriculaire (violette), de volume ventriculaire, de l'électrocardiogramme et du phonocardiogramme lors de la révolution cardiaque (Université médicale virtuelle francophone).

1.1.1.5 Volumes et débit cardiaque

Le volume contenu dans le ventricule gauche en fin de diastole correspond au volume télédiastolique du ventricule gauche (VTD) et sa valeur normale est comprise entre 70 et 100 ml/m² de surface corporelle. Le VTD correspond à la précharge.

Le volume contenu dans le ventricule gauche en fin de systole est appelé volume télésystolique du ventricule gauche (VTS) et sa valeur normale est comprise entre 25 et 35 ml/m². Ce volume dépend de la postcharge qui est l'opposition à l'écoulement de sang lorsqu'il est éjecté du ventricule et qu'il rencontre la masse sanguine présente dans les vaisseaux. Il s'agit de la pression systémique pour le ventricule gauche et la pression artérielle pulmonaire pour le ventricule droit.

Le volume d'éjection systolique (VES) représente la différence entre le VTD et le VTS. Il correspond au volume sanguin éjecté par le ventricule gauche à chaque battement cardiaque. En situation physiologique le VES est égal entre le ventricule gauche et le ventricule droit et sa valeur est comprise entre 50 et 65 ml/m² au repos. Le VES varie en fonction de la précharge et de la postcharge mais aussi de la contractilité.

La fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) qui est un indicateur de la fonction systolique du ventricule est définie par le rapport entre VTD et VES.

$$FE = \frac{VES}{VTD} = \frac{(VTD - VTS)}{VTD}$$

Le débit cardiaque, quantité de sang éjecté par chaque ventricule en une minute, correspond au produit du VES par la fréquence cardiaque. Sa valeur normale au repos est de 5 l.min⁻¹. La pression artérielle est finement régulée et définie comme le produit du débit cardiaque et de la résistance périphérique totale (représentant la friction du sang sur la paroi des vaisseaux systémiques situés loin du cœur).

L'index cardiaque correspond au débit cardiaque indexé sur la surface corporelle et sa valeur normale au repos est aux alentours de 3,5 l/mn/m².

Les dP/dt minimum et maximum représentent la vitesse de changement de pression minimale et maximale dans le ventricule gauche. Une amélioration de la contractilité se traduit ainsi par une élévation du dP/dt max lors de la contraction isovolumétrique. De même, une amélioration de la fonction diastolique, c'est-à-dire de la relaxation, induit une augmentation du dP/dt min lors de la relaxation isovolumique.

La constante de temps de relaxation Tau représente la détérioration exponentielle de la pression ventriculaire pendant la relaxation isovolumétrique. L'estimation de Tau est dépendante de la précision des mesures de pression ventriculaire. Selon la méthode Glantz, le calcul de Tau est le suivant :

$$P(t) = P_0 e^{\frac{-t}{\tau_E}} + P_\alpha$$

Où P est la pression au temps t, P₀ la constante d'amplitude, ^τE la constante de relaxation de Glantz, P_α l'asymptote non nulle due aux pressions pleurales et péricardiales.

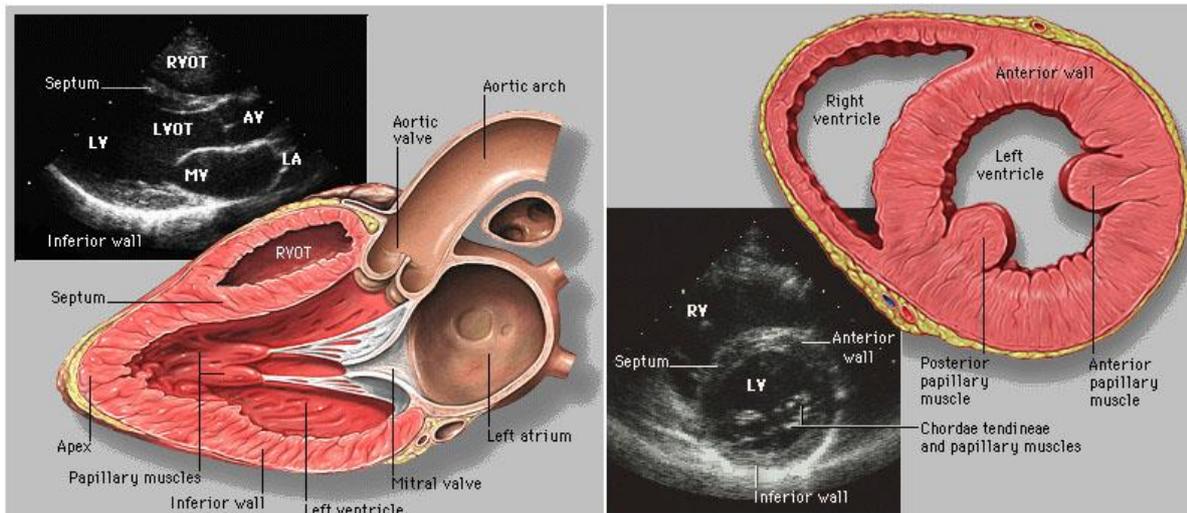
1.1.1.6 Méthodes d'étude de la structure et fonction cardiaque

L'étude de la structure et de la fonction cardiaque est permise par différentes techniques. En premier lieu, l'échocardiographie est une technique non invasive d'exploration morphologique et dynamique du cœur par les ultrasons. Plusieurs plans de coupe sont utilisés : le grand axe longitudinal, le petit axe longitudinal et l'axe apical (Figure 5 A-C). L'échocardiographie permet de mesurer, en diastole et en systole, l'épaisseur des parois, les

dimensions des cavités cardiaques et le volume du VG. Les parois mesurées sont le septum interventriculaire et la paroi postérieure du VG ; avec le diamètre interne des cavités, ces mesures permettent de mettre en évidence la présence d'une hypertrophie cardiaque (Oh, 2007).

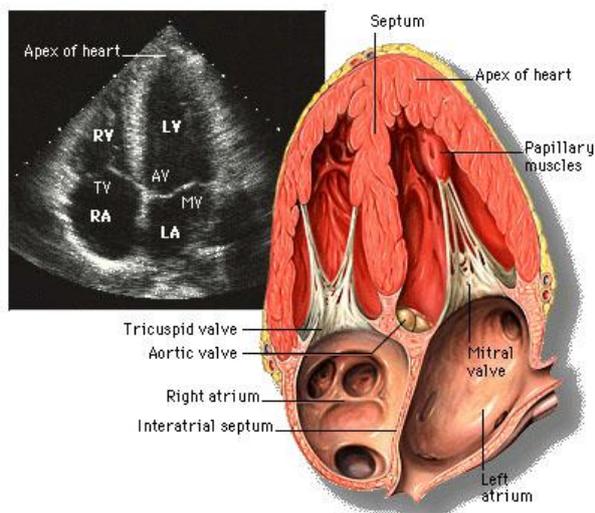
Une FEVG normale se situe entre 50 et 70%. Ainsi, une FEVG inférieure à 50%, appelée réduite, traduit un dysfonctionnement structurel ou fonctionnel cardiaque entraînant un défaut d'éjection du sang par le ventricule au cours de la systole. La FEVG est considérée comme l'indice de la fonction systolique globale et permet d'évaluer la sévérité d'une insuffisance cardiaque pour classer les patients.

L'échocardiographie-doppler mesure les vitesses des flux sanguins à travers les valves, notamment le flux mitral, ce qui permet l'étude des fonctions systoliques et diastoliques, la mesure du débit cardiaque et la mesure des pressions artérielles pulmonaires. Le flux doppler mitral fournit comme paramètres : la vitesse maximale de l'onde E (remplissage ventriculaire rapide) et de l'onde A (systole auriculaire), le temps de décélération de l'onde E (DT_E) et la durée de l'onde A (Figure 5 D). Il est alors possible d'établir le rapport E/A. En condition normale, le remplissage rapide du ventricule E est plus élevé que A et cela se traduit par un rapport E/A supérieur à 1. Un déséquilibre de ce rapport, avec une diminution de la vitesse de remplissage et de E par rapport à A, où E/A est inférieur à 1, peut traduire une dysfonction diastolique (Vignon, 2007). Cette technique permet donc d'évaluer de façon non invasive la fonction diastolique avec l'analyse du flux de remplissage mitral.

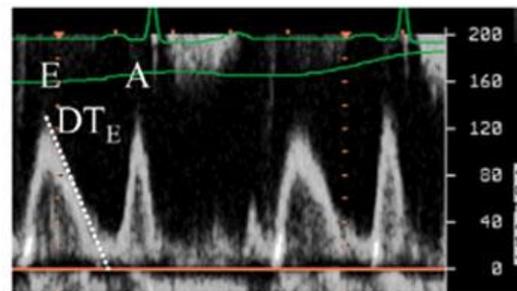


A Grand axe

B Petit axe



C Axe apical



D Doppler Mitral

Figure 5. Vues en échocardiographie d'un cœur sain sous différents plans de coupe, Patrick J. Lynch and C. Carl Jaffe (2006) (A-C). Profil Doppler mitral enregistré chez un patient en rythme sinusal, onde E, onde A et DT_E (Vignon, 2007)

La technique de référence pour l'évaluation des pressions intra-ventriculaires gauches est le cathétérisme cardiaque. Un cathéter branché sur un manomètre est introduit par une artère périphérique (fémorale, humérale ou radiale) et guidé jusque dans le VG (Figure 6).

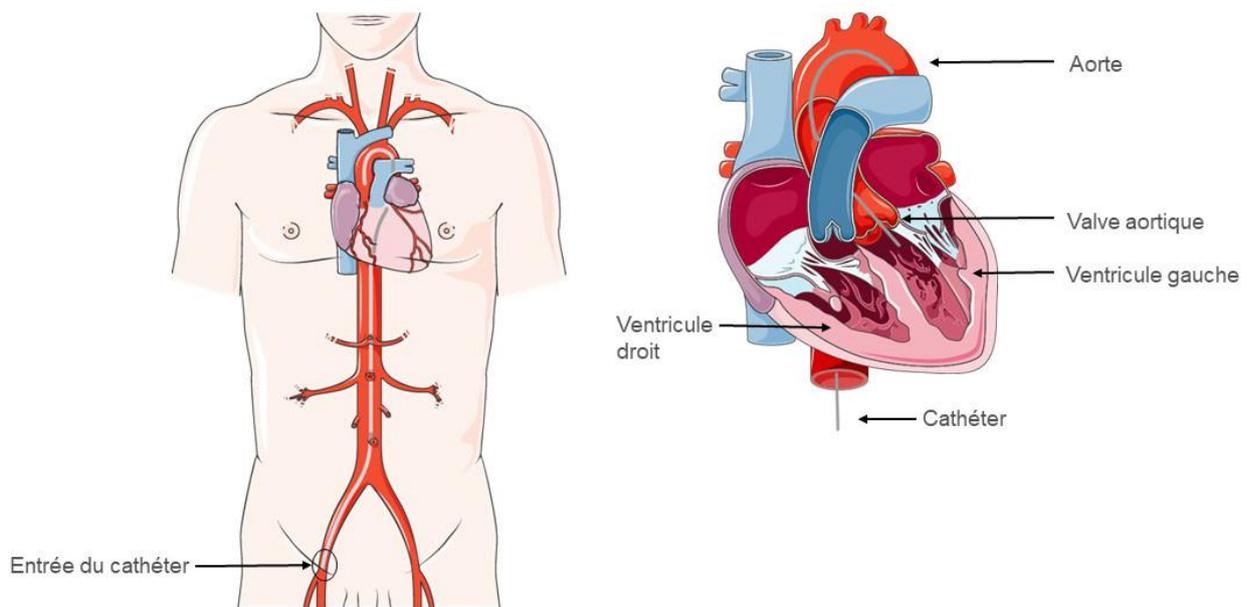


Figure 6. Schéma de cathétérisation du ventricule gauche chez l'homme (SMART Servier).

Cette méthode invasive permet l'obtention de différentes valeurs nécessaires à l'évaluation de la fonction cardiaque (Figure 7) :

- La pression télédiastolique
- La pression systolique (pic maximal)
- Le dP/dt minimum et maximum, il s'agit du taux de modification de pression. Pendant la contraction isovolumique, la pression augmente dramatiquement. Pour mesurer le taux de cette augmentation, un jet de régurgitation mitrale est nécessaire. Le temps pendant lequel la pression augmente et où le jet de régurgitation mitrale passe de 1 m/sec (4 mmHg) à 3 m/sec (36 mmHg) correspond au dP/dt . Ce changement de pression de 32 mmHg se produit avant l'ouverture de la valve aortique et de l'éjection du VG. La différence de pression est divisée par la différence de temps et donne le dP/dt . Le taux de dP/dt est une indication de la contractilité du VG.
- La constante de relaxation Tau est quantifiée par le taux de déclin de la pression, qui est exprimé par une constante estimée par des ajustements mathématiques.

Tous ces paramètres de la structure et de la fonction cardiaque sont essentiels à l'analyse et à la compréhension de la physiologie cardiaque et permettent de déterminer la présence d'une anomalie. L'utilisation de ces méthodes est essentielle au diagnostic de l'insuffisance cardiaque.

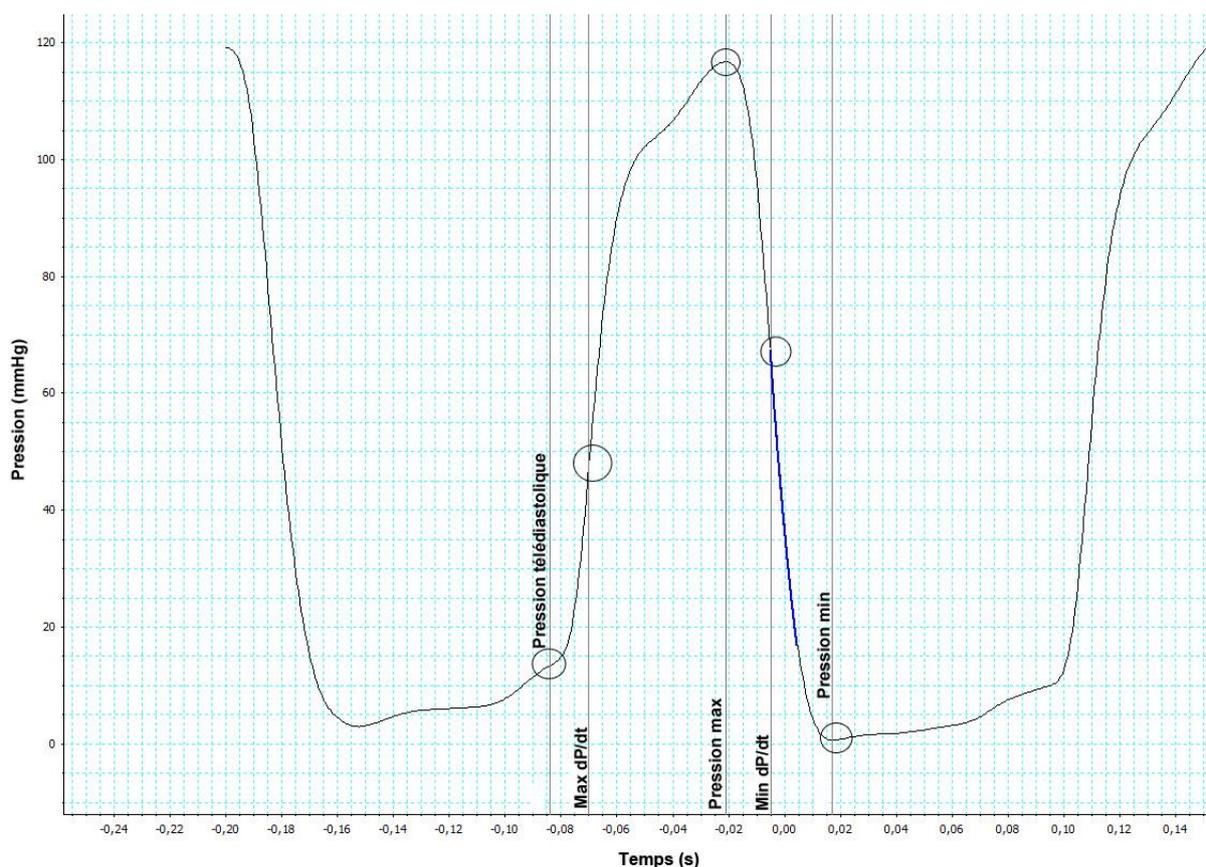


Figure 7. La courbe de pression et son analyse par le logiciel LabChart, la pression télédiastolique, la pression maximale et minimale, le dP/dt maximum et minimum sont entourés.

1.1.2 L'insuffisance cardiaque chronique

1.1.1.1 Définition générale et épidémiologie

L'insuffisance cardiaque (IC) est caractérisée par l'incapacité du cœur à assurer un débit sanguin suffisant pour répondre aux besoins de l'organisme. L'IC est la conséquence d'une altération structurale et/ou fonctionnelle du cœur qui peut toucher le VG, le VD ou les deux. L'IC peut apparaître brutalement et de façon transitoire, par exemple dans l'infarctus du myocarde ; on parle alors d'une IC Aigüe. L'IC chronique (ICC) désigne une situation pathologique permanente et irréversible.

L'ICC est un syndrome complexe et hétérogène dont l'incidence augmente avec le vieillissement de la population, l'amélioration du taux de survie des patients atteints de maladies cardiovasculaires (notamment d'infarctus du myocarde) (Lewis et al., 2003) et l'accroissement du nombre de personnes présentant des comorbidités telles que

l'hypertension artérielle (HTA), l'obésité ou le diabète (Khatibzadeh et al., 2013). L'ICC est responsable d'environ 70 000 morts en France chaque année et le taux de mortalité associé à l'ICC, cinq ans après son diagnostic, est de plus de 50% malgré l'amélioration de la prise en charge thérapeutique. En outre, l'ICC représente la première cause d'hospitalisation chez le sujet âgé et engendre une détérioration importante de la qualité de vie des patients. D'autre part, l'incidence de cette pathologie va augmenter dans les prochaines décennies dans le monde à cause du vieillissement de la population. En effet, l'ICC augmente avec l'âge puisqu'elle concerne 3% des sujets âgés de 60 ans contre un pourcentage supérieur à 10% des sujets âgés de plus de 75 ans.

Cette pathologie peut rester stable pendant plusieurs années bien qu'il s'agisse d'une maladie évolutive dont les quatre stades ont été décrits par deux associations américaines : la New York Heart Association (NYHA) et l'American College of Cardiology/American Heart Association (ACC/AHA). La NYHA propose une classification fonctionnelle basée sur le degré de troubles fonctionnels chez le patient (Dolgin and Committee, 1994), tandis que l'ACC/AHA reporte des stades d'IC selon l'atteinte structurelle et/ou fonctionnelle cardiaque (Tableau 1).

Tableau 1 : Classification fonctionnelle et grade de l'IC

NYHA classification fonctionnelle	ACC/AHA grades de l'IC
Degré de troubles fonctionnels chez le patient	Atteinte structurelle et/ou fonctionnelle cardiaque
<p>Classe I</p> <p>Pas de limitation physique. Ni dyspnée (essoufflement), ni fatigue lors des activités de la vie courante.</p>	<p>Stade A</p> <p>Haut risque de développer HF mais pas de d'atteinte fonctionnelle ou structurelle.</p>
<p>Classe II</p> <p>Légère limitation des capacités physiques. Sans symptômes au repos, une activité physique normale induit fatigue, dyspnée, des palpitations ou une angine de poitrine.</p>	<p>Stade B</p> <p>Altérations structurelles cardiaques dues au développement de l'IC sans symptômes.</p>
<p>Classe III</p> <p>Limitation évidente des capacités physiques. Sans symptômes au repos, un effort minime provoque les symptômes chez le patient.</p>	<p>Stade C</p> <p>IC symptomatique associée à des modifications structurelles cardiaques.</p>
<p>Classe IV</p> <p>Incapacité d'avoir une activité physique sans symptômes. Symptômes d'IC au repos, qui sont accrus par le moindre effort.</p>	<p>Stade D</p> <p>Modifications structurelles avancées et symptômes au repos en dépit d'une thérapie médicale.</p>

Les symptômes de l'IC sont souvent non-spécifiques (fatigue, intolérance à l'effort, dyspnée, ...) et ne permettent pas de discriminer entre l'IC et d'autres problèmes cardiovasculaires. Cependant la dyspnée, symptôme reconnu d'IC, reste l'une des manifestations les plus précoces de la maladie. Celle-ci est notamment décrite dans la classification de la NYHA. Le diagnostic d'IC chez le patient repose généralement sur le rapport entre l'échocardiographie et les signes cliniques observés (œdèmes des membres inférieurs, tachycardie ou râles).

D'autre part, les concentrations plasmatiques de BNP (Brain Natriuretic Peptide) et de son précurseur le NT-proBNP représentent des biomarqueurs de l'IC et constituent des outils diagnostiques pertinents. Néanmoins, cette mesure seule ne peut établir le diagnostic car différentes causes, cardiovasculaires ou non, sont associées à un taux plasmatique de BNP élevé. C'est pourquoi l'échocardiographie reste l'outil diagnostique le plus pertinent pour les patients suspectés d'IC puisqu'elle apporte des données immédiates sur la fonction systolique et diastolique ventriculaire, l'épaisseur des parois cardiaques et la fraction d'éjection. En fonction des critères échographiques, l'European Cardiology Society distingue depuis 2016 trois type d'IC (Ponikowski et al., 2016) sur la base de la FEVG, :

- IC à fraction d'éjection réduite (ICFER), où la FEVG est inférieure à 40% ;
- IC à fraction d'éjection préservée (ICFEp), où la FEVG est normale et supérieure ou égale 50% ;
- IC à fraction d'éjection intermédiaire (ICFEi), où la FEVG est comprise entre 40 et 49%.

De façon mécanistique, l'ICFER se caractérise par un défaut d'éjection de sang due à un problème de contractilité cardiaque (anomalie majoritairement de la systole) tandis que l'ICFEp est définie par une relaxation anormale du ventricule gauche (anomalie de la diastole) qui entraîne un défaut de son remplissage (Figure 8).

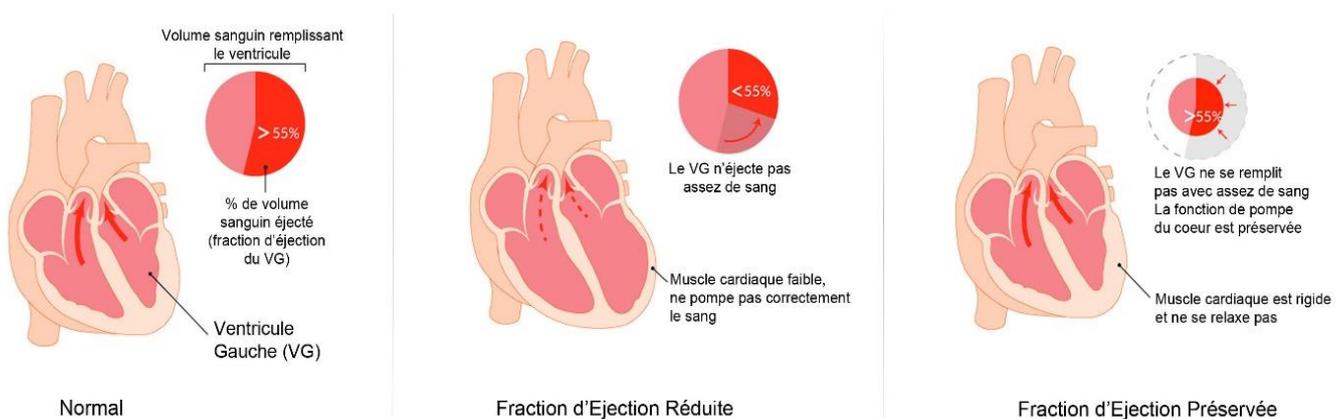


Figure 8. Schématisation d'une fonction cardiaque normale et altérée dans le cadre d'une ICFEr et ICFEp (Ted Rogers Centre for Heart Research).

1.1.2.1 L'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite

L'ICFER représente 50% des cas d'IC, elle est caractérisée par une FEVG inférieure à 40%. Bien qu'elle ait été longtemps appelée IC à dysfonction systolique, on retrouve également

une dysfonction diastolique dans cette pathologie. Les deux phénomènes apparaissent de façon concomitante, c'est à dire que la phase de relaxation/remplissage du VG ainsi que la phase de contraction/éjection sont altérées et le débit sanguin est diminué.

L'ICFER se développe après un évènement initial qui altère la fonction cardiaque, pour 50% des cas un infarctus du myocarde, mais elle peut également être la conséquence de cardiomyopathie, de HTA ou du diabète.

1.1.2.1.1 Physiopathologie

La physiopathologie de l'ICFER a été étudiée intensivement cependant elle reste complexe du fait d'altérations concomitantes de la fonction systolique et diastolique. Dans le cadre de l'ICFER, ces deux phases peuvent être altérées séparément ou simultanément. L'HTA induit une surcharge de pression qui affecte l'éjection du sang, alors qu'un infarctus du myocarde aura pour conséquences une perte de cardiomyocytes contractiles et donc une diminution de la contractilité cardiaque. Une surcharge chronique de volume due à une défaillance des valves aortiques peut également contribuer à la fatigue cardiaque et à l'apparition d'une ICFER.

1.1.2.1.2 Systèmes compensateurs

Un patient atteint d'ICFER présente un débit cardiaque diminué induisant une diminution de la pression artérielle. Par conséquent l'organisme met en œuvre des mécanismes de compensation afin de rétablir le débit cardiaque.

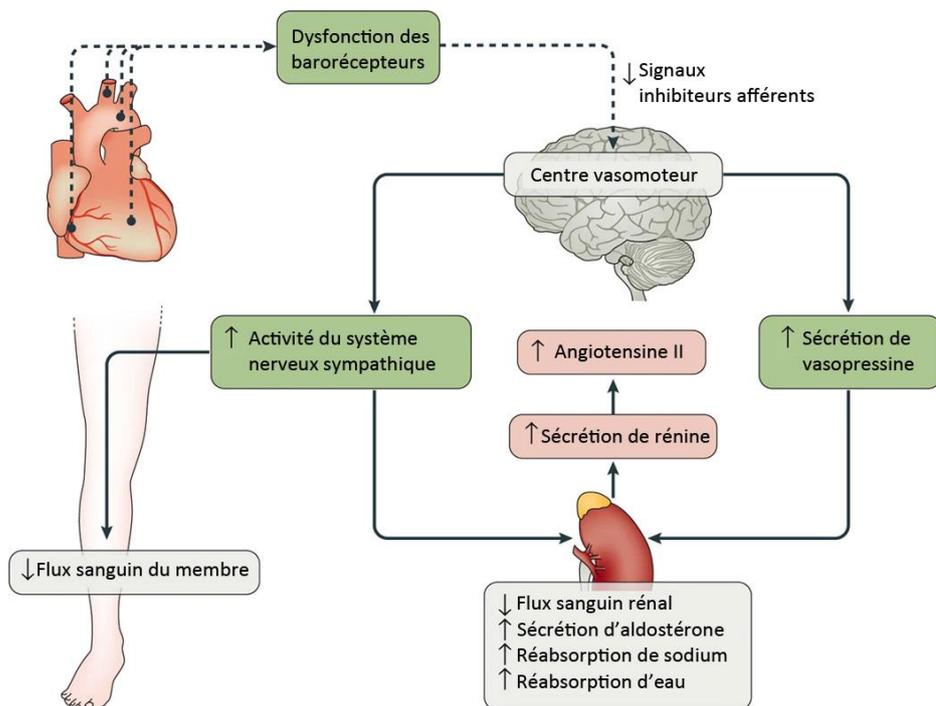
Les mécanismes compensateurs sont mis en place pour tenter de rétablir le débit cardiaque en visant la fréquence cardiaque, le volume d'éjection systolique, la pression artérielle et la résistance périphérique totale.

Le premier système activé est le système neurohormonal (Figure 9). Le système nerveux sympathique libère la noradrénaline et l'adrénaline qui ont une action directe sur le cœur en augmentant la fréquence cardiaque et la contractilité des cardiomyocytes. Cette libération de catécholamines a également une action périphérique : la vasoconstriction augmente le volume d'éjection systolique et la résistance périphérique totale. La pression artérielle est alors augmentée et par conséquent le débit cardiaque aussi. Cependant, sur le long terme l'activation du système sympathique est néfaste car une corrélation entre des taux élevés de noradrénaline et une forte mortalité chez les patients atteints d'ICFER a été établie (Cohn, 1995; Kinugawa et al., 2002).

L'activation adrénergique et la diminution de la pression artérielle à la périphérie entraînent une activation du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA). Les reins sécrètent la rénine qui clive l'angiotensinogène, peptide inactif produit par le foie présent dans la circulation sanguine, en angiotensine I qui sera convertie en angiotensine II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine. L'angiotensine II induit une vasoconstriction via son récepteur AT1 (type 1 angiotensin II receptor) ce qui augmente la résistance périphérique totale. L'angiotensine stimule la sécrétion de l'aldostérone qui va agir via le récepteur des minéralocorticoïdes afin de favoriser la réabsorption active de sodium et passive d'eau.

Les barorécepteurs présents dans la crosse aortique perçoivent la chute de pression artérielle et induisent une libération de vasopressine ou hormone anti-diurétique par l'hypothalamus qui augmente la volémie en réduisant le volume urinaire.

A l'inverse, des facteurs vasodilatateurs sont sécrétés comme les peptides natriurétiques ANP (Atrial Natriuretic Peptide) et BNP, produits respectivement par les oreillettes et les ventricules en réponse à l'étirement auriculaire ou ventriculaire. Ces peptides exercent un effet vasodilatateur en inhibant l'activation du SRAA.



Nature Reviews | Cardiology

Figure 9. L'activation des systèmes neurohormonaux dans l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite (Hartupée and Mann, 2017)

1.1.2.1.3 Remodelage cardiaque

Les mécanismes d'adaptation extrinsèques et intrinsèques, notamment l'activation des systèmes neuro-humoraux, destinés à maintenir un débit cardiaque, vont induire directement ou indirectement des altérations structurelles cardiaques. L'augmentation de la volémie entraîne une surcharge chronique de volume à laquelle le cœur doit s'adapter. Ainsi, il y a une augmentation des sarcomères en série augmentant la longueur des cardiomyocytes et donnant un patron d'hypertrophie ventriculaire excentrique (Figure 10) (Fukuta and Little, 2007; van Heerebeek Loek et al., 2006).

D'autre part, l'activation neurohormonale, l'aldostérone, l'endothéline et le TGF- β (Transforming growth factor- β) agissent au niveau génomique et induisent la prolifération et la transformation des fibroblastes en myofibroblastes qui synthétisent d'importante quantité de collagène. A cela s'ajoute des altérations de la dégradation et du cross-linking du collagène qui contribuent à la fibrose interstitielle cardiaque. Cela conduit à une rigidité du cœur qui va accentuer la défaillance cardiaque.

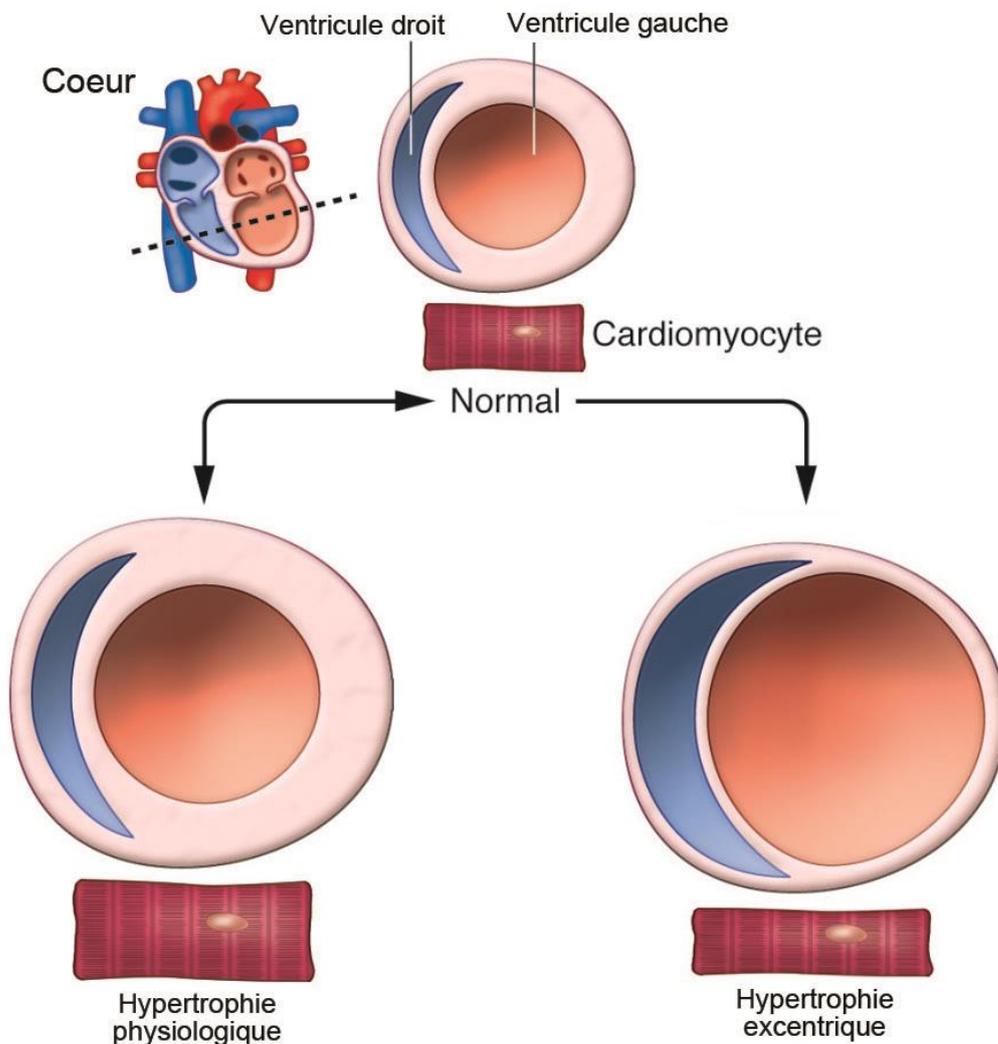


Figure 10. Remodelage cardiaque en hypertrophie excentrique avec un allongement des cardiomyocytes qui entraîne un affinement des parois du ventricule gauche et l'augmentation du diamètre interne du ventricule, comparée à un cœur normal et une hypertrophie physiologique (Berlo et al., 2013)

1.1.2.1.4 Traitements

Aujourd'hui, les traitements de l'ICFEr incluent différentes classes pharmacologiques agissant sur les mécanismes compensateurs qui ont un effet sur la résistance périphérique totale, la pression artérielle, la fréquence cardiaque, la rétention hydro sodée et (directement ou indirectement) sur le remodelage cardiaque.

Le SRAA est ciblé par des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, des antagonistes de l'angiotensine II ou des antagonistes du récepteur des minéralocorticoïdes. Cette inhibition diminue le tonus vasculaire, la pression artérielle et régule le bilan hydrique. Elle a également un effet indirect sur le remodelage cardiaque et est efficace pour réduire la

mortalité chez les patients atteints d'ICFEr. La combinaison d'un antagoniste de l'angiotensine II (le valsartan) avec un inhibiteur de la néprilysine, une endopeptidase neutre clivant le BNP et l'ANP (le sacubitril), va ralentir la dégradation du BNP et de l'ANP, augmentant la diurèse et natriurèse, ce qui améliore la relaxation cardiaque et empêche le remodelage cardiaque (McMurray et al., 2014).

Les bêta-bloquants peuvent être utilisés en complément des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine dans le cadre de l'ICC, pour favoriser la survie des patients. Cet effet est essentiellement lié au ralentissement de la fréquence cardiaque. Ce ralentissement est plus important lorsque l'IC est d'origine ischémique car il diminue la demande cardiaque en oxygène et augmente le temps de perfusion myocardique.

De plus, des traitements diurétiques permettent de soulager la rétention d'eau et d'alléger les symptômes de dyspnée sans pour autant avoir un impact réel sur la mortalité chez les patients ICFEr.

L'aspect électrique de l'insuffisance cardiaque et la désynchronisation de la contraction des ventricules peuvent également être pris en charge. La thérapie de resynchronisation et les défibrillateurs implantables permettent d'envoyer des impulsions électriques au cœur pour stimuler l'oreillette droite et les ventricules droit et gauche. Cependant, 20 à 30% des patients ne répondent pas favorablement au traitement (Sohaib et al., 2015).

Les traitements restent toutefois assez lourds pour les patients et provoquent de nombreux effets secondaires.

1.1.2.2 L'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

L'ICFEp englobe les patients atteints d'IC avec une fraction d'éjection préservée ou normale (>50%) et des pressions télédiastoliques augmentées. L'ICFEp représente 50% des cas de patients atteints d'IC avec un taux de mortalité équivalent à celui de l'ICFEr. Cependant, contrairement à l'ICFEr, il n'existe actuellement aucune thérapie efficace pour atténuer la morbidité dans cette maladie. Bien que les deux types d'IC présentent les mêmes symptômes cliniques (dyspnée, fatigue, ...), il s'agit de deux maladies distinctes avec des étiologies différentes. L'ICFEp apparaît chez une population plus âgée, majoritairement féminine (Tsutsui et al., 2010), et présentant de nombreuses comorbidités (notamment, l'HTA, le syndrome métabolique, le diabète de type II, l'obésité ou une maladie rénale) (Mentz et al., 2014). Prédominant chez les patients souffrants d'ICFEp, la Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est à la fois un facteur de risque précoce (Lam et al., 2011) et participe à l'évolution de la maladie (Ather et al., 2012).

Avec des comorbidités qui complexifient le diagnostic de la maladie, la physiopathologie de l'ICFEP est difficile à appréhender car les symptômes sont peu spécifiques et peuvent être retrouvés chez les sujets obèses. Les marqueurs plasmatiques comme le BNP ne sont donc pas fiables.

1.1.2.2.1 Hémodynamiques

La dysfonction diastolique est définie par une incapacité à remplir le ventricule avec le volume de précharge adéquat à des pressions basses (Borlaug and Kass, 2011). Cette dysfonction a pour conséquence une augmentation de la pression télédiastolique qui s'observe au repos ou pendant l'effort et induit de l'hypertension pulmonaire.

La fonction diastolique est déterminée par les propriétés élastiques passives et le processus de relaxation active du VG.

La relaxation passive ou propriétés élastiques passives du VG sont dépendantes des propriétés de protéines structurales cellulaires et extracellulaires. Jusqu'à présent, l'augmentation de la relaxation passive était décrite dans le cœur hypertrophié comme une conséquence du dépôt de collagène extracellulaire (Burlew and Weber, 2002). Cependant, il a récemment été démontré une association entre l'augmentation de la relaxation passive et des altérations de la protéine géante du cytosquelette titine décrites dans la partie 1.1.2.2.2 (Linke and Hamdani, 2014).

La relaxation active régule également le remplissage du ventricule. Elle est caractérisée par la recapture du calcium du cytoplasme dépendant de l'ATP (adenosine triphosphate). La recapture du calcium permet le détachement des ponts myosine pendant la diastole et est opérée par la SERCA2 (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase), qui recycle le calcium dans le réticulum sarcoplasmique, et du NCX (Sodium-calcium exchanger) qui extrude le calcium de la cellule. Une anomalie dans l'homéostasie calcique du cardiomyocyte impliquant des altérations pathologiques de l'activité de la SERCA2 et du NCX est un mécanisme de la dysfonction diastolique chez les patients atteints d'ICFEP. Une diminution de l'activité de la SERCA2 et/ou du NCX pourrait aussi diminuer la relaxation et causer une dysfonction diastolique.

Le remplissage du ventricule est déterminé par la rapidité de la relaxation active qui conditionne la vitesse de remplissage et par la compliance du ventricule. Une altération d'un ou des deux phénomènes cause un remplissage en début de diastole plus lent et un remplissage en fin de diastole accompagné d'une augmentation importante des pressions intra-auriculaires et intra-ventriculaires gauches (Zile et al., 2004).

De fait, la courbe de relation pression-volume télédiastolique se déplace vers le haut et sur la gauche comparée à une courbe enregistrée chez un sujet sain (Figure 11). Ces paramètres font qu'une légère augmentation du volume sanguin, du tonus veineux, de la rigidité artérielle, ou des trois peut être la cause d'une augmentation substantielle des pressions de l'oreillette gauche et des veines pulmonaires, entraînant des œdèmes pulmonaires.

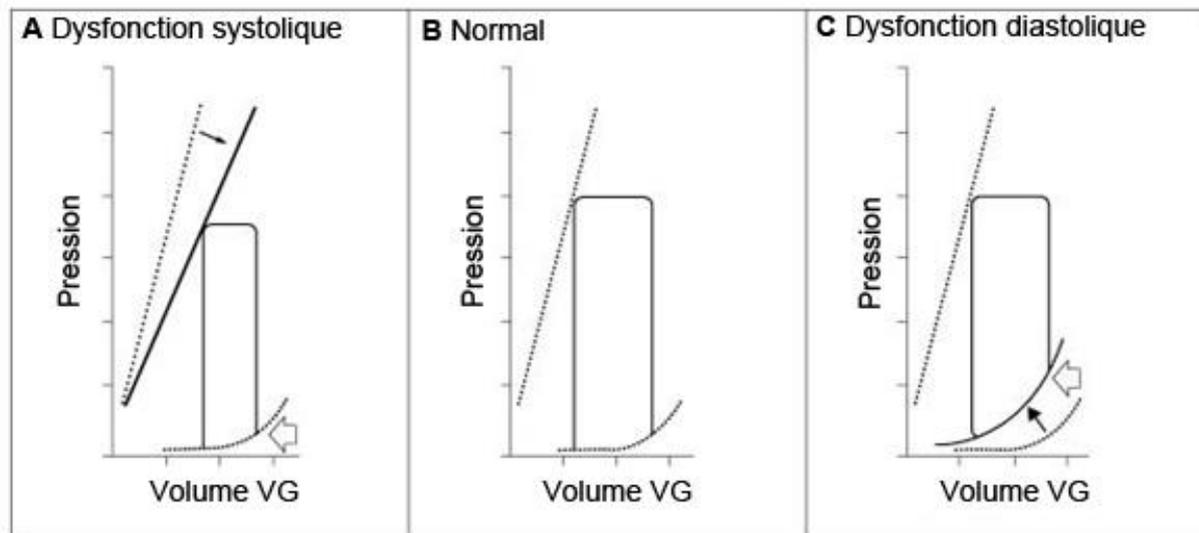


Figure 11. Courbe pression-volume télédiastolique en condition de dysfonction systolique (A), normale (B) et de dysfonction diastolique (C) (Aurigemma Gerard P. et al., 2006)

Dans les premiers stades de la maladie, le débit sanguin est maintenu au repos mais diminue fortement pendant l'effort. En effet, l'augmentation de la fréquence cardiaque diminue le temps de diastole ce qui compromet encore plus le remplissage du VG et entraîne une diminution du VES. Qui plus est, le myocarde n'étant perfusé qu'en période de diastole, un ralentissement de la relaxation et la diminution du temps de diastole perturbent cette perfusion (Phan et al., 2009).

1.1.2.2.1 Facteurs de risque

Différentes études suggèrent que les facteurs de risque associés à l'ICFEP ont un rôle prépondérant dans le développement de cette maladie. Les principaux facteurs de risque retrouvés sont l'obésité, le diabète, l'HTA, l'insuffisance rénale chronique et la BPCO.

1.1.2.2.1.1 Obésité

Le surpoids et l'obésité sont la cinquième cause de mortalité selon l'Organisation Mondiale de la Santé. L'obésité, qui concerne 17% des français, est considérée comme initiatrice de

nombreuses maladies comme le diabète, l'HTA et le syndrome métabolique. 80% des patients atteints d'ICFEP sont obèses ou en surpoids. Une corrélation entre l'index de masse corporelle et la dysfonction diastolique a d'ailleurs été établie récemment (Rozenbaum et al., 2019). De plus, un index de masse corporelle plus important et une résistance à l'insuline représentent des facteurs de risque plus élevés dans l'ICFEP comparé à l'ICFEr. D'autre part, une étude a montré que les patients obèses métaboliquement sains, c'est-à-dire ne souffrant ni de diabète, ni d'HTA, ni d'hyperlipidémie, présentent un risque plus élevé de développer une ICFEP comparés aux contrôles avec un IMC normal de 18.5-25 (Rozenbaum et al., 2019). L'obésité induit des changements hémodynamiques et bio-humoraux associés au remodelage fonctionnel et structurel qui aboutissent au développement de l'ICFEP. En effet, les patients obèses possèdent une accumulation excessive de tissu adipeux, associée à une augmentation du volume sanguin et à une diminution de la résistance vasculaire qui entraînent une élévation du débit cardiaque (ABEL et al., 2008; Wong and Marwick, 2007). L'obésité est accompagnée d'une inflammation chronique de bas grade caractérisée par la présence de lymphocytes et de macrophages. Elle est considérée comme un paramètre essentiel du syndrome métabolique et caractérisée par la sécrétion de différentes adipokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 (interleukin-6), le TNF- α (Tumor necrosis factor α) ou la CCL2 (chemokine (C-C motif) ligand 2) par le tissu adipeux.

1.1.2.2.1.2 Diabète

En France, plus de 3,3 millions de personnes sont traitées pharmacologiquement pour un diabète, soit 5 % de la population en 2016. Le diabète de type II se caractérise par un taux de sucre élevé dans le sang ou hyperglycémie qui n'est plus régulé par la sécrétion d'insuline, la principale hormone hypoglycémisante. Les tissus normalement répondeurs à l'insuline sont insulino-résistants et ne sont plus capable de métaboliser et d'utiliser le glucose correctement. Le diabète de type II est l'un des facteurs de risque commun dans l'ICFEP et contribue au mauvais pronostic de la maladie. Plus de 45% des patients atteints d'ICFEP ont un diabète de type II (Echouffo-Tcheugui et al., 2016), c'est pourquoi cette comorbidité semble très importante pour le développement de l'ICFEP. Les données d'échographies cardiaques relevées lors des essais cliniques RELAX (phosphodiesterase-5 inhibition to improve clinical status and exercise capacity in diastolic heart failure) et I-PRESERVE (Irbesartan in heart failure with PRESERVED systolic function) laissent penser que le diabète est associé à une dysfonction diastolique et une hypertrophie du ventricule gauche aggravées comparé aux patients non-diabétiques (Massie et al., 2008; Redfield et al., 2012). La perturbation métabolique et l'inflammation inhérente au diabète pourrait être la cause de l'évolution de l'ICFEP. En particulier, on observe une augmentation de l'utilisation

des acides gras libre par les cardiomyocytes et la production d'espèces réactives de l'oxygène qui en découle. De plus, il est reconnu que l'accumulation de tissu adipeux périphériques mais aussi dans l'épicaarde, plus importante chez les diabétiques, entraîne une augmentation de la libération de cytokines pro-inflammatoires. L'hyperglycémie par elle-même joue aussi un rôle majeur car elle accroît les glycations de protéines interstitielles pouvant créer des cross-links entre les fibres de collagène et augmenter ainsi la rigidité du ventricule cardiaque. Elle provoque également la création de protéines glyquées qui détériorent la fonction microvasculaire et diminuent la biodisponibilité du monoxyde d'azote ($\bullet\text{NO}$) (Dei Cas et al., 2015).

1.1.2.2.1.3 Hypertension artérielle

L'HTA est caractérisée par une pression artérielle moyenne anormalement élevée (une pression systolique ≥ 140 mmHg et/ou une pression diastolique ≥ 90 mmHg). Aujourd'hui, 30% des français souffrent d'HTA. Il s'agit d'un des facteurs de risque les plus communs chez les patients atteints d'ICFEP, 75% étant hypertendus (Lam et al., 2018).

Dans la plupart des cas d'HTA, la dysfonction diastolique du ventricule gauche est le premier signe clinique d'une cardiomyopathie. L'HTA induit une surcharge de pression s'opposant à l'éjection du sang qui a pour conséquence une augmentation du stress mécanique appliqué aux cardiomyocytes. Elle est associée à l'expression de neurohormones (système SRAA), qui ont pour conséquence une hypertrophie cardiaque. Ces modifications cardiaques peuvent au long terme aboutir à une ICFEP.

1.1.2.2.1.4 Insuffisance rénale chronique

L'insuffisance rénale chronique concerne environ 10% de la population française et se traduit par une destruction progressive et irréversible des néphrons rénaux, avec pour conséquence une diminution de la capacité de filtration des reins. Principalement connu pour son rôle de filtration des déchets métaboliques du sang, le rein est également essentiel pour maintenir l'homéostasie ionique en potassium, sodium et phosphore de l'organisme. De plus, il constitue un organe endocrine qui participe via le SRAA à la régulation de la pression artérielle. L'hypervolémie et la production d'hormones vasoactives par le rein via le SRAA agissent sur la pression artérielle en l'augmentant ce qui renforce le risque de développer une hypertension et de l'IC. L'insuffisance rénale se classe en cinq niveaux basés sur le débit de filtration glomérulaire (>60 mL/min/1.73 m²). Semblable à l'ICFEP, l'insuffisance rénale chronique est associée à de l'inflammation et de la dysfonction endothéliale. Cette dernière peut être due aux comorbidités associées telles que l'hypertension ou le diabète mais peut également être provoquée par des mécanismes spécifiquement rénaux. Ainsi,

l'association d'un problème rénal et cardiaque augmente le risque de développement d'une ICFEp (Smink et al., 2012). Il a été montré que le phénotype d'ICFEp associé à la dysfonction rénale chronique est distinct et corrélé à une augmentation de la gravité clinique (Shah et al., 2015).

1.1.2.2.1.5 Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)

La BPCO affecte principalement la fonction respiratoire avec environ 1,7 million de personnes atteintes en France dans les années 2000 ce qui correspond à 4,1% de la population. Les patients atteints de BPCO ont un risque élevé de développer des maladies cardiovasculaires, celles-ci étant la principale cause de décès chez ces patients. De plus, les femmes atteintes d'une BPCO auraient un risque plus élevé que les hommes de développer un problème cardiovasculaire. La BPCO et l'ICFEp présentent des symptômes cliniques similaires tels que la dyspnée, l'inflammation systémique, l'intolérance à l'effort et le déconditionnement musculaire, ainsi que des comorbidités communes. C'est pourquoi, diagnostiquer l'insuffisance cardiaque en présence de BPCO reste difficile car elle peut passer inaperçue. Chez les patients atteints de BPCO, la prévalence de l'insuffisance cardiaque serait de 20% à 30%, et 5% de la mortalité associée à la BPCO serait provoquée par de l'insuffisance cardiaque (Alter et al., 2018).

1.1.2.2.2 Remodelage cardiaque

Dans l'ICFEp, un remodelage cardiaque est observé et il est caractérisé par une hypertrophie du cœur et des cardiomyocytes qui montrent également des altérations de leur contractilité et de leur rigidité.

1.1.2.2.2.1 Cardiomyocytes

1.1.2.2.2.1.1 Hypertrophie

Une hypertrophie des cardiomyocytes est observée en réponse à une augmentation des pressions intra cavitaires. Suite à cette surcharge de pression, les sarcomères s'additionnent en parallèle ce qui conduit à des cardiomyocytes plus épais et une hypertrophie ventriculaire concentrique (Figure 12) (Gerdes and Capasso, 1995). On retrouve alors une augmentation de la synthèse protéique et des altérations de forme du cardiomyocyte sans modifier le nombre de cellules (Baker et al., 1992). D'autres part, la PKG (Protein Kinase G) joue le rôle de frein sur l'hypertrophie cardiaque dans différents modèles expérimentaux et cliniques (Calderone et al., 1998).

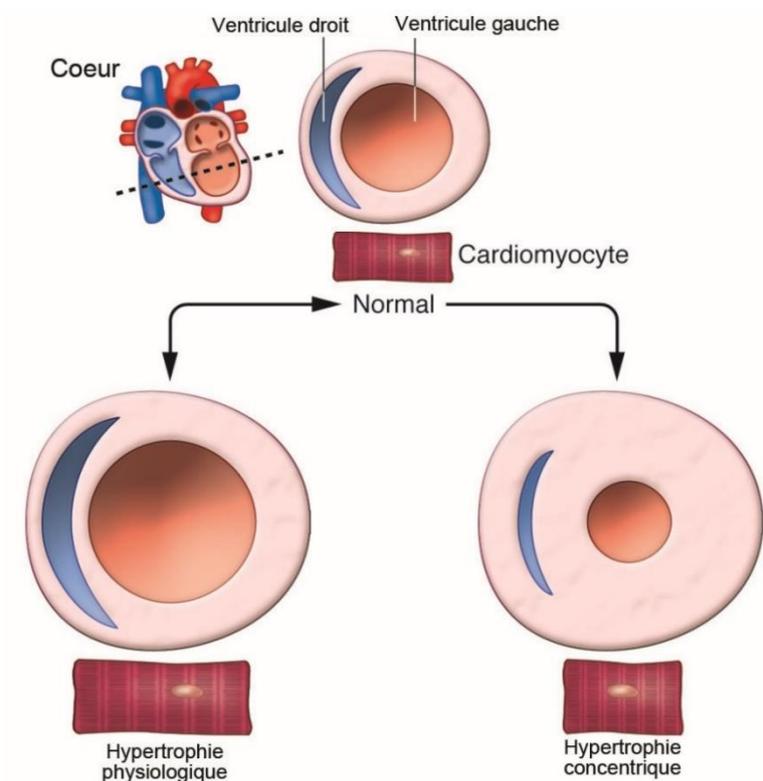


Figure 12. Remodelage cardiaque en hypertrophie concentrique comparée à un cœur normal et une hypertrophie physiologique (Berlo et al., 2013)

1.1.2.2.1.2 Homéostasie calcique (contractibilité)

L'altération de l'homéostasie calcique est impliquée dans le ralentissement de la relaxation myocytaire. La relaxation dépend du détachement des ponts actine/myosine par désensibilisation de la troponine C par le calcium ainsi que de la recapture de calcium par le réticulum sarcoplasmique. Cette désensibilisation est en partie gérée par la voie $\bullet\text{NO}/\text{GMPc}/\text{PKG}$. La diminution de la biodisponibilité en $\bullet\text{NO}$ entraîne une désensibilisation des fibres au calcium plus longue ce qui ralentit la relaxation. La recapture du calcium par le réticulum sarcoplasmique est dépendante de la pompe SERCA2 (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase) qui est inhibée par le phospholamban non phosphorylé (van der Velden, 2011). Ainsi, une diminution de l'expression de la SERCA2 et/ou un défaut de phosphorylation du phospholamban sont associés à la dysfonction diastolique (Kuster et al., 2010).

D'autre part, la relaxation est un processus actif consommateur d'oxygène et d'ATP. Un déficit en ATP conduit donc à un ralentissement de la relaxation cardiaque, comme cela a été montré chez des patients ICFEp (Phan et al., 2009; Smith et al., 2006).

1.1.2.2.1.3 Rigidité

D'autres mécanismes sont impliqués dans le ralentissement de la relaxation des cardiomyocytes. Parmi eux, on observe une augmentation de la rigidité intrinsèque du cardiomyocyte due à des modifications de la protéine géante du cytosquelette, la titine. Cette protéine existe sous deux isoformes, la N2B plus souple et la N2BA plus rigide. Chez l'homme (Borbély et al., 2009) et chez l'animal (Hamdani et al., 2013), il existe un défaut dans la phosphorylation de la titine par les PKA (Protein Kinase A) ou G qui augmente la rigidité de la titine et empêche la relaxation totale du sarcomère. Le stress oxydant participe également à l'augmentation de la rigidité des cardiomyocytes car il provoque la création de ponts disulfure au sein de la titine qui vont modifier sa conformation et la rendre plus rigide (Grützner et al., 2009).

1.1.2.2.2 Fibrose

La présence de fibrose interstitielle est observée chez les patients et a pour origine plusieurs facteurs. Une diminution de la dégradation du collagène par les MMPs (matrix metalloproteinases) est suspectée chez les patients ICFEp atteints d'hypertension artérielle puisqu'une diminution de l'expression des MMPs a en effet été observée (González et al., 2010), couplée à une augmentation des TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinase) (Ahmed et al., 2006).

Par ailleurs, l'infiltration de cellules inflammatoires dans le cœur de patients ICFEp (Kasner et al., 2011), de même que le stress oxydatif stimulent la production de TGF- β (Zhao et al., 2008), celui-ci favorise la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes qui produisent du collagène et expriment moins les MMPs.

1.1.2.2.3 Vaisseaux

Les vaisseaux sont également impactés dans l'ICFEp et leur phénotype modifié. On observe une surexpression de marqueurs circulants de l'activation endothéliale tels que la ICAM-1 soluble (Intercellular Adhesion Molecule 1) et la sélectine E soluble, chez les patients atteints d'ICFEp (Franssen et al., 2016a). Cela est associé avec une diminution de la densité capillaire. De plus, la vasodilatation médiée par le flux est altérée chez les patients atteints d'ICFEp (Kishimoto et al., 2017). Ces aspects indiquent la présence d'une dysfonction

endothéliale chez les patients atteints d'ICFEP. Celle-ci sera décrite plus amplement dans la partie 1.2.

1.1.2.2.4 Inflammation

L'inflammation systémique retrouvée chez les patients, avec une élévation des taux circulants de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-6 et TNF- α (Collier et al., 2011), est un facteur important de la pathologie. Chez l'homme, l'inflammation associée à l'ICFEP a été mise en évidence via des biomarqueurs sanguins et plusieurs études ont pu ainsi démontrer l'augmentation de l'infiltration de cellules inflammatoires CD3+, CD11+ et CD45+ (Westermann et al., 2011). Cependant, le rôle des différents acteurs de l'inflammation présent dans l'ICFEP n'est pas encore totalement élucidé. Les différents aspects de cette inflammation systémique seront étudiés dans la partie 1.3.

1.1.2.3 Paradigme

La controverse autour des critères de diagnostic, l'hétérogénéité clinique, la disponibilité limitée de tissus humains et l'absence de modèles animaux valides ont limité les efforts pour définir un paradigme pour la physiopathologie de l'ICFEP.

Considérant le pourcentage élevé de patients présentant de l'hypertension, l'hypertrophie pathologique et l'activation du SRAA ont été suggérées comme un paradigme possible de l'ICFEP (Figure 13 A). Cependant, la sévérité de l'hypertrophie n'ayant pas de corrélation avec le développement ou la sévérité de l'ICFEP et les antagonistes neurohormonaux vasodilatateurs ne modifiant pas significativement la progression de la maladie lorsqu'elle est déclarée (Shah et al., 2010), il est probable que d'autres facteurs interagissent avec ou sont plus importants que le remodelage cardiaque et l'activation du SRAA dans le développement de l'ICFEP.

D'autres auteurs ont suggéré que l'ICFEP serait l'aboutissement des effets individuels des différentes comorbidités associées sur le myocarde et la fonction vasculaire (De Keulenaer and Brutsaert, 2011; Packer, 2011; Shah and Gheorghide, 2008). En effet, la structure et la fonction cardiovasculaire sont plus altérées dans l'ICFEP que chez des personnes sans IC après ajustement des effets de comorbidités cumulées (Mohammed et al., 2012). Les conséquences médicales sont aggravées chez les patients ICFEP comparés aux patients sans IC avec les mêmes comorbidités (Campbell et al., 2012). Les mécanismes distinguant les patients ICFEP de patients de même âge aux comorbidités similaires restent peu clairs.

Une étude de 2013 établit un paradigme (Figure 13 B) selon lequel les différents facteurs de risque, notamment le diabète de type II, l'obésité et l'HTA, seraient précurseurs en induisant une inflammation systémique chez le patient. L'inflammation systémique serait à l'origine d'une dysfonction endothéliale, caractérisée par une activation de l'endothélium avec une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion, une diminution de la densité capillaire et une altération de la vasomotricité. Cette activation et les molécules d'adhésion permettraient le recrutement de leucocytes et leur diapédèse. Les leucocytes stimuleraient alors la transition des fibroblastes en myofibroblastes en sécrétant du TGF- β , et les myofibroblastes produiraient plus de collagène ce qui expliquerait la présence de fibrose dans le myocarde. L'altération de l'endothélium influencerait également sur la voie \bullet NO/PKG/GMPc ce qui aurait un impact sur la relaxation des cardiomyocytes et leur remodelage (Figure 13 B).

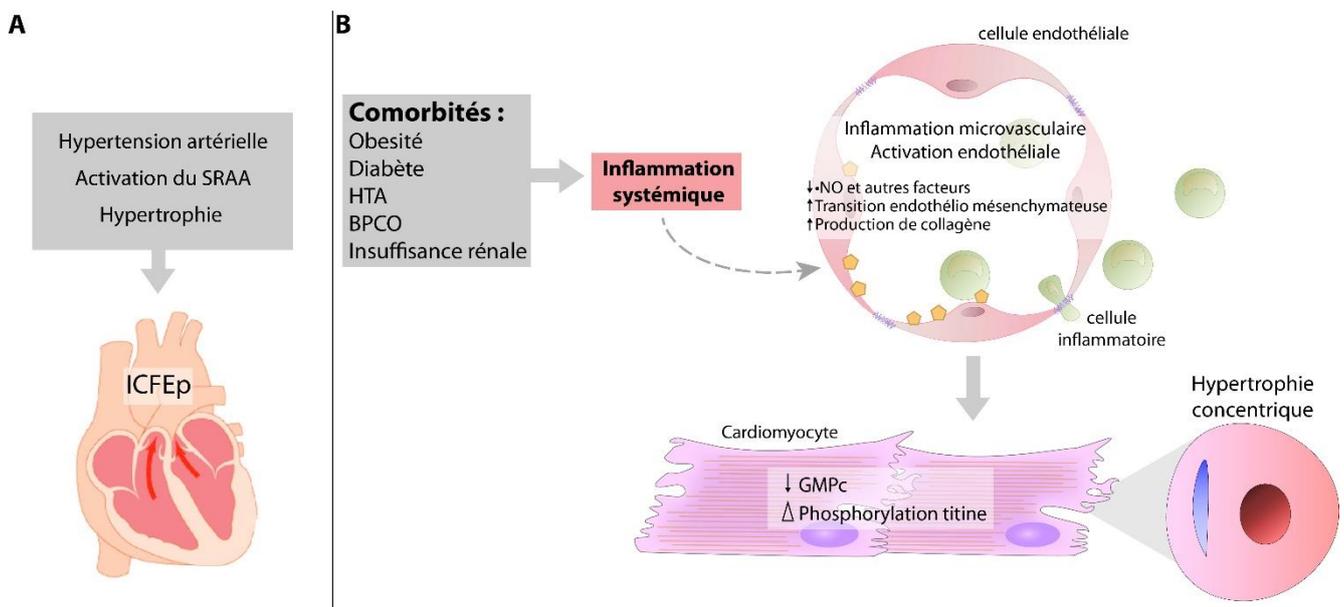


Figure 13. Schéma des deux paradigmes discutés pour l'ICFep. (Paulus and Tschöpe, 2013; Shah et al., 2010)

Toutes ces modifications aboutiraient à un remodelage cardiaque et contribueraient au développement de l'ICFep (Paulus and Tschöpe, 2013). Cependant les essais cliniques menés à partir de ces hypothèses ont donné des résultats négatifs ou mitigés (Shear, 2019). Il apparaît donc que les résultats accumulés jusqu'à aujourd'hui soient insuffisants pour établir un réel schéma du fonctionnement de la maladie et identifier des voies thérapeutiques.

1.1.2.4 Traitements

Actuellement, les traitements utilisés pour traiter l'ICFEp sont uniquement destinés à limiter les symptômes de l'IC, à empêcher l'apparition d'un infarctus du myocarde et à réduire les comorbidités. L'European Society of Cardiology de 2016 recommande, pour traiter l'ICFEp, de nombreuses classes thérapeutiques déjà utilisées pour l'ICFEr en modulant les associations, les doses et les niveaux de recommandations. L'essai clinique I-PRESERVE réalisé sur 4128 patients atteints d'ICFEp avait pour but de tester les effets à long terme de l'irbesartan, un antagoniste du récepteur à l'angiotensine II, sur l'hospitalisation et la mortalité pour raisons cardiovasculaires (Massie et al., 2008). Cependant, après 4 ans d'essai clinique, aucun effet bénéfique de l'irbesartan n'a pu être démontré. Les diurétiques sont fortement utilisés afin de stabiliser la pression artérielle et d'améliorer les symptômes chez ses patients en empêchant la rétention hydrosodée.

Une autre voie étudiée pour le traitement de l'ICFEp est la diminution de la fréquence cardiaque car cette diminution permet d'augmenter le temps de diastole, donc le remplissage du ventricule gauche et la perfusion myocardique ce qui limite l'ischémie et peut prévenir l'apparition de fibrillation auriculaire. C'est pourquoi les bêta-bloquants sont largement utilisés chez les patients atteints d'ICFEp, afin de réduire la pression artérielle en régulant l'excès de stimulation adrénergique, et faire régresser l'hypertrophie cardiaque. Il faut tout de même rester prudent car l'utilisation de bêta-bloquants ne semble efficace que pour une partie des patients atteints d'ICFEp. Chez des femmes atteintes d'ICFEp, il a été montré au contraire une augmentation des hospitalisations après utilisation de bêta-bloquants (Farasat et al., 2010). L'amélioration de la fonction vasculaire est une cible thérapeutique de l'ICFEp, notamment via des traitements qui cherchent à rétablir les taux de •NO et/ou de GMPc (guanosine monophosphate cyclique) actuellement en cours d'évaluation (Kanwar et al., 2016)

Le diabète de type II étant un facteur de risque de l'IC, les inhibiteurs du SGLT-2 (sodium/glucose cotransporteur 2), utilisés dans le traitement du diabète de type II, ont récemment été étudiés dans plusieurs essais cliniques à grande échelle pour les maladies cardiovasculaires. SGLT-2 est une protéine permettant la réabsorption du glucose par le tubule rénal proximal. EMPA-REG OUTCOME (Empagliflozin Cardiovascular Outcome Event Trial in Type 2 Diabetes Mellitus Patients) a été le premier essai clinique à étudier les effets de l'inhibiteur de SGLT-2 empagliflozin sur les symptômes cardiovasculaires associés au diabète de type II (Zinman et al., 2015). Cet essai a montré, chez 7020 patients atteints de diabète de type II, une diminution de la mortalité pour cause cardiovasculaire et d'hospitalisation pour IC.

Les résultats des essais cliniques actuels montrent également une efficacité de l'inhibition du SGLT-2 dans la prévention de l'apparition de l'IC, cependant il reste à déterminer s'il serait aussi efficace dans le traitement de l'IC. Les essais cliniques GISSI-HF (GISSI Heart Failure) et CORONA (Controlled Rosuvastatin Multinational Trial in Heart Failure) en sont la preuve : le rosuvastatin n'a pas montré de bénéfices chez les patients atteints d'ICC. De plus, en plus d'études mécanistiques suggèrent que l'inhibition de SGLT-2 pourrait être bénéfique dans le traitement de l'IC, avec ou sans diabète et sans tenir compte de la FEVG. Les inhibiteurs de SGLT-2 pourraient avoir des effets cardioprotecteurs via différents mécanismes dont l'amélioration des conditions de charge ventriculaire, secondaire à la diminution de la précharge (régulée par la natriurèse et la diurèse osmotique). Finalement, l'augmentation de sécrétion de glucagon pourrait potentiellement améliorer la performance cardiaque soit par l'augmentation de l'index cardiaque et de la disponibilité énergétique soit par la diminution de la résistance vasculaire périphérique.

1.2 Les vaisseaux

1.2.1 Structure générale/organisation

Le réseau vasculaire sanguin a pour rôle de distribuer le sang à travers le corps vers les différents organes. Au départ du cœur, les artères se ramifient en vaisseaux de plus petit calibre pour donner les artérioles. Le sang est ensuite pris en charge par les capillaires. Les veinules d'abord puis les veines collectent le sang qui a transité dans les tissus et convergent vers le cœur. Les artères et artérioles régulent les pressions et les capillaires assurent la diffusion des liquides et solutés à travers leur paroi. Ils permettent les échanges entre le sang et le liquide interstitiel assurant ainsi la collecte et l'apport en oxygène et nutriments à l'ensemble des organes ainsi que la récupération et leur élimination des déchets métaboliques et du CO₂. Les vaisseaux sanguins forment également des passerelles pour la surveillance immune.

La paroi des artères et des veines est constituée de trois tuniques (Figure 14) entourant la lumière vasculaire :

- L'intima : la tunique interne est composée d'une monocouche de cellules endothéliales reposant sur une lame basale et un tissu conjonctif lâche. Elle est en contact avec le sang.
- La média : La media est séparée de l'intima par la limitante élastique interne. Elle contient des cellules musculaires lisses et des fibres élastiques.
- L'adventice : tunique la plus externe, elle est séparée de la média par la limitante élastique externe. L'adventice est composée de tissu conjonctif et représente le lieu d'insertion des fibres nerveuses sympathiques et parasympathiques ainsi que des minuscules vaisseaux sanguins (*vasa-vasorum*) nourrissant l'artère

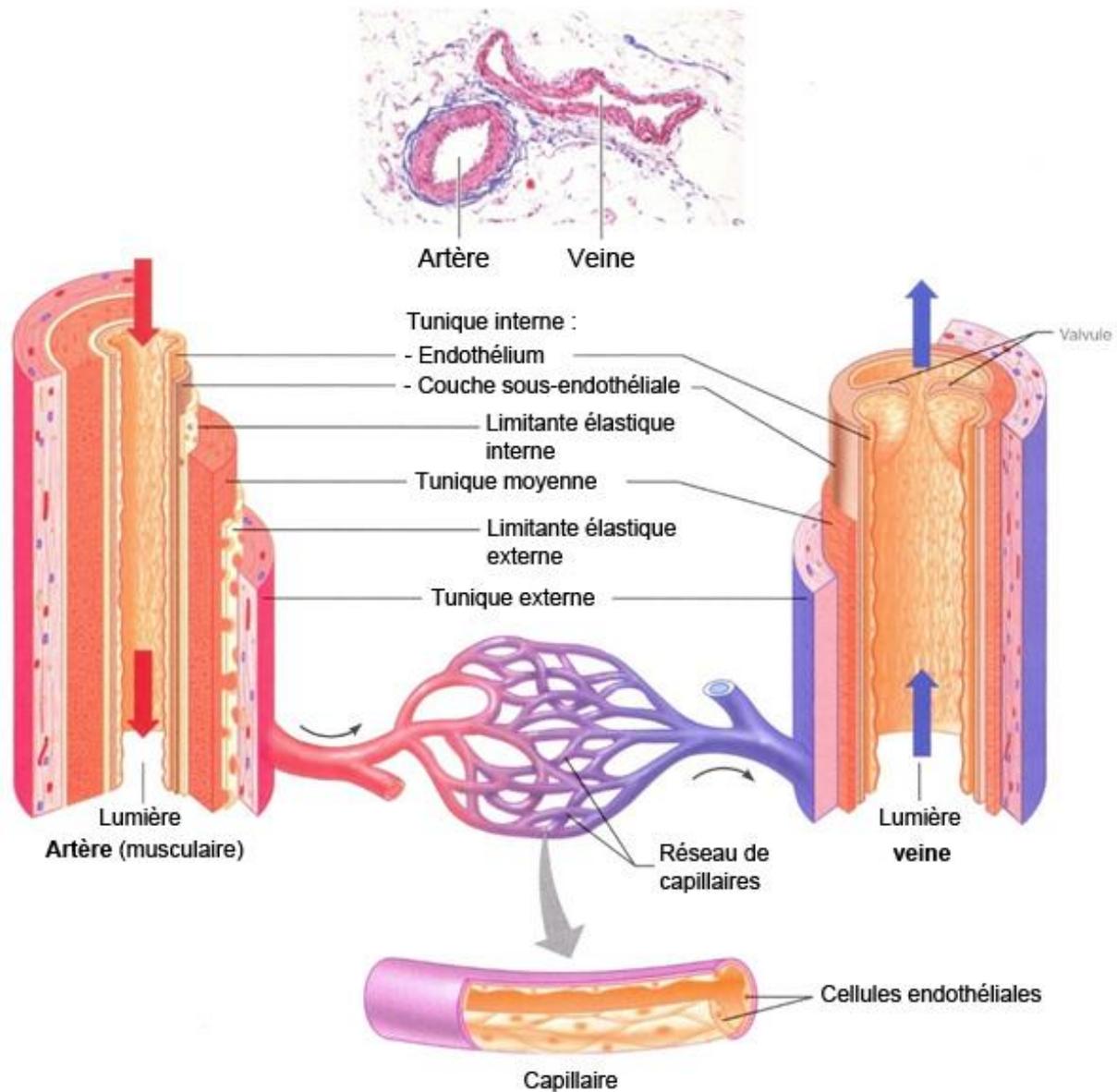


Figure 14. Les différentes tuniques des artères, veines et capillaires sanguins (Pearson Education, 2004).

Les capillaires ont une paroi, très mince, formée de cellules endothéliales reposant généralement sur une lame basale. Des péricytes partagent cette membrane basale dont ils contribuent à la synthèse (Armulik Annika et al., 2005). Ils peuvent soit recouvrir une partie du capillaire, soit l'entourer totalement (Gaengel Konstantin et al., 2009).

Le réseau vasculaire sanguin est le premier système de l'organisme à se développer du fait de son caractère indispensable. La formation des vaisseaux résulte d'un processus

complexe au cours du développement embryonnaire mais également dans les organismes adultes en conditions physiologiques, de réparation ou pathologiques. Les trois processus décrits dans la formation des vaisseaux sont la vasculogenèse, l'artériogenèse et l'angiogenèse. Nécessitant une régulation fine, ces trois processus font intervenir différents types cellulaires : des cellules souches et des cellules progénitrices ainsi que les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules inflammatoires, les fibroblastes, et de multiples composants de la matrice extracellulaire. La balance entre les facteurs anti- et pro-angiogéniques permet l'activation de ces processus.

1.2.1.1 Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales ont pour origine le feuillet mésodermique. Deux types de cellules précurseurs sont issues de ce feuillet : les hémangioblastes et les angioblastes qui expriment les marqueurs de cellules endothéliales PECAM1 (Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1), de cellules souches CD34 (cluster of différenciation 34) et du VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor 2). La formation du réseau vasculaire primitif au cours de la vasculogenèse embryonnaire est régulé par le VEGFA, son récepteur le VEGFR-2 et le FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2) qui favorisent la différenciation des angioblastes. L'activation du récepteur VEGFR-1 inhibe la différenciation des hémangioblastes en cellules endothéliales (Figure 15).

Les marqueurs qui caractérisent les cellules endothéliales sont CD31 (cluster of différenciation 31), CD34, CD105 (endogline), les récepteurs au VEGF (VEGFR-1 et -2), le facteur von Willebrand, l'enzyme de conversion de l'angiotensine, la Cdh5 (Cadherin-5 ou Vascular endothelial cadherin), et la Sélectine P.

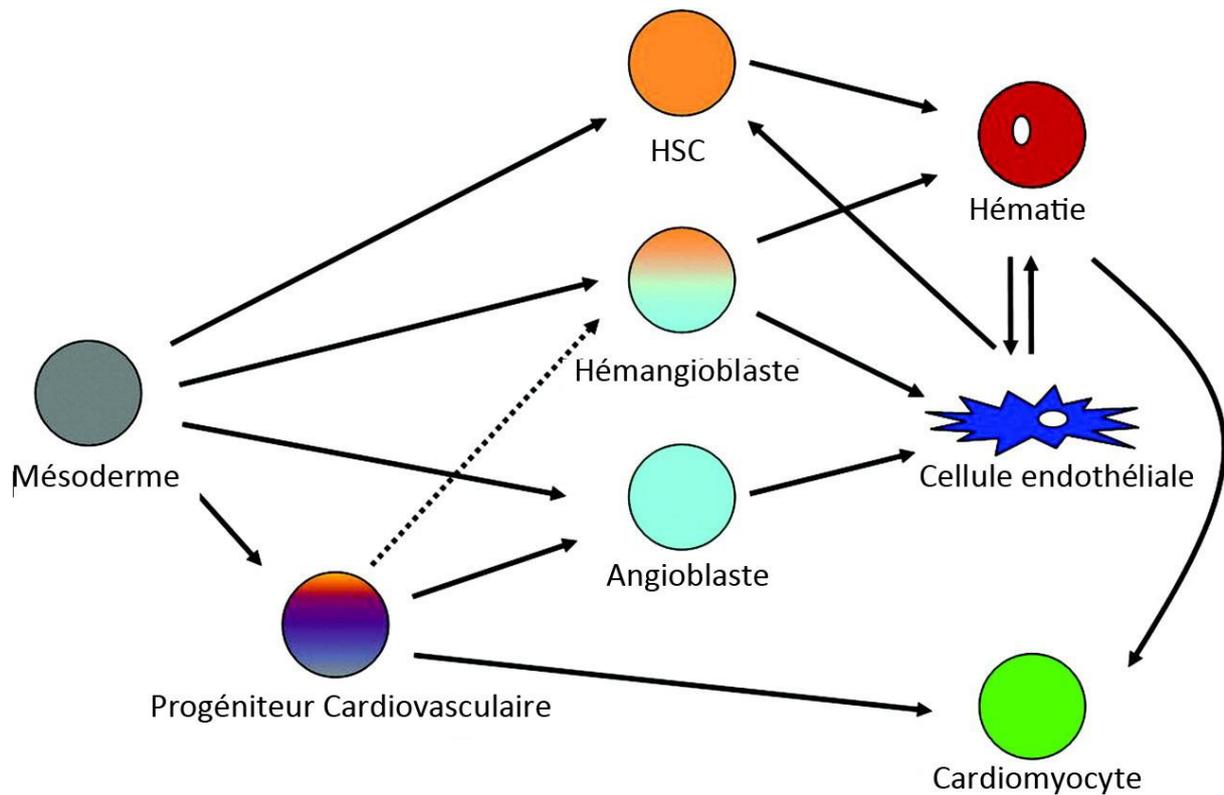


Figure 15. Origine de la lignée endothéliale et schéma de la vasculogénèse. (Jin Suk-Won and Patterson Cam, 2009)

1.2.1.1.1 Les cellules périvasculaires

Les cellules périvasculaires, également appelées cellules murales, peuvent être des péricytes ou des cellules musculaires lisses (CML). Elles entourent les vaisseaux sanguins et sont disposées sur la face externe des vaisseaux, la lame basale les séparant des cellules endothéliales. Tous les types de vaisseaux présentent des cellules murales, elles expriment les marqueurs NG2 (Neural/glia antigen 2), le PDGF-Rb (Platelet-derived growth factor receptor beta), la desmine et l' α -SMA (α smooth muscle actin). Les cellules murales sont importantes pour le développement et le maintien du réseau vasculaire, particulièrement la régulation de la perméabilité vasculaire.

- Les CML forment des couches concentriques autour de l'endothélium et constituent la media des artères, et veines.
- Les péricytes sont présents sur les vaisseaux de diamètre plus petit (artérioles, capillaires et veinules) et sont associés beaucoup plus étroitement avec l'endothélium. Des communications directes entre péricytes et endothélium peuvent être observées au niveau de certaines régions dépourvues de lame basale.

Les CML et les péricytes possèdent des fonctions différentes au niveau des vaisseaux. Ainsi, les CML réguleraient plutôt le tonus vasculaire et les péricytes la communication intercellulaire et l'échange de signaux entre les cellules endothéliales qu'ils recouvrent. Le taux de recouvrement des vaisseaux par les péricytes varie en fonction des organes concernés et reflètent leur besoin et fonction : par exemple, dans la rétine, où la perméabilité vasculaire est très finement régulée pour le maintien d'une barrière entre le sang et les photorécepteurs, le ratio péricyte/cellule endothéliale est de 1 :1 alors que dans le muscle squelettique le ratio péricyte/cellules endothéliales est de 1 :100. Les péricytes sont peu abondants dans les organes assurant des fonctions d'échange, de transport de nutriments ou de filtration comme les poumons, le placenta, les reins ou la peau. Au niveau de la microvasculature cardiaque, le ratio de péricytes semble être proche de celui présent au niveau du cerveau avec un ratio péricyte/cellule endothéliale estimé à 2 :1–3 :1. Avec environ $3,6 \times 10^7$ péricytes/cm³ au niveau du ventricule gauche, ils sont donc plus abondants que les myocytes en unité de volume (Nees et al., 2012). D'autre part, les péricytes peuvent avoir une activité contractile qui dépendrait des petites Rho GTPase et de leur expression de la α -SMA ou SmMHC (smooth muscle myosin heavy chain c), ce qui n'est cependant pas le cas des péricytes cardiaques (Armulik et al., 2011; Kolyada et al., 2003).

1.2.1.1.2 La matrice extracellulaire des vaisseaux sanguins

La matrice extracellulaire (MEC) est composée de macromolécules extracellulaires qui lient les cellules et les organisent en tissus. Les cellules synthétisent la MEC qui les entourent et déterminent son phénotype. La MEC cardiaque et des vaisseaux est un réseau hautement organisé, formé par la lame basale de l'endothélium et une matrice de 80 nm d'épaisseur permettant l'ancrage et l'interconnexion des différentes populations de cellules cardiaques. La MEC a d'abord été décrite comme un support tissulaire, mais elle est également capable d'agir en tant que régulateur de la communication inter-cellulaire en influençant la motilité, la survie et la prolifération cellulaire. La MEC régule également le flux sanguin durant la contraction cardiaque et son altération entraîne des maladies cardiovasculaires. L'homéostasie de la MEC repose sur la balance entre les MMPs et les TIMPs qui vont réguler la production des différentes molécules de la MEC. Elle est ainsi composée de collagènes IV et VIII, de laminines, de fibronectine, de protéoglycanes (perlecan), de glycosaminoglycanes (héparane sulfate) et de nidogène/entactine.

1.2.2 Fonctions

L'endothélium vasculaire est composé d'une seule couche de cellules qui tapissent l'intima de tous les vaisseaux. Longtemps considéré comme une couche inactive entre le sang et la

paroi des vaisseaux sanguins, l'endothélium est maintenant reconnu comme un organe à part entière jouant un rôle important dans le contrôle de nombreuses fonctions physiologiques comme l'angiogenèse, l'hémostase, la perméabilité, la vasomotricité, le remodelage vasculaire ainsi que l'inflammation en contribuant à la capture, l'adhésion et la diapédèse des leucocytes. Il répond à de nombreux stimuli physiologiques et pharmacologiques provenant de l'écoulement du sang (flux-dépendant) et de l'expression de facteurs neurohormonaux en synthétisant et libérant de nombreux facteurs impliqués dans ces processus.

1.2.2.1 Perméabilité

L'endothélium forme une barrière semi-perméable entre le sang et l'espace interstitiel. Cette barrière résulte de l'organisation des cellules endothéliales en monocouche liées entre elles par des jonctions qui contrôlent le passage des molécules et protéines. Les jonctions permettent une diffusion passive de molécules de taille inférieure à 3 nm tandis que les protéines à haut poids moléculaires comme l'albumine (67 kDa), qui représentent 75% des protéines plasmatiques, et les cellules sanguines sont retenues dans la circulation. Les trois acteurs principaux sont les : les jonctions communicantes, les jonctions serrées et les jonctions adhérentes (Figure 16). La disposition des jonctions est polarisée dans les cellules endothéliales : les jonctions serrées sont concentrées du côté apical (luminal) et les jonctions adhérentes du côté basal. Le passage au travers les cellules de plus grosses molécules se fait via des canaux trans-endothéliaux ou par transcytose, assuré par les cavéoles (Aird, 2007).

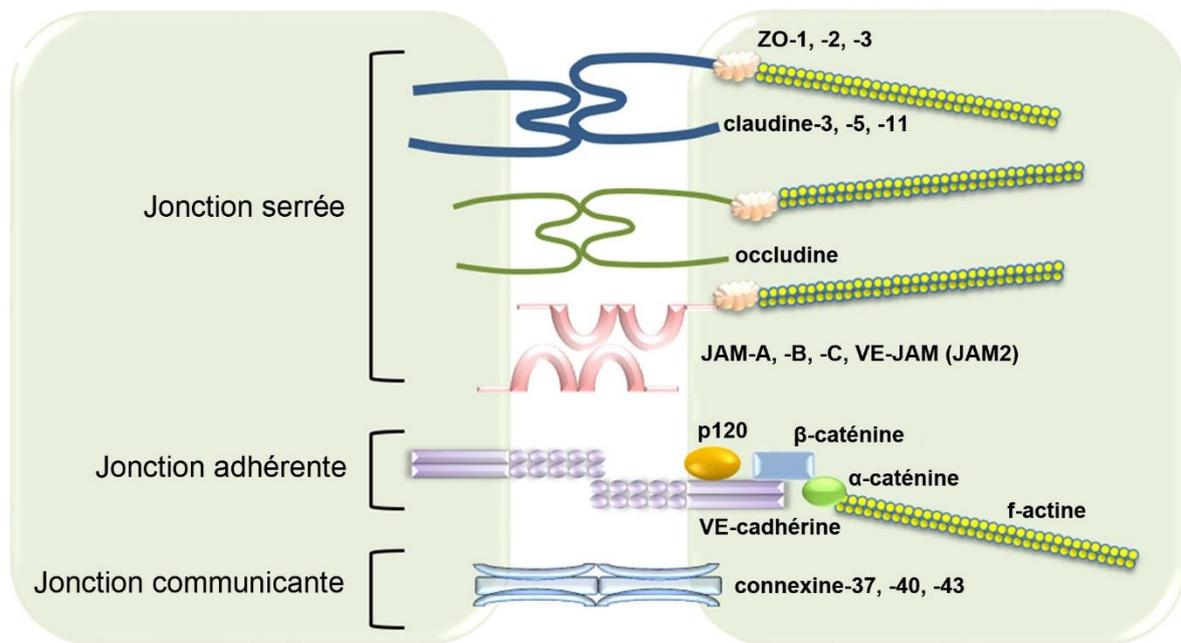


Figure 16. Les différentes jonctions composant l'interaction cellule-cellule de l'endothélium (Bazzoni and Dejana, 2004)

1.2.2.1.1 Les jonctions communicantes

Les jonctions communicantes permettent les échanges homocellulaires (cellules endothéliales entre elles) et hétérocellulaires des cellules endothéliales avec les cellules murales. Une jonction communicante fonctionnelle est composée de deux connexons, des hexamères de connexines, situés dans la membrane plasmique de cellules adjacentes (Hoh et al., 1993). Les isoformes de connexines majeures entre les cellules endothéliales du réseau sanguin sont la connexine-37, la connexine-40 et la connexine-43 (Hakim et al., 2008; Johnson and Nerem, 2007). En fonction de leur composition, les connexons possèdent des caractéristiques uniques concernant la conductance, la perméabilité et la communication. L'expression des connexines dans la paroi vasculaire n'est pas uniforme et varie selon la taille du vaisseau et de son type. Les jonctions communicantes permettent le passage intercellulaire des petites molécules (Bazzoni and Dejana, 2004) et sont essentielles à l'intégrité vasculaire. En effet, une délétion de connexines entraîne des malformations vasculaires importantes (Krattinger et al., 2007; Liao et al., 2001; Wagner et al., 2007; Wagner Charlotte et al., 2007).

1.2.2.1.2 Les jonctions serrées

Les jonctions serrées sont composées de protéines membranaires et cytosoliques. Les protéines membranaires sont les claudines, l'occludine et les JAM (jonction adhesion molecules). Les jonctions serrées sont liées au cytosquelette d'actine par les protéines ZO

(zonula occludens) ZO-1, ZO-2 et ZO-3, permettant l'ancrage des jonctions au cytosquelette de la cellule endothéliale (Itoh et al., 1999b, 1999a).

La composition, la structure et la présence des jonctions serrées varient selon les lits vasculaires (Baluk et al., 2007; Schneeberger, 1982; Simionescu et al., 1975, 1976). Les jonctions serrées sont ainsi plus fréquentes dans les artérioles que dans les veinules qui présentent une majorité de jonctions adhérentes. Les jonctions serrées au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE) sont extrêmement régulées et étanches afin d'éviter l'entrée de molécules et de cellules inflammatoires au niveau du système nerveux central (Rascher and Wolburg, 1997; Reese and Karnovsky, 1967).

1.2.2.1.3 Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes aussi appelées zona adherens jouent un rôle dans l'inhibition de contact, la transmigration leucocytaire et le passage des solutés depuis la circulation sanguine. La CDH5 est la protéine membranaire majoritaire des jonctions adhérentes et spécifique des cellules endothéliales (Lampugnani et al., 1995). La CDH5 est associée à l' α -caténine et la β -caténine qui permettent la connexion au cytosquelette d'actine (Lampugnani et al., 1995; Leach et al., 1993; Tamura et al., 1998). La CDH5 a un rôle primordial dans l'intégrité de l'endothélium notamment dans le cœur et les poumons (Corada et al., 1999). Cependant elle est dispensable dans d'autres organes comme le cerveau, les muscles et la peau suggérant une spécificité selon le type d'endothélium. De plus, la CDH5 régule certaines fonctions cellulaires comme la migration cellulaire ou l'inhibition de contact. Elle est également impliquée dans la réponse des cellules endothéliales au flux.

1.2.2.2 Vasomotricité

Le système nerveux et le système hormonal agissent sur les CML de façon directe ou indirecte via les cellules endothéliales et leurs récepteurs couplés aux protéines G pour réguler la vasomotricité des vaisseaux sanguins. Les cellules endothéliales sont activées par des stimuli chimiques (tel que l'acétylcholine, la sérotonine, l'ADP (adénosine disphosphate), la vasopressine, les catécholamines ou des médiateurs de l'inflammation) ou mécaniques (contraintes de cisaillement ou les forces induites par l'étirement des parois) (Furchgott and Zawadzki, 1980).

Après stimulation, les cellules endothéliales sécrètent des molécules vasodilatateurs ou vasoconstricteurs. Parmi les facteurs vasodilatateurs synthétisés, on distingue la PGI₂ (prostacycline), la bradykinine, le •NO et le EDHF (Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor), dont des dérivés de l'acide arachidonique, les acides eicosatriénoïques

particulièrement importants chez l'homme. Les facteurs vasoconstricteurs sont l'endothéline, les endopéroxydes, le TA2 (thromboxane A2), les anions superoxydes, l'angiotensine II et le PAF (Platelet-activating factor).

1.2.2.2.1 Le monoxyde d'azote (\bullet NO)

Le \bullet NO est un radical libre gazeux produit par les cellules endothéliales qui a une demi-vie de quelques secondes dans le sang et diffuse dans un rayon d'une centaine de micromètres autour du lieu de sa synthèse. Une grande partie du \bullet NO synthétisé par l'endothélium diffuse dans les CML où il va activer la guanylate cyclase. La guanylate cyclase dégrade le GTP (guanosine triphosphate) en GMPc ce qui induit l'activation de la PKG. La PKG agit sur différentes cibles cellulaires en les phosphorylant. Ainsi la phosphorylation du phospholamban lève son inhibition sur la SERCA2 ce qui facilite la recapture du calcium par le réticulum sarcoplasmique et induit la relaxation musculaire. Le \bullet NO agit aussi en inhibant la prolifération des CML et leur dédifférenciation qui participent au processus d'athérosclérose. Le \bullet NO diffuse également dans la lumière des vaisseaux sanguins où il a une action antithrombotique et anti-inflammatoire. Le \bullet NO permet ainsi une diminution d'expression des molécules d'adhésion au pôle apical des cellules endothéliales par l'inhibition de NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) ce qui limite l'adhésion des leucocytes à leur surface et inhibe l'agrégation plaquettaire (Liao, 2013).

Le \bullet NO est synthétisé au sein des cellules endothéliales à partir de la L-arginine grâce à une enzyme homodimérique, la NOS (NO-synthase), qui permet son oxydation en \bullet NO et L-citruline. Les monomères de NOS disposent d'un domaine réductase permettant la fixation des cofacteurs de la réaction : la FAD (flavin adenine dinucleotide), la FMN (flavin mononucleotide), le NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) et d'un domaine oxygénase composé de l'hème, de la BH4 (tetrahydrobiopterin) et permettant la fixation de la calmoduline et de la L-Arginine.

La NOS est présente dans tout le tissu cardiovasculaire, au sein de la cellule elle est essentiellement au niveau de l'appareil de Golgi et dans les cavéoles, liée à la cavéoline-1.

Les trois isoformes de NOS ayant 50 à 60% d'homologie ont été découvertes :

- La NOS_n (neuronale) : permet la production de \bullet NO dans les terminaisons axonales non adrénérgiques et non cholinérgiques du système nerveux autonome.
- La NOS_i (inductible) : est exprimée sous le contrôle de nombreuses cytokines pro-inflammatoires ou d'agents pathogènes.

- La NOSe (endothéliale) : est exprimée dans l'endothélium de manière constitutive. Elle est essentielle pour garantir les propriétés de l'endothélium et la fonction vasculaire.

Les NOSn et NOSe sont constitutivement exprimées et nécessitent une activation par des stimuli physiques ou chimiques, Elles sont responsables de la production d'une faible quantité de •NO. Leur activation est dépendante de la concentration en calcium et se fait via la liaison de seconds messagers tel que l'IP3 (inositol triphosphate 3) et le DAG (diacylglycérol) à un récepteur membranaire ou via une manière alternative avec les ionophores calciques. A l'inverse, la NOSi est peu ou pas exprimée en condition de repos et est induite par des cytokines pro-inflammatoires notamment le TNF- α , l'IL-1 (interleukin-1) et l'IFN- γ (interferon γ). Lorsqu'elle est exprimée, elle forme des homodimères et produit une forte quantité de •NO.

1.2.2.3 Activation des cellules endothéliales

L'activation de l'endothélium correspond à un stade durant lequel ses propriétés sont modifiées, il perd son caractère anticoagulant et favorise le recrutement de cellules inflammatoires. Cette activation de l'endothélium est induite par différents stimuli comme une modification des forces de cisaillement, les cytokines pro-inflammatoires et les protéines glyquées (AGEs ou advanced glycation end-products) (Liao, 2013).

En réponse à ces stimuli, les cellules endothéliales expriment à leur surface des molécules d'adhésion des cellules inflammatoires circulantes : sélectine E, ICAM-1 et VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) (Adams and Shaw, 1994). En cas de réponse aigue, ces protéines, présentes dans la cellule, sont mobilisées et localisées à la membrane. La réponse chronique et le maintien de l'activation sont obtenus par la transcription et la surexpression de ces gènes. Dans les processus immunitaires et d'inflammation, cette expression de protéines d'adhésion est importante pour une réponse rapide du tissu touché. La cascade d'adhésion des leucocytes se compose de plusieurs étapes : le roulis, l'adhérence, et la transmigration. En réponse à un stimulus inflammatoire, tel que le TNF- α , les cellules endothéliales produisent plus fortement les sélectines qui sont des protéines transmembranaires et des intégrines appartenant notamment à la famille β 2. Les sélectines sont exprimées à la fois par les cellules endothéliales et les leucocytes et sont impliquées dans les processus d'inflammation aigue et chronique. Les intégrines sont les récepteurs principaux de l'interaction cellule-matrice et participent activement à l'interaction cellule-cellule ce qui leur confère un rôle central dans les processus immunitaires et le maintien de l'intégrité vasculaire (Waitkus et al., 2014).

1.2.2.3.1 Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1)

VCAM-1 est une protéine de surface exprimée par les cellules endothéliales, les lymphocytes et les CML. Elle est impliquée dans l'adhésion intercellulaire de lymphocytes, monocytes, éosinophiles et basophiles, dans la migration leucocytaire et également dans la transduction des signaux. L'expression de VCAM-1 augmente en réponse à différentes cytokines pro-inflammatoires, notamment TNF α et IL-1.

1.2.2.3.2 Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1)

Cette molécule d'adhésion transmembranaire est exprimée dans les leucocytes, les cellules endothéliales et les CML. Elle est présente à un taux basal faible en condition physiologique, taux qui est augmenté chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires. L'expression d'ICAM-1 est augmentée en présence de médiateurs de l'inflammation tels que le TNF α ou IFN- γ . Elle est impliquée dans les processus immunitaires innés et inductibles et c'est également un médiateur de signalisation cellulaire et de transcription génique via une forme soluble, le sICAM-1.

1.2.2.3.3 Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1)

PECAM-1 ou CD31 est un composant essentiel des jonctions intercellulaires des cellules endothéliales. Elle est exprimée majoritairement par les cellules endothéliales mais peut être retrouvée également à la surface des cellules hématopoïétiques et immunitaires. Elle joue un rôle dans le développement du système cardiovasculaire en contribuant à la transmission des signaux intracellulaires et elle participe également à l'angiogenèse et la fonction plaquettaire. Elle contribue à la migration transendothéliale des leucocytes. PECAM-1 va promouvoir des interactions de type homophylique et hétérophylique, d'une part en se liant avec une autre cellule endothéliale via une autre PECAM-1 et d'autre part, par liaison avec les leucocytes. Peu connue au niveau des plaquettes et des leucocytes, il a été montré cependant que la régulation de l'expression de PECAM-1 au sein des cellules endothéliales est, contrairement à ICAM-1 et VCAM-1, constante et n'est pas modulé à la suite d'une exposition aux cytokines pro-inflammatoires.

1.2.2.3.4 Sélectine E

La sélectine E n'est pas exprimée en condition physiologique, c'est en présence de cytokines pro-inflammatoires que les cellules endothéliales produisent et transloquent cette molécule d'adhésion à la membrane plasmique. La production de la sélectine E est stimulée

par l'expression de la sélectine P, qui est également une molécule d'adhésion, qui est elle-même induite par le TNF α , l'IL-1 et le lipopolysaccharide (LPS). Les forces de cisaillement peuvent également influencer sur l'expression de cette molécule. Les ligands de la sélectine E sont exprimés par différents types de cellules inflammatoires tels que les neutrophiles, monocytes, lymphocytes et les cellules natural killer. C'est pourquoi elle est impliquée dans la réponse inflammatoire aiguë et chronique. Il a été montré que son expression est augmentée dans certaines maladies telles que le syndrome coronarien aigu ou encore l'anévrisme.

Sélectine P

La sélectine P est exprimée par les mégacaryocytes et les cellules endothéliales. Elle est stockée dans la membrane des granules α des plaquettes et dans les corps de Weibel-Palades des cellules endothéliales. Des médiateurs actifs tels que la thrombine, l'histamine ou le complément induisent une redistribution rapide de la sélectine P à la membrane plasmique. La sélectine P contribue à l'inflammation et la thrombose dans plusieurs maladies, notamment l'athérosclérose (An et al., 2008; Collins et al., 2000; Dong et al., 1998), l'ischémie-reperfusion (Thiagarajan et al., 1997) ou la thrombose artérielle (Falati et al., 2003).

1.2.3 La dysfonction endothéliale

1.2.3.1 Généralités

La dysfonction endothéliale est un facteur clef de l'apparition de complications cardiovasculaires associées à des pathologies vasculaires telles que l'hypertension artérielle ou à des pathologies non vasculaires comme le diabète ou l'insuffisance rénale chronique.

En condition physiologique, les cellules endothéliales se trouvent dans un état quiescent avec une surface et une lame basale intacte et un glycocalyx fonctionnel. L'anomalie d'au moins une de ces fonctions caractérise la dysfonction endothéliale. C'est notamment le cas lorsque l'endothélium est activé, il devient pro-agrégant, pro-inflammatoire, perméable et vasoconstricteur.

Ce phénotype vasoconstricteur s'installe lorsque l'équilibre entre production de molécules vasodilatatrices et vasoconstrictrices est perturbé. La diminution de la biodisponibilité du •NO participe également à la dysfonction endothéliale, elle peut avoir différentes causes comme la diminution de la disponibilité des substrats et cofacteurs ou la diminution de l'expression et/ou de l'activité de la NOSe.

La NOSe est régulée au niveau génomique et protéique par des modifications post-traductionnelles. Ainsi une diminution de son activité peut être due à un changement dans l'équilibre entre phosphorylation activatrice et phosphorylation inhibitrice de son activité. Il a été montré qu'une diminution des phosphorylations activatrices associée à une augmentation des phosphorylations inhibitrices entraîne une inhibition de son activité et la diminution de la production de •NO. De plus, il existe un découplage de la NOSe en condition de stress oxydant : sous sa forme monomère, elle est active et produit de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) à la place du •NO. Finalement, un inducteur important de la dysfonction endothéliale est la modification et la diminution des forces de cisaillement appliquées aux cellules endothéliales qui est associée à une diminution de l'expression génique de la NOSe ainsi que de son activité.

La diminution de la densité capillaire est également retrouvée dans certaines maladies, notamment l'IC, causant de l'hypoxie chez les souris et les rats (Afsar et al., 2018). Elle est associée avec l'hypertension (Ciuffetti et al., 2003), l'hypertrophie du ventricule gauche (Oka Toru et al., 2014), le diabète (Gonzalez-Quesada Carlos et al., 2013) et le vieillissement (Faber James E. et al., 2011) dans différents tissus chez les hommes et les femmes.

1.2.3.2 La dysfonction endothéliale dans le diabète

Le diabète est associé à une augmentation de la mortalité liée à une morbidité cardiovasculaire. C'est un des principaux facteurs de risque de l'ICFÉp et il est connu que les problèmes cardiovasculaires sont en relation directe avec les taux plasmatiques élevés de glucose que l'on peut retrouver lors du diabète. Or ces anomalies métaboliques et endocriniennes associées au diabète sont considérées comme des facteurs de dysfonctionnement du système vasculaire. Les hypothèses émises sont : le rôle délétère de l'excès de sorbitol, la voie du diacylglycerol, la glycosylation non-enzymatique ou glycation des protéines et les anomalies du potentiel d'oxydoréduction. De plus, l'insulinothérapie dans le diabète de type 1 qui engendre un excès d'insuline secondaire et la sécrétion inappropriée d'insuline dans le diabète de type 2 sont considérés comme des stimulants possibles de la prolifération des CML.

La microangiopathie est une atteinte des petites artères, notamment de l'œil (rétinopathie) et du rein (néphropathie) alors que la macroangiopathie désigne une atteinte des artères musculaires allant de l'aorte aux petites artères distales. Ces anomalies sont le plus souvent retrouvées chez les personnes diabétiques et représentent une cause majeure de morbi-morbidité chez ces patients.

En condition pathologique, l'hyperglycémie a des conséquences directes sur le tissu endothélial. Les perturbations fonctionnelles de la microcirculation sont une augmentation du débit, de la pression et de la perméabilité capillaire. De plus, on retrouve une perte de l'autorégulation hémodynamique, une tendance thrombogène et une augmentation de la viscosité sanguine. Ces anomalies fonctionnelles aboutissent à un épaissement de la membrane basale, une diminution du nombre de péricytes, une augmentation de la perméabilité vasculaire et des altérations de la vasomotricité. Ces altérations du tissu endothélial provoquent un œdème et à une thrombose du capillaire. Cette occlusion capillaire conduit à une hypoperfusion de la zone qui devient par conséquent ischémique et hypoxique. Dans la rétinopathie, cette hypoxie stimule l'expression de VEGF qui entraîne une néovascularisation au sein de la rétine. Au niveau du rein, une protéinurie et une expansion mésangiale conduisent à une glomérulosclérose.

L'atteinte macrovasculaire et en particulier coronaire est une cause importante de mortalité chez le diabétique. Un risque 2 à 3 fois supérieur de cardiopathie chronique, d'artériopathie périphérique et d'atteinte vasculaire cérébrale a été observé chez les patients diabétiques par rapport à la population générale. Ce risque est corrélé avec l'hyperglycémie chronique. Les protéines glyquées sont présentes dans les lésions artérioscléreuses des patients diabétiques. La présence de protéines glyquées dans la peau est corrélée avec l'atteinte artérielle périphérique et l'hypertension artérielle.

L'hyperglycémie liée au diabète peut donc atteindre les vaisseaux et les altérer, que ce soit les gros vaisseaux ou les microvaisseaux.

1.2.3.3 La dysfonction endothéliale dans l'ICFEP

D'après le paradigme proposé par Paul *et al.* en 2013, le rôle de la dysfonction endothéliale dans le développement de l'ICFEP serait critique (Paulus and Tschöpe, 2013). Cependant la prévalence d'une dysfonction endothéliale chez les patients est difficile à évaluer et concernerait 50 à 70% des patients (Burke *et al.*, 2014; Mohammed *et al.*, 2015a).

1.2.3.3.1 Le •NO

Les patients atteints d'ICFEP présentent une diminution de la biodisponibilité en •NO et une altération de la vasomotricité.

L'augmentation du stress oxydant myocardique est un des signes de dysfonction endothéliale et il a été mesuré dans des biopsies de patients ICFEP (van Heerebeek *et al.*, 2012; Westermann *et al.*, 2011) présentant une diminution de la signalisation du •NO dans le

cœur. Le •NO est impliqué dans la relaxation des cardiomyocytes, ainsi la diminution de sa biodisponibilité participe aux modifications de la relaxation myocardique. Chez des patients montrant une dysfonction diastolique isolée (Tschöpe et al., 2005), on retrouve une altération de la dilatation coronaire dépendante de l'acétylcholine et chez les patients ICFEp, une dysfonction microvasculaire coronarienne (Sucato et al., 2015) ainsi qu'une diminution de la réserve coronarienne (Kato et al., 2016). Ces études suggèrent une implication de la diminution de production de •NO par l'endothélium dans la dysfonction diastolique. L'activité de la NOSe est également diminuée et par conséquent, une diminution de la biodisponibilité du •NO est constatée chez les patients ce qui affecte les cardiomyocytes et pourrait diminuer l'axe PKG/GMPc entraînant l'hypertrophie cardiaque.

Dans les modèles animaux d'hypertension, dont les rats obèses ZSF1 atteints d'ICFEP (Schmederer et al., 2018), on retrouve une dysfonction endothéliale caractérisée par une diminution de l'expression et de l'activation de la NOSe, une augmentation de la NADPH et une activation de JNK (c-Jun N-terminal protein kinase). Dans une autre étude, des rats femelles Dahl salt-sensitive (Adams et al., 2015) présentent également une diminution de l'activité de la NOSe associée à une augmentation des produits de glycation avancée et de l'activation des MMPs. On retrouve également dans un modèle porcin d'ICFEP une diminution de l'expression de NOSe, de la PKG et du GMPc (Zhang et al., 2019).

On remarque ainsi chez les patients atteints d'IC une augmentation des niveaux plasmatiques d'endothéline-1 (Chowdhury et al., 2019), soutenant le phénotype vasoconstricteur de l'endothélium de patient atteints d'ICFEP.

1.2.3.3.2 Activation

Par ailleurs, des études ont montré un taux plus élevé de sélectine E et d'ICAM-1 solubles plasmatiques chez les patients atteints d'ICFEP comparé aux contrôles sains et aux patients atteints d'ICFEr (Franssen et al., 2016a). A ces élévations de taux plasmatiques s'ajoute également une élévation de VCAM-1 quantifiée sur des biopsies de myocarde humain chez les patients ICFEP (Westermann et al., 2011). De plus, il a été mis en évidence que les rats ZSF1 ont des niveaux d'ICAM-1 et de sélectine E augmentés par rapport aux rats contrôles, ce qui supporte une association entre l'activation de l'endothélium et l'ICFEP dans les modèles animaux (Franssen et al., 2016b). Cette activation endothéliale est aussi retrouvée dans un modèle de souris sénescences SAM (Senescence-Accelerated Mice) soumises à un régime gras avec une augmentation de l'expression d'ICAM-1 (Gevaert Andreas B. et al., 2017).

1.2.3.3.3 Raréfaction microvasculaire

La diminution de la densité microvasculaire coronarienne a été montrée comme caractéristique des patients, femmes et hommes, atteints d'ICFEp. Dans une étude réalisée post mortem, les patients atteints d'ICFEp présentent une raréfaction microvasculaire coronaire comparés aux contrôles d'âge similaires, estimée via une diminution de la densité microvasculaire (Mohammed et al., 2015a) (Figure 17). Chez certains modèles métaboliques, telles que les souris diabétiques et obèses, on retrouve également une raréfaction microvasculaire (Alex et al., 2018a). D'autre part, dans un modèle de souris traitées avec un inhibiteur de la NOSe seul ou associé à un régime gras, on observe dans les deux conditions une diminution de la densité capillaire comparé aux contrôles (Schiattarella et al., 2019a). Ce résultat suggère que l'activité de la NOSe serait impliquée dans la modification de la densité des microvaisseaux. Cependant, les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore totalement élucidés et restent encore peu connus.

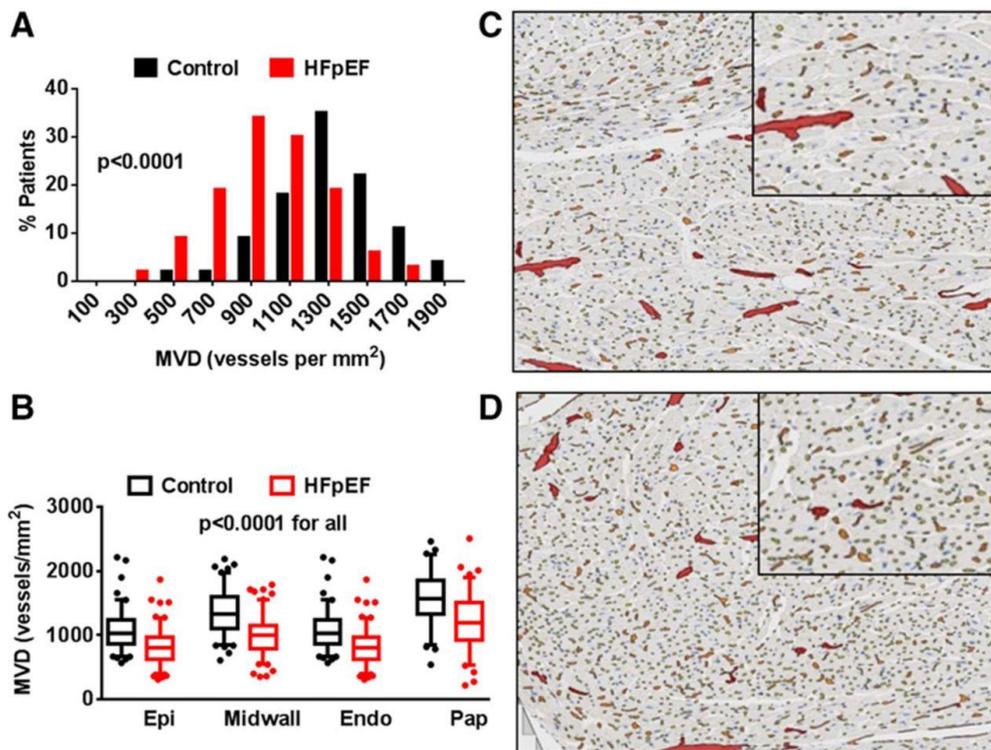


Figure 17. Données démontrant une raréfaction capillaire chez les patients atteints d'ICFEP (D) par rapport aux contrôles (C) (Mohammed et al., 2015a)

1.2.4 Résumé/Conclusion

Le paradigme de Paul et Waltus met la dysfonction endothéliale au centre des mécanismes physiopathologiques de l'ICFEP, il la définit comme un des acteurs en amont du remodelage cardiaque et de la dysfonction diastolique. Les résultats des études réalisées chez l'homme et l'animal semblent s'accorder avec ce paradigme puisqu'on retrouve toujours un ou plusieurs paramètres de la dysfonction endothéliale associés avec l'ICFEP (Cuijpers et al., 2020). Tout d'abord, il est supposé qu'une diminution de l'activité de la NOSe et la diminution de la biodisponibilité du •NO qui en découle affecterait la relaxation myocardique. Les résultats de différentes études chez l'homme (Kato et al., 2016; Sucato et al., 2015; Tschöpe et al., 2005) et l'animal (Schmederer et al., 2018) confortent cette hypothèse en montrant qu'une altération de la vasomotricité est trouvée chez les patients ICFEP. Il est suggéré que l'endothélium est activé durant l'ICFEP, ce qui est supporté par l'élévation des taux circulants des molécules d'adhésion VCAM-1, ICAM-1 et sélectine E chez les patients et dans les modèles animaux. Un dernier paramètre de l'altération des microvaisseaux est associé à l'ICFEP : la diminution de la densité microvasculaire. Cette raréfaction capillaire, retrouvée dans des biopsies humaines et dans des modèles animaux, est un signe de dysfonction

endothéliale et peut impacter le fonctionnement cardiaque via une diminution de la perfusion du myocarde.

Seulement, le rôle de la dysfonction endothéliale dans le développement de la maladie reste à démontrer. En effet, il reste encore à déterminer si une dysfonction endothéliale seule est capable d'induire de l'ICFEp et par quels mécanismes. De plus, le lien entre l'inflammation et la dysfonction endothéliale est abordé dans le paradigme, seulement il est encore difficile à positionner ces deux phénomènes dans la cascade d'événements conduisant au développement de la maladie. Effectivement, l'inflammation et les cytokines pro-inflammatoires sont des facteurs participant à la dysfonction endothéliale tandis que celle-ci contribue à l'inflammation en permettant le recrutement de cellules inflammatoires et leur infiltration tissulaire.

1.3 . Inflammation et IC

Les cellules inflammatoires retrouvées dans le cœur peuvent être résidentes ou infiltrées, et incluent les macrophages, les mastocytes, les monocytes, les neutrophiles, éosinophiles, les lymphocytes B et lymphocytes T (Swirski and Nahrendorf, 2018). L'inflammation entraîne la sécrétion de différentes cytokines et chémokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6, le TNF- α et le CCL2. Cette sécrétion promeut le recrutement de neutrophiles et monocytes et amplifie la cascade inflammatoire, affectant les leucocytes, les cardiomyocytes et les cellules endothéliales. Des études ont montré que les cellules inflammatoires résidentes ou infiltrées dans le tissu cardiaque participent au remodelage cardiaque. La réaction immunitaire est une protection contre les invasions d'organismes et les blessures tissulaires et elle joue un rôle crucial dans les réactions inflammatoires vasculaires. L'évolution de cette inflammation de physiologique à pathologique semble influencer le devenir de l'IC.

1.3.1 Les Monocytes/Macrophages

1.3.1.1 Généralités

Les macrophages proviennent de la lignée myéloïde et sont des cellules différenciées retrouvées dans la plupart des tissus de l'organisme. Les macrophages résidents représentent 6 à 8% des cellules cardiaques, hormis les cardiomyocytes, chez la souris adulte (Pinto et al., 2016). Au départ identifiés comme les cellules phagocytaires de référence, ils ont un rôle important dans la réponse innée aux pathogènes, l'initiation de l'inflammation et contribuent également au maintien de l'homéostasie tissulaire. Les

macrophages digèrent les cellules mourantes, les dépôts de protéines, de lipides et de microorganismes. Ils produisent un large panel de molécules bioactives, notamment les cytokines et les facteurs de croissance, en réponse au microenvironnement dans lequel ils se trouvent.

Les macrophages présentent une hétérogénéité et une plasticité fonctionnelle importante. Il a été décrit deux types de phénotypes de macrophages : les macrophages polarisés M1 et M2 (Figure 18). Les macrophages M1 sont dit de phénotype activé pro-inflammatoire ou activé classiquement, alors que les macrophages M2 sont dit de phénotype anti-inflammatoire ou activé alternativement. Il est néanmoins reconnu actuellement que cette distinction en deux sous-types extrêmes n'est pas exacte et on observe un continuum entre les macrophages polarisés M1 et M2. Les profils de cytokines exprimés déterminent souvent les caractéristiques de polarisation. L'activation classique est induite par l'interféron (IFN- γ ou LPS) via les TLR (Toll-like receptors). Elle est caractérisée par l'induction du MHC class II (MHC Class II molecule), l'expression des cytokines pro-inflammatoires, tel que le TNF- α , et la formation ROS et de \bullet NO. Une activation alternative est habituellement induite par l'IL-4, l'IL-13, le TGF- β et par la prostaglandine E2 (Saqib et al., 2018) (Figure 18). Le récepteur au mannose (Mrc1) est exprimé par les macrophages tissulaires et utilisé comme marqueur des macrophages de type M2.

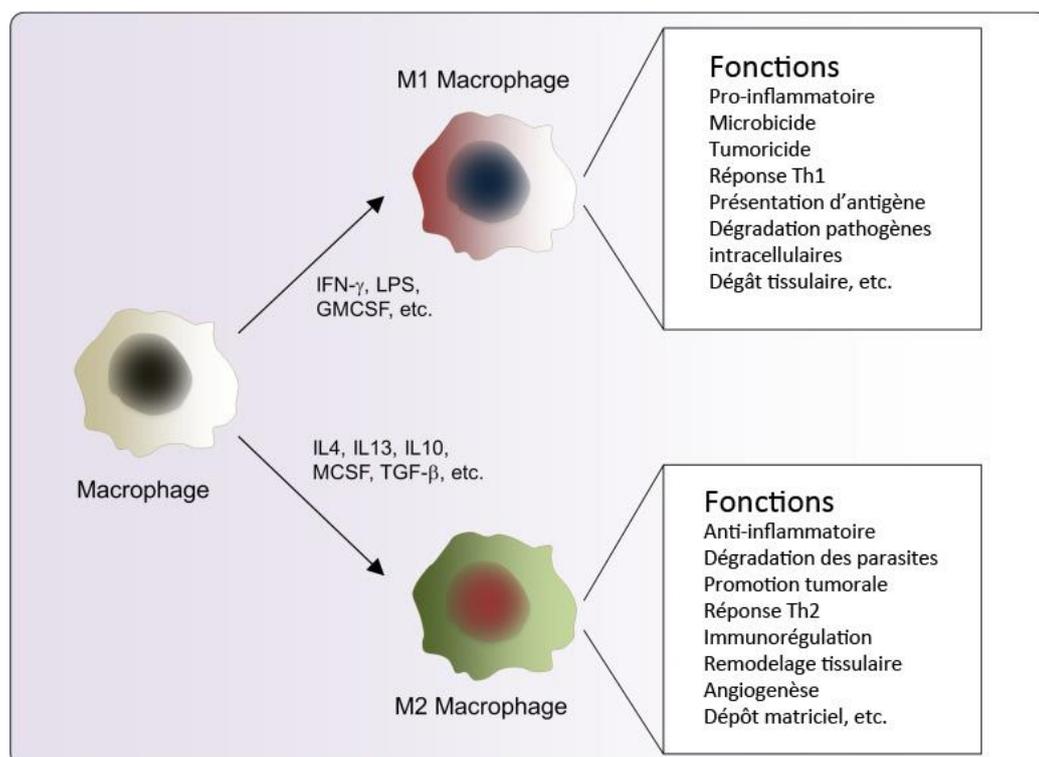


Figure 18. Les deux types d'activation des macrophages (M1, M2) et leurs fonctions (Saqib et al., 2018)

1.3.1.2 Implication des macrophages dans le développement de maladies cardiovasculaires

Le cœur contient une population de macrophages résidents qui est augmentée par un recrutement de monocytes après une lésion. A la suite d'un infarctus du myocarde, la mort de nombreux cardiomyocytes entraîne la mobilisation de monocytes de la moelle osseuse via des signaux moléculaires. Les monocytes pénètrent dans les tissus endommagés et produisent des facteurs favorisant la survie cellulaire. Les monocytes/macrophages s'accumulent dans la zone proche de l'infarctus avant de migrer vers la zone infarctée, le nombre de macrophages augmentant selon des études histologiques humaines. Leur déplétion dans des modèles murins a mis en lumière leur rôle dans l'infarctus du myocarde qui est l'élimination des cardiomyocytes morts, la reconstruction de la matrice et l'angiogenèse.

Le rôle des macrophages dans la réparation cardiaque post-infarctus a été beaucoup étudié, ce qui n'est pas le cas pour l'insuffisance cardiaque chronique et l'ICFEP alors que dans ces deux contextes la densité de macrophages est augmentée significativement (Hulsmans et al., 2018; Ying et al., 2009). Les mécanismes impliqués dans leur recrutement et leur activation en réponse à une surcharge de pression ou une insuffisance cardiaque chronique restent méconnus.

1.3.2 Les mastocytes

1.3.2.1 Généralités

Les mastocytes sont des cellules uniquement tissulaires, non présentes dans le sang en situation physiologique (Beaven, 2009). D'une taille de 10 à 20 μm , elles ont un aspect mononucléé et sont caractérisées par un contenu cytoplasmique composé de granules sécrétoires de différentes tailles (Figure 19). Ces granules permettent l'identification rapide des mastocytes puisqu'ils fixent le bleu de toluidine et changent sa couleur en pourpre. Les mastocytes sont également définis par l'expression du récepteur au SCF (Stem Cell Factor Receptor ou CD117 ou c-Kit) et du $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ (type I $\text{Fc}\epsilon$ receptor), récepteur de haute affinité pour les immunoglobulines de type E (IgE). Distribués dans tout l'organisme, les mastocytes sont particulièrement retrouvés au niveau des muqueuses et des tissus conjonctifs. Les mastocytes sont souvent considérés comme des cellules pathogéniques dans les allergies en raison de leur capacité à sécréter l'histamine contenue dans ces granules.

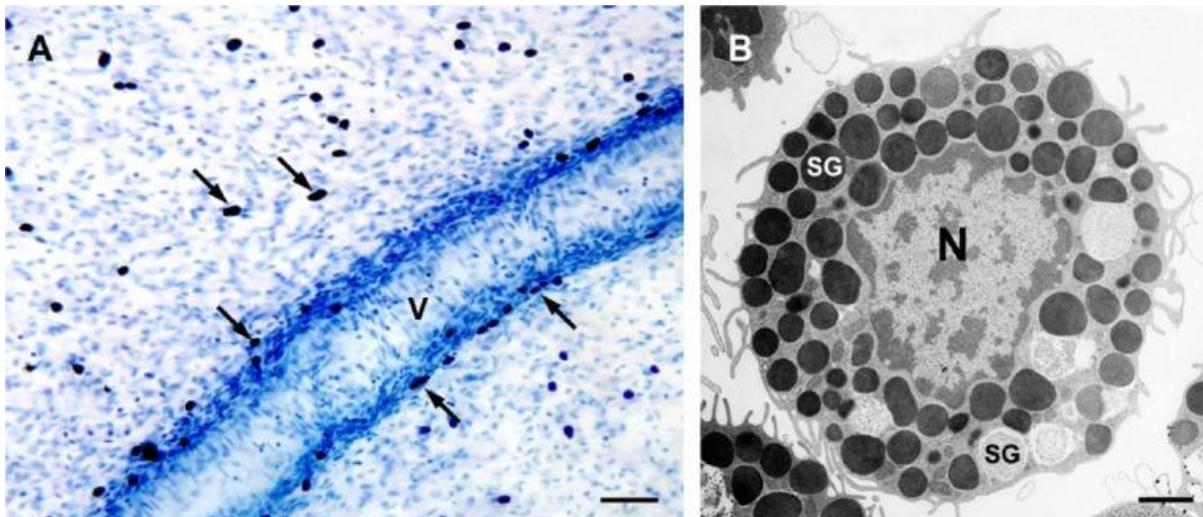


Figure 19. (A) Les mastocytes (flèches) sont alignés autour du vaisseau (V) et dans le mésentère. Coloration bleue de Toluidine, échelle = 25 μm . (B) Mastocyte mature rempli de granules sécrétoires denses. N= noyau, SG = granule sécrétoire. Microscopie électronique à transmission, échelle= 1 μm . (da Silva et al., 2014)

Les mastocytes proviennent de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes exprimant les marqueurs de surface CD34 et CD117. Les progéniteurs de mastocytes migrent de la moelle osseuse vers le sang puis vers les tissus cibles où ils mûrissent sous l'action de cytokines locales (Dahlin et al., 2017) (Figure 20). Notamment, le SCF est le facteur de croissance obligatoire des mastocytes humains et murins. Il est produit par les cellules épithéliales et mésenchymateuses (Wen et al., 1996). L'activation de c-KIT sur les mastocytes induit la prolifération des mastocytes immatures ou matures, ainsi que le chimiotactisme. Cette activation inhibe l'apoptose, améliore la survie, le recrutement et la croissance (Tsai et al., 1991b, 1991a).

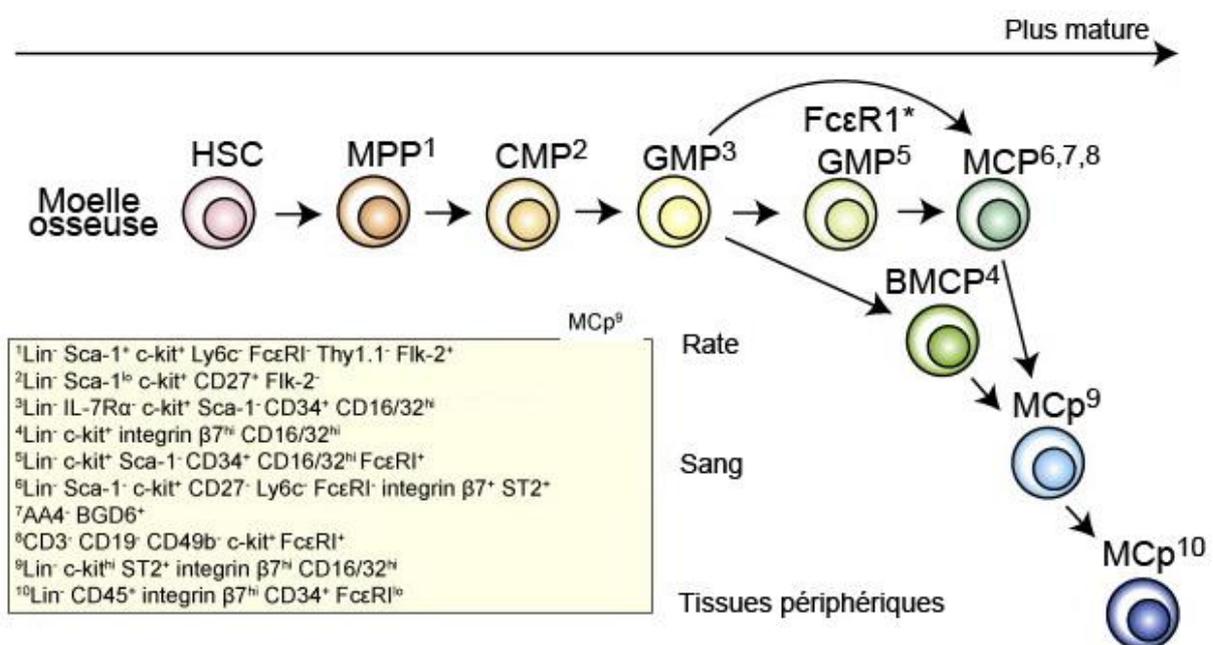


Figure 20. L'origine et le développement des mastocytes en fonction des différents facteurs (encadré) (Dahlin and Hallgren, 2015)

Aujourd'hui il est acquis que la population cellulaire des mastocytes possède une hétérogénéité beaucoup plus riche qu'on aurait pu le penser au départ. Dans les modèles murins, il a été montré en 1960 que les mastocytes présents dans l'intestin développent des caractéristiques différentes (Enerbäck, 1966a). Il existe alors deux grandes catégories de mastocytes : les mastocytes des tissus conjonctifs appelés les CTMC (connective tissue mast cell) et les mastocytes des muqueuses MMC (mucosal mast cell). La principale distinction entre ces deux sous-populations a pour origine les propriétés du protéoglycane formant leurs granules. Les MMC sont enrichis en chondroïtine sulfate et sont colorés par le bleu alcian, tandis que les CTMC contiennent de l'héparine et sont colorés par la safranine (Enerbäck, 1966b; Tsai et al., 1991b) (Tableau 2).

Pour les mastocytes humains (Irani et al., 1986), on appelle les mastocytes présentant un marquage immunohistochimique uniquement pour la tryptase les mastocytes tryptase (MC_T) ; ils sont retrouvés dans les muqueuse pulmonaires et dans la lamina propria (Bentley et al., 1992; Bradding et al., 1995). Les mastocytes renfermant de la tryptase, chymase, carboxypeptidase A3 et cathepsine G sont appelés mastocytes tryptase/chymase (MC_{TC}) ; ils sont retrouvés dans les tissus conjonctifs et interagissent étroitement avec les vaisseaux sanguins (Bradding et al., 1995) (Tableau 2).

Il est cependant important de noter que le phénotype de protéases murines ou humaines sécrétées par les mastocytes peut varier considérablement d'un tissu à un autre, au sein du même tissu dans différentes localisations ou entre différents fonds génétiques et dans les tissus enflammés (Friend et al., 1996; Gurish et al., 1995; Hsieh et al., 2005; Xing et al., 2011). La formation de novo de médiateurs actifs par les mastocytes, au-delà des protéases contenues dans les granules, dépend non seulement des caractéristiques propres à chaque tissu mais aussi des conditions pathologiques locales (Galli et al., 2005).

Tableau 2. Récapitulatif des différents sous-types de mastocytes murins et humains.

	Mastocytes murins		Mastocytes humains	
	MMC	CTMC	MC _T	MC _{TC}
Contenu Granulaire	Chymase	Chymases, tryptases	Tryptase	Tryptase, chymase, carboxypeptidase, cathepsine G
Protéoglycanes	Chondroïtine sulfate	Héparine	Héparine	Héparine
Localisation	Muqueuses	Tissus sous-muqueux	Epithélium, lamina propria	Lamina propria, tissus connectifs, peau
Marquage en immunohistochimie	Bleu alcian +	Safranine +		Safranine +

Au niveau cardiovasculaire, les mastocytes sont localisés à proximité des vaisseaux sanguins dans le cœur humain et murin (Rakusan K et al., 1990) (Figure 21), où ils participent aux fonctions physiologiques telles que l'angiogenèse et la production d'angiotensine II (Silver et al., 2004). Les mastocytes cardiaques et vasculaires contiennent pour la majorité de la tryptase et de la chymase (Balakumar et al., 2008).

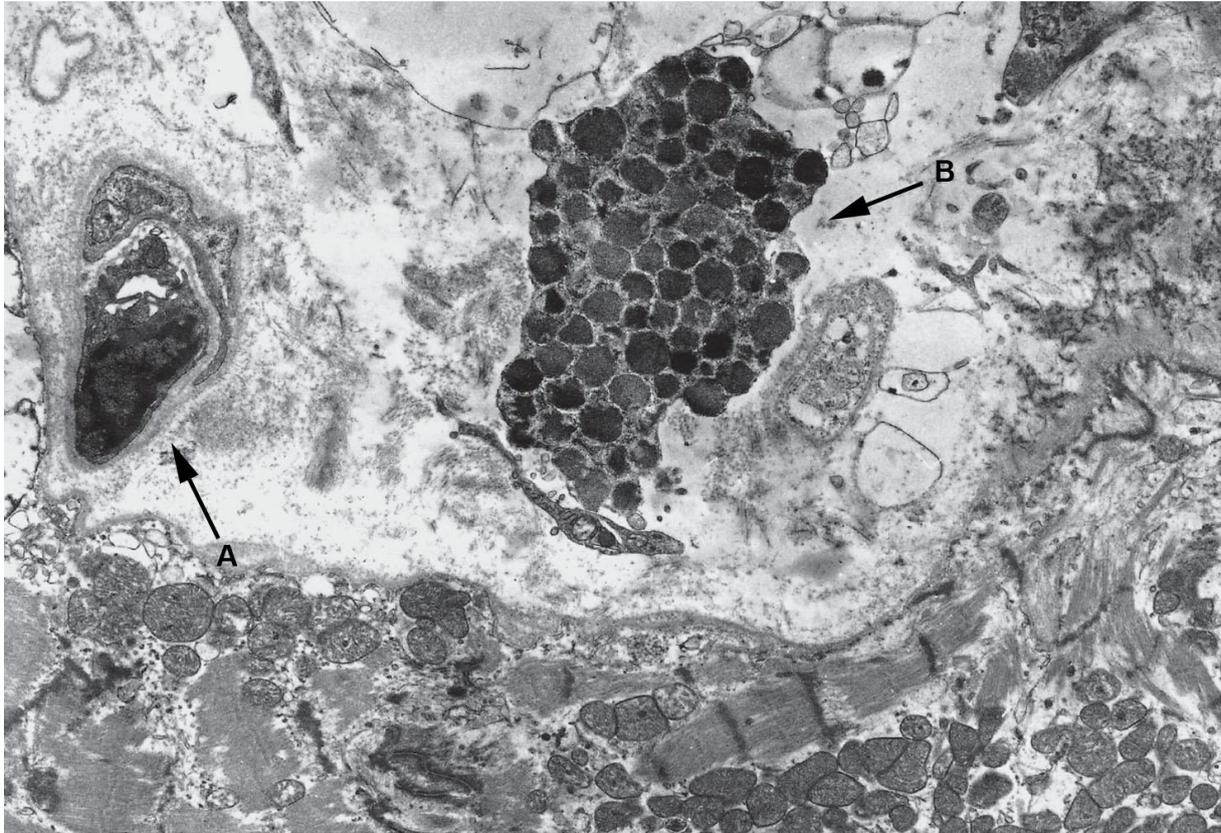


Figure 21. Image en microscopie électronique d'un mastocyte dans le cœur humain (B), proche d'un vaisseaux (A) (Genovese et al., 2010). Les granules intracytoplasmiques sont visibles.

1.3.2.2 *Activité des mastocytes*

Les mastocytes ont pour rôle essentiel de reconnaître le pathogène ou la situation inflammatoire grâce à des récepteurs aux immunoglobulines qu'ils expriment constitutivement, notamment le Fc ϵ RI, le récepteur de haute affinité aux IgE. Les mastocytes sont des acteurs majeurs de l'allergie avec les anticorps IgE pourtant des études récentes ont montré une expansion des fonctions des mastocytes et de leur activation par les IgE. (Furuichi et al., 1985; Quarto et al., 1985). La fixation des IgE au RFc ϵ I induit une signalisation intracellulaire qui entraîne la dégranulation des mastocytes (Ozawa et al., 1993; Vig et al., 2008). Le SCF est capable de fortement potentialiser la dégranulation des mastocytes après activation du RFc ϵ I et augmente l'expression génique de plusieurs cytokines dans les mastocytes humains (Hundley et al., 2004) et murins (Ishizuka et al., 1999).

1.3.2.3 Fonctions effectrices des mastocytes

L'activation des mastocytes entraîne une ou plusieurs fonctions effectrices (Figure 22). Ces fonctions peuvent dès lors agir directement sur la source de la réponse inflammatoire, sur les cellules environnantes et également à longue distance, induisant une réponse inflammatoire systémique.

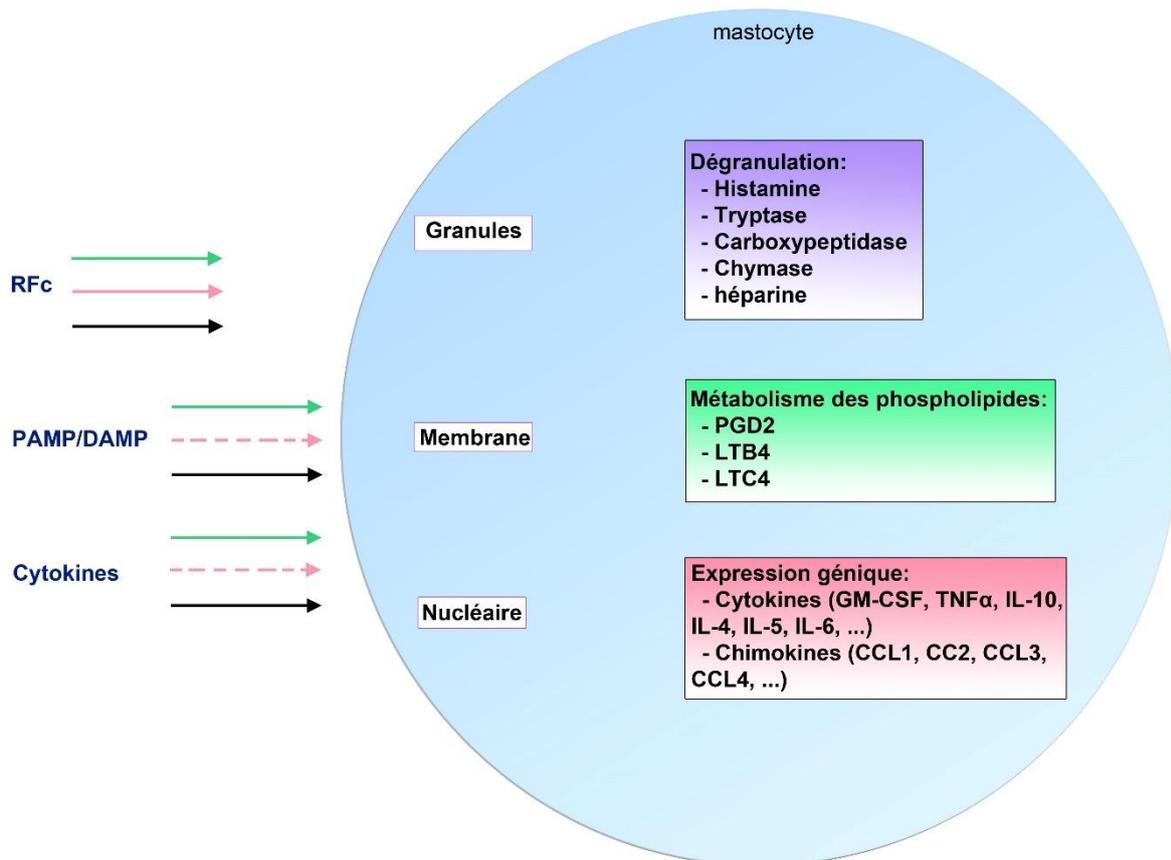


Figure 22. Influence de certains stimuli sur les fonctions principales des mastocytes. Les flèches en couleurs indiquent la catégorie de médiateurs stimulés. Les flèches pleines indiquent une action directe des stimuli et les flèches en pointillés une action indirecte.

1.3.2.3.1 Les granules du mastocyte et la réponse dégranulatoire

La principale caractéristique morphologique des mastocytes est la présence de granules au sein de leur cytoplasme. Les granules sécrétoires renferment un panel très varié de molécules préformées pouvant être libérées dans le milieu extracellulaire dès l'activation du mastocyte (Wernersson and Pejler, 2014).

Les granules se développent dans le réseau trans-golgien où des « pro-granules » fusionnent pour former des granules immatures qui deviendront matures par la suite (Combs, 1966). Durant cette phase de maturation, les médiateurs actifs s'accumulent dans les granules. Au cours de la vie du mastocyte, le volume des granules augmente en continu, ce qui reflète la fusion constante des pro-granules avec les granules matures (Hammel et al., 2010). Après maturation des granules et activation du mastocyte, le processus de dégranulation a lieu grâce au phénomène d'exocytose (Sander et al., 2008; Tiwari et al., 2008).

Le plus connu des médiateurs mastocytaires est l'histamine, mais les granules contiennent également du VEGF-A et du TNF- α ainsi que des protéases seulement exprimées par les mastocytes comme les chymases, tryptases et la carboxypeptidase A3 (Pejler et al., 2007).

Tableau 3. Les différents composés granulaires et leurs fonctions biologiques.

Composé granulaire	Caractéristiques et fonctions biologiques	Références
Enzyme lysosomales		
Cathepsine B	Impliquée dans la maturation de la pro-tryptase	(Koo et al., 2008; Schwartz and Austen, 1981)
Cathepsine C	Impliquée dans la maturation de la pro-tryptase	(Wolters et al., 2000)
Cathepsine E	Impliquée dans la maturation de la carboxypeptidase 3	(Le et al., 2011)
Amines biogènes		
Histamine	Induit une bronchoconstriction, vasodilatation, et une perméabilité vasculaire Impliquée dans le dialogue avec les neurones	(Riley, 1953; Riley and West, 1953)
Cytokines et facteurs de croissance		
TNF	Activité pro-inflammatoire	(Gordon and Galli, 1990)
VEGF-A	Effet pro-angiogénique	(Boesiger et al., 1998)
TGF β	Effet protecteur ou pathogène dans l'inflammation	(Lindstedt et al., 2001)
Chymase	Effet protecteur ou pathogénique dans l'inflammation	(Benditt and Arase, 1959)
Carboxypeptidase A3 (CPA3)	Dégradation de l'apolipoprotéine B et de l'angiotensine I	(Kokkonen et al., 1986)
Cathepsine G	Rôle inconnu	(Schechter et al., 1990)
Caspase 3 active	Impliqué dans l'effet pro-apoptotique contre des cellules cibles	(Garcia-Faroldi et al., 2013)

Il a également été montré que les mastocytes sont capables de capter des molécules exogènes afin de les stocker dans ses granules pour les exocyster ultérieurement. Cela a été

démontré pour la protéine basique majeure des éosinophiles (Butterfield et al., 1990) et le TNF- α (Olszewski et al., 2007).

1.3.2.3.2 Les dérivés des phospholipides membranaires, les lipides bioactifs

Les eicosanoïdes sont des molécules de signalisation contenant 20 carbones dérivées de l'acide arachidonique ou d'autres acides gras polyinsaturés. Les eicosanoïdes sont formés via l'oxydation des lipides par COX1 et 2 (cyclooxygénases 1 et 2) (Kühn and O'Donnell, 2006), LOX (lipoxygénase) ou les enzymes du cytochrome P450.

Il existe deux familles importantes d'eicosanoïdes, les prostaglandines et les leucotriènes. Les mastocytes peuvent produire de la PGD₂ (prostaglandine D₂) et des leucotriènes comme le LTB₄, LTD₄ et LTC₄. LTC₄ est notamment impliqué dans la perméabilité vasculaire et la contraction des vaisseaux.

1.3.2.3.3 Les cytokines et chimiokines produites par les mastocytes

Les mastocytes sont capables de sécréter un panel de cytokines et chimiokines très diverses lors d'une activation prolongée (Bradding and Arthur, 2016) notamment CCL2, CCL7 (Chemokine (C-C motif) ligand 7), CCL8 (Chemokine (C-C motif) ligand 8) ou CXCL2 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 2). Ces chimiokines sont libérées soit en réponse à l'activation par le RFc ϵ 1, soit par les TLR ou bien de façon constitutive. De façon intéressante, il a été montré que les mastocytes produisent de l'IL-1 β (interleukine-1 β) qui induit l'activation des cellules endothéliales (Kunder et al., 2011). Le GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), l'IL-3 (interleukine-3) et l'IL-5 (interleukine-5) sécrétés par les mastocytes agissent sur les éosinophiles et améliorent leur activation, adhésion, migration et survie (Elishmereni et al., 2011; Nakajima et al., 2001).

1.3.2.4 Implication des mastocytes dans le développement de maladies cardiovasculaires

L'augmentation de la prévalence des maladies cardiovasculaires chez les patients atteints de mastocytose, une maladie caractérisée par l'accumulation de mastocytes due à une augmentation de leur prolifération, suggère un rôle important des mastocytes dans le développement des maladies cardiaques (Indhirajanti et al., 2018). Une étude de 2018 a également établi une corrélation entre les taux circulants d'IgE et la prévalence de maladies cardiovasculaires chez les patients (Xu et al., 2018a), confortant cette association.

Les mastocytes sont notamment présents dans l'intima de l'aorte et les plaques d'athéromes où ils contribuent à la progression de l'athérosclérose. La chymase et la tryptase ont un rôle important dans ce phénomène en participant à la dégradation de la MEC, ainsi qu'à l'apoptose des CML et des cellules endothéliales et à l'accumulation des lipides. Ces protéases sont retrouvées dans l'anévrisme, où elles sont au centre des processus d'angiogenèse, d'apoptose et d'inflammation.

Dans le cœur, les mastocytes sont présents dans le tissu périvasculaires des gros vaisseaux sanguins et entre les cardiomyocytes (Patella et al., 1995). Un cœur sain possède un nombre relativement faible de mastocytes mais leur densité peut augmenter jusqu'à six fois quand le cœur est en situation de stress. Chez des patients atteints de cardiomyopathies, on retrouve une accumulation de mastocytes dans le tissu fibreux cardiaques (Patella et al., 1997) et une forte augmentation des taux d'histamine comparé aux contrôles sains (Patella et al., 1997). En isolant les mastocytes chez ces patients, une équipe a démontré qu'ils étaient plus sensibles à une activation par les IgE et le SCF, avec des taux d'histamine, tryptase et LTC₄ beaucoup plus élevés que chez les mastocytes isolés de contrôles (Patella et al., 1997). Ce phénotype contribue à les impliquer dans le développement des cardiomyopathies.

Les mastocytes semblent également jouer un rôle dans l'insuffisance cardiaque puisque chez des rats hypertendus spontanément et développant de l'insuffisance cardiaque, il a été retrouvé des mastocytes précocement et proche des zones de fibroses cardiaque (Shiota et al., 2003). Une étude a également étudié des souris déficientes en mastocytes et des contrôles soumises à une ligature partielle de l'aorte abdominale. Toutes les souris opérées développent une hypertrophie cardiaque au bout de quatre semaines. Au bout de quinze semaines, la fonction cardiaque chez les souris déficientes en mastocyte est meilleure que chez les contrôles. Ces dernières développent également une congestion pulmonaire et des analyses histologiques montrent une augmentation de la présence de mastocytes chez les souris sauvages ligaturées comparées aux sauvages SHAM. Ainsi les mastocytes seraient impliqués dans le développement d'une insuffisance cardiaque.

Dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le hamster, on retrouve une augmentation des mastocytes dégranulés et de l'activité de la chymase dans la zone infarctée. Il est suggéré que la chymase favorise la production d'angiotensine II dans la pathologie et que son inhibition améliore la fonction cardiaque et diminue la mortalité comparé au groupe contrôle (Jin et al., 2003). L'inhibition de la chymase induit également une diminution de la production de TGF- β et de la présence de fibrose dans le myocarde, ce qui entraîne une amélioration de la fonction cardiaque (Kanemitsu et al., 2006).

Cependant leur rôle délétère reste controversé. En réponse à un infarctus du myocarde par ligature permanente, on retrouve un recrutement et une maturation de précurseurs de mastocyte dans le cœur, où ils préserveront la fonction cardiaque. Les mastocytes agissent, via la tryptase, sur la phosphorylation des myofilaments par la PKA et la sensibilisation au calcium afin de réguler la contractilité des cardiomyocytes, rendant leur présence indispensable dans un cœur post-infarctus du myocarde (Ngkelo et al., 2016). A l'inverse, chez les souris *W/W^v* déficientes pour c-KIT où les mastocytes ne se développent pas, on retrouve un tissu myocardique moins fibrosé comparé aux souris sauvages après un infarctus du myocarde (Bhattacharya et al., 2007).

Les mastocytes semblent alors posséder des rôles variés au niveau cardiaque et agir sur plusieurs fonctions essentielles au maintien de la fonction et de la structure du cœur. Surtout étudiés pour leur rôle dans la fibrose et l'infarctus du myocarde, ils pourraient également être impliqués dans la mise en place d'une inflammation systémique chez les patients atteints d'ICFÉp.

1.4 La signalisation Hedgehog

1.4.1 Généralités

Le gène Hedgehog (*Hh*) a été identifié chez la drosophile il y a presque 40 ans (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980). L'origine de ce nom provient de l'aspect de la cuticule de la larve de drosophile mutée pour ce gène qui est courte et couverte de spicules. Les protéines HH interviennent dans le développement embryonnaire, en particulier dans l'organisation des plans et axes anatomiques à l'état larvaire mais aussi durant les étapes plus tardives du développement et de la métamorphose. Des gènes orthologues ont été identifiés chez les mammifères où ils jouent aussi un rôle déterminant dans le développement embryonnaire mais aussi dans la vascularisation et le cancer.

1.4.1.1 Structure des protéines Hh

1.4.1.1.1 Gènes et protéines Hh de mammifères

Chez les mammifères, les orthologues du gène Hh de la drosophile forment une famille composée de trois protéines : Sonic, Indian et Desert Hedgehog (SHH, IHH et DHH). Les gènes codant pour SHH, IHH et DHH se localisent respectivement sur le chromosome 5, 14 et 15 chez la souris et chromosome 7, 2 et 12 chez l'humain. Ces gènes présentent une forte homologie de séquence et les protéines sont hautement conservées entre les différentes espèces (Marigo et al., 1995; Pathi et al., 2001) particulièrement pour la partie N-terminale des protéines. Chez l'humain, *SHH* a 91% d'identité avec *IHH* et 76% avec *DHH*. L'identité entre l'*IHH* et *DHH* est de 80% (Figure 23).

	* * * * *	*	**	* * *	* * * * * * * * *	* *	* * * * * * * *	**	* * *
Shh	C ²⁴ GPGRGF-G-	KRRHPKK-LTP	LAYKQFIPNV	AEKTLGASGR	YEGKISRNS	E			
Ihh	C ²⁸ GPGRV-VGS	RRRPPRK-LVP	LAYKQFSPNV	PEKTLGASGR	YEGKIARSSE	E			
Dhh	C ²³ GPGRGPVG-	RRRYARKQLVP	LLYKQFVPGV	PERTLGASGP	AEGRVARGSE	E			
	**	* * * * *	* * * * * * * * *	* * * * * * *	* * *	* * *	* * * *	* * * *	* * * *
Shh	RFKELTPNYN	PDIIFKDEEN	TGADRLMTQR	CKDKLNALAI	SVMNQWPGVK				
Ihh	RFKELTPNYN	PDIIFKDEEN	TGADRLMTQR	CKDRLNSLAI	SVMNQWPGVK				
Dhh	RFRDLVPNYN	PDIIFKDEEN	SGADRLMTER	CKERVNALAI	AVMNMWPGVR				
	* * * * * * * * *	* * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * *	* * *	* * * * * * * * *
Shh	LRVTEGWDED	GHHSEESLHY	EGRAVDITTS	DRDRSKYGML	ARLAVEAGFD				
Ihh	LRVTEGWDED	GHHSEESLHY	EGRAVDITTS	DRDRNKYGLL	ARLAVEAGFD				
Dhh	LRVTEGWDED	GHHAQDSLHY	EGRALDITTS	DRDRNKYGLL	ARLAVEAGFD				
	* * * * *	*	* * * * *	*	* * *				
Shh	WVYYESKAHI	HCSVKAENSV	AAKSGG ¹⁹⁷						
Ihh	WVYYESKAHV	HCSVKSEHSA	AAKTGG ²⁰²						
Dhh	WVYYESRNHV	HVSVKADNSL	AVRAGG ¹⁹⁸						

Figure 23. Alignement des séquences humaines du domaine N-terminal de SHH, IHH et DHH (les étoiles indiquent une identité entre les 3 protéines) (Marigo et al., 1995; Pathi et al., 2001)

Les trois protéines HH des vertébrés sont synthétisées et modifiées de façon post-traductionnelles par des mécanismes identiques. Elles sont synthétisées sous la forme de pré-protéines d'environ 45 kDa. Celles-ci possèdent un peptide d'adressage (résidus 1 à 23, 1 à 27 et 1 à 22 pour SHH, IHH et DHH, respectivement) à son extrémité N-terminale, qui est reconnue par une Particule de Reconnaissance de Signal (PRS) durant sa translocation dans le réticulum endoplasmique. Au terme de la translocation, la séquence signal est retirée par une peptidase spécifique.

Les proprotéines HH sont ensuite clivées par autoprotéolyse de la partie C-terminale en libérant deux polypeptides (Valentini et al., 1997):

- une séquence N-terminale de 19 kDa, appelée N-HH (résidus 24 à 197, résidus 28 à 202 et résidus 23 à 198 pour SHH, IHH et DHH, respectivement) ;
- une séquence C-terminale de 26 kDa (résidus 198 à 462, résidus 203 à 411 et résidus 199 à 396 pour SHH, IHH et DHH, respectivement), dégradée après le clivage.

1.4.1.1.2 Modifications post-transcriptionnelles des protéines HH

Durant le clivage autoprotéolytique des proprotéines HH, une molécule de cholestérol se lie en C-terminal de N-HH, permettant sa sécrétion sous une forme encapsulée ainsi que l'ancrage de N-HH à la surface de la cellule (Porter et al., 1996).

N-SHH est aussi soumise à une seconde modification importante : l'accrochage d'un palmitate sur le groupement amine de la cystéine N-terminale (Buglino and Resh, 2010). SHH agit comme un signal paracrine de courte portée (nécessite des contacts cellule-cellule) mais aussi de longue portée (morphogène diffusible). La fixation de lipides sur SHH lui confère des propriétés hydrophobiques qui régulent sa sécrétion et sa dispersion dans l'espace extracellulaire dans le cadre de la signalisation de longue portée. Toutefois, le N-IHH n'est pas palmitoylée et la palmitoylation de N-DHH n'est pas encore décrite (Pepinsky et al., 1998) (Figure 24).

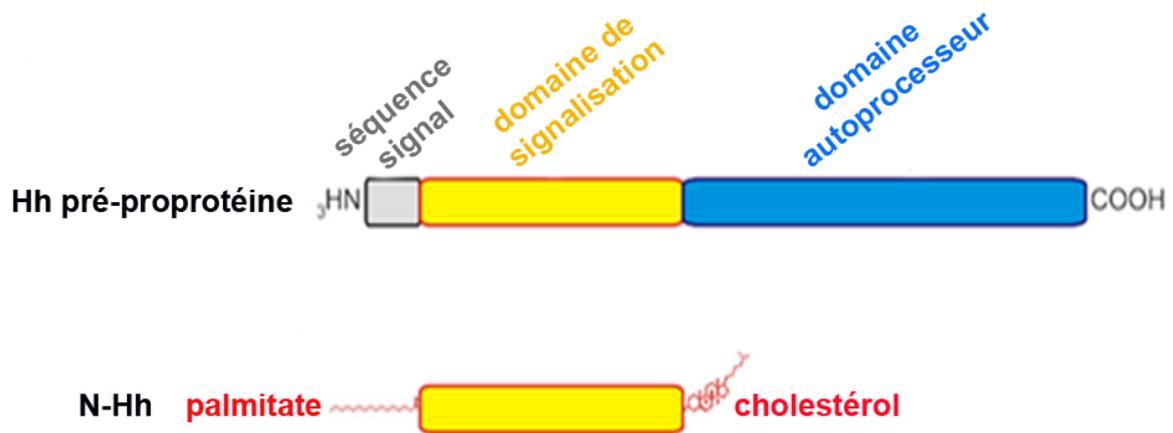


Figure 24. Représentation schématique de la structure des protéines Hh et de leur maturation (Javitt, 2008)

1.4.1.2 Signalisation

En premier lieu établie chez la drosophile, la cascade d'évènement de la voie de signalisation induite par *HH* est pour l'essentiel conservée à travers les espèces. L'interaction des protéines HH avec leur récepteur spécifiques Patched est la première étape. En absence de liaison des protéines HH, Patched inhibe l'activité de SMO (smoothened), une protéine analogue aux récepteurs à sept segments transmembranaires couplés aux protéines G. Cette levée d'inhibition de SMO active des voies de signalisation en aval : la voie canonique HH menant à l'activation des facteurs de transcription GLI et les voies non canoniques qui sont indépendantes de SMO et/ou de GLI (Robbins et al., 2012) (Figure 25).

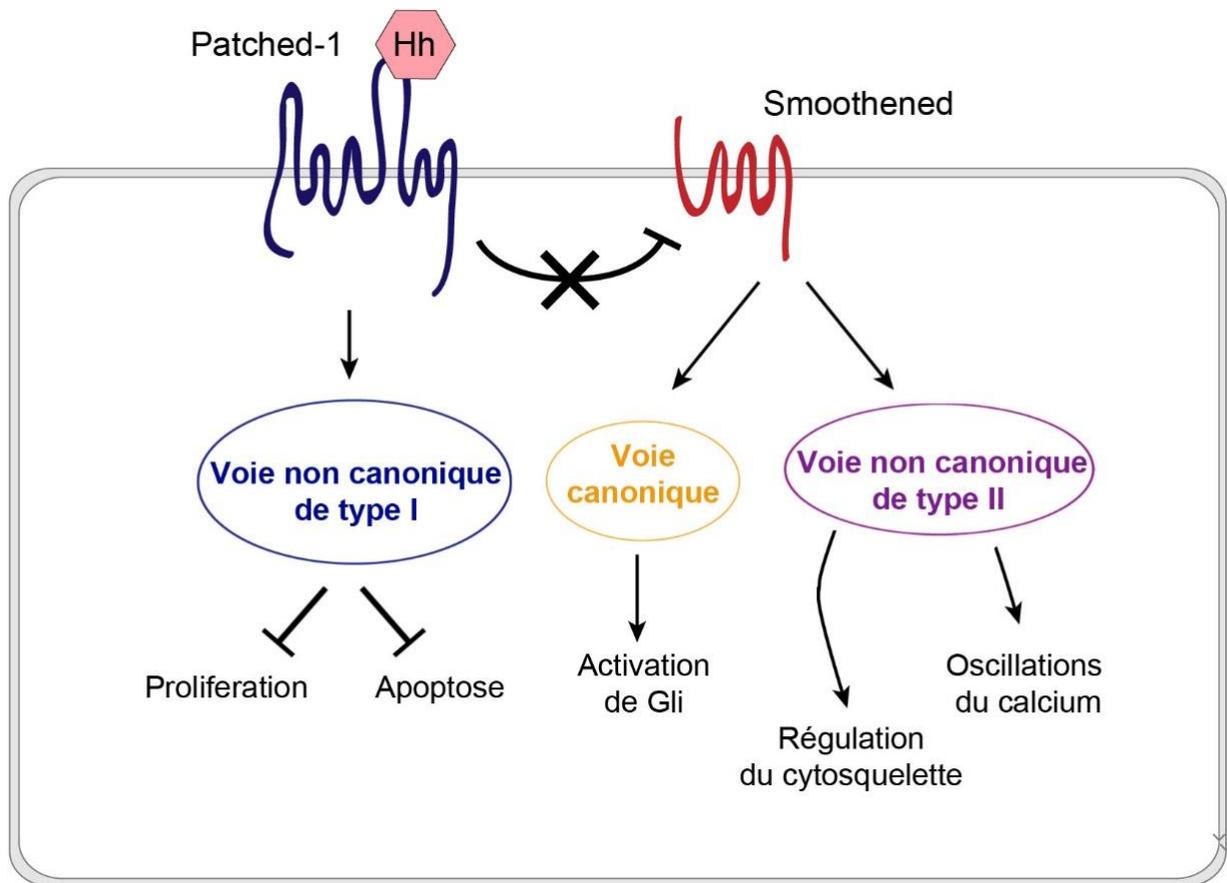


Figure 25. Les voies de signalisation Hh canoniques et non canoniques

1.4.1.2.1 La voie canonique

1.4.1.2.1.1 Patched

Il existe deux gènes Patched (*PTCH*) : *PTCH1* et 2. Ils codent pour des protéines à douze domaines transmembranaires. Ces deux récepteurs semblent identiques en termes de liaison des trois morphogènes *Hh*. Ces deux gènes présentent 73% d'homologie de structure et la région la plus variable se trouve essentiellement au niveau des domaines transmembranaires 6 et 7. *PTCH1* est nécessaire au développement normal du système nerveux central, à la croissance du squelette et des membres ainsi qu'à la régulation de la taille de l'embryon chez la souris ; un défaut d'expression de *PTCH1* est létal dès les premiers stades de l'embryogenèse et les embryons mutants présentent une petite taille associée à des défauts de développement du tube neural, des anomalies des pattes postérieures ainsi que des polydactylies (Milenkovic et al., 1999). Contrairement à *PTCH1*, *PTCH2* n'est pas indispensable au développement embryonnaire chez les mammifères.

Cependant chez l'adulte, son absence se traduit par une hyperplasie de l'épiderme, des ulcérations et une alopecie qui conduisent à penser que *PTCH2* est nécessaire à l'homéostasie de la peau chez l'adulte (Nieuwenhuis et al., 2006).

1.4.1.2.1.2 Smoothened

SMO est une protéine à sept domaines transmembranaires qui appartient à la famille de récepteurs frizzled/taste2. Ce groupe de récepteurs se lie généralement aux protéines G hétérotrimériques pour transduire le signal et stimuler l'activité des lipides et des protéines kinases. Le couplage de SMO aux protéines G reste cependant controversé. Les études réalisées chez les vertébrés suggèrent la capacité de SMO à s'associer directement aux membres de la famille des protéines Gi, et ce de façon sélective. Les preuves de ce couplage sont bonnes mais ne sont pas concordantes avec le consensus issu des travaux effectués chez la drosophile suggérant que SMO ne s'associe pas aux protéines G. Mais cela peut s'expliquer par le fait qu'il existe des différences significatives en termes de structure primaire entre la protéine SMO chez la drosophile et chez les vertébrés. L'extrémité C terminale de SMO est également un site important pour la production d'un signal agissant sous le contrôle de la β -arrestin-2 qui interagit avec des protéines G monomériques, des composants de la cascade de signalisation de la MAPK (mitogen-activated protein kinase) et des tyrosines kinases non-récepteurs (Ayers and Théron, 2010; Riobo and Manning, 2007).

1.4.1.2.1.3 De Patched à Smoothened

Plusieurs hypothèses sont évoquées pour expliquer la levée de la répression de SMO par PTCH1 : la première suggère que PTCH1 agit via un mécanisme catalytique (1 molécule de PTCH1 inhibe 250 molécules de SMO) mais également en modulant la concentration intracellulaire en cholestérol (Bidet et al., 2011), la seconde suggère que la répression est induite par la formation d'un complexe physique entre SMO et PTCH1, la troisième suggère que PTCH1 agit via une activité mimant celle d'un canal qui met en jeu son domaine stérol (Huangfu and Anderson, 2006).

1.4.1.2.1.4 Les facteurs de transcriptions Gli

La transduction du signal à partir de SMO conduit à l'activation des facteurs de transcription GLI. Les facteurs de transcriptions GLI1, GLI2 et GLI3 sont des protéines à doigts de zinc (cinq domaines à doigts de zinc de liaison à l'ADN) qui présentent un certain nombre de domaines communs mais qui diffèrent par leur extrémité N-terminale. Dans la structure des protéines GLI, on observe la présence de séquences de dégradation (les degrons) à

proximité desquelles se trouve le site de liaison de SUFU (suppressor of fused). Chez les mammifères, la protéine SUFU participe à la régulation des facteurs de transcriptions GLI.

En l'absence des ligands HH, PTCH inhibe SMO, SUFU est alors associé aux facteurs GLI. Cela conduit à la formation d'un complexe de dégradation cytoplasmique dans lequel les membres de la famille GLI (GLI1, 2 et 3) sont phosphorylés par des kinases (CKI (caséine kinase I), GSK3 β (glycogène synthase kinase-3 β) et PKA (Kinzler et al., 1987; Price, 2006)). Les facteurs GLI phosphorylés sont alors ubiquitinylés et pris en charge par le protéasome. GLI1 est totalement dégradé. GLI2 et GLI3 sont eux partiellement dégradés, libérant leur extrémité N-terminale qui fonctionne comme un répresseur transcriptionnel (Jiang and Struhl, 1998; Koike et al., 2000; Saitoh and Katoh, 2001).

En présence des ligands HH, SMO active la STK36 (serine/threonine-protein kinase 36) qui phosphoryle SUFU, cela a pour conséquence la libération des facteurs GLI de leur complexe répresseur et leur translocation nucléaire sous leur forme complète. Dans le noyau, les facteurs GLI vont alors activer la transcription de gènes cibles (Carpenter et al., 1998; Hallikas et al., 2006; Kasper et al., 2006; Yoon et al., 2002). GLI1 semble fonctionner dans le cadre d'une boucle de rétrocontrôle positif et bien que GLI2 agisse principalement comme facteur transcriptionnel activateur et GLI3 comme facteur transcriptionnel répresseur de la voie HH, l'ensemble des protéines GLI partage une fonction activatrice commune (Bai et al., 2004; Buttitta et al., 2003; McDermott et al., 2005; Motoyama et al., 1998). GLI2 contribue également de façon mineure à la répression de la voie HH (Buttitta et al., 2003; McDermott et al., 2005; Pan et al., 2006).

1.4.1.2.1.5 Autres acteurs

Lors de la liaison des ligands HH à leur récepteur, l'initiation du signal par les protéines HH nécessite la formation d'un complexe ternaire qui comprend HH, PTCH1 et les protéines BOC (Brother of CDON) ou CDON (homologues of the drosophila iHog). BOC et CDON appartiennent à la superfamille des immunoglobulines des protéines transmembranaires simples. Ces protéines s'associent aux HH et régulent leur gradient de concentration à la membrane et ainsi permettent l'action des HH (Riobo and Manning, 2007). D'autres protéines interagissent avec les protéines HH : HHIP (Hedgehog Interacting Protein 1) qui code pour une glycoprotéine associée à la membrane (Chuang and McMahon, 1999) et Gas1 (Growth Arrest Specific 1) qui lie le GPI (glycophosphatidylinositol) (Del Sal et al., 1992). Il a été montré que GAS1 est capable d'activer la signalisation HH (Martinelli and Fan, 2007) alors que HHIP1 l'inhibe (Hammond and Whitfield, 2009; McLellan et al., 2008).

PTCH2 interagit également avec HHIP et GAS1 et ensemble, leur liaison aux HH régule le niveau et l'efficacité de leur signalisation (Abe et al., 2008; Wang et al., 2007).

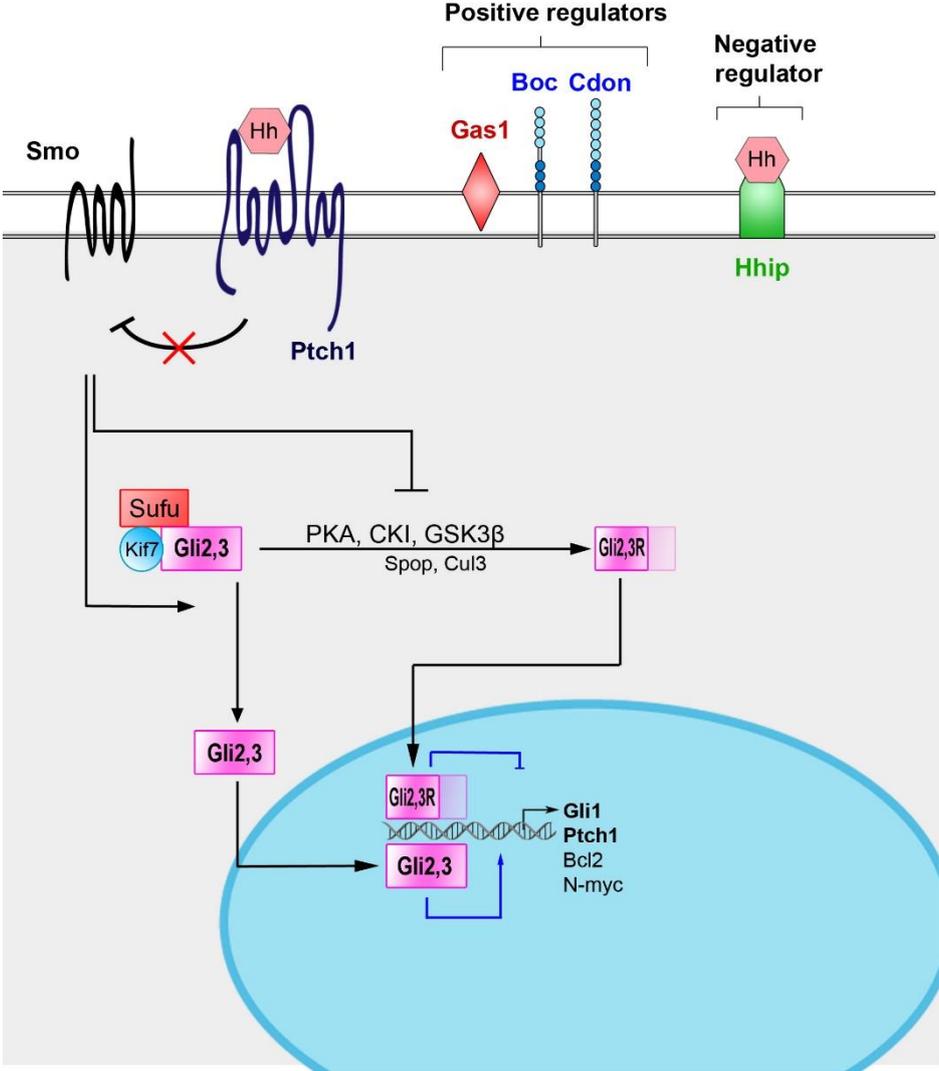


Figure 26. La voie de signalisation Hh canonique (Caradu et al., 2018a).

1.4.1.2.2 Les voies non canoniques

1.4.1.2.2.1 La voie non canonique de type I

En plus de la signalisation canonique, un nombre d'étude grandissant suggèrent que les protéines HH peuvent agir via des voies de signalisation non canoniques (Figure 27). PTCH1 peut fonctionner en tant que récepteur à dépendance, induisant l'apoptose des cellules quand il n'est pas lié à son ligand, ce qui engendre un état de dépendance des cellules à leur ligand pour leur survie. En effet, la surexpression de *PTCH1* dans différents modèles *ex vivo* et *in vitro* induit de l'apoptose (Thibert et al., 2003). De plus, la délétion de *PTCH1* dans les cellules endothéliales augmente leur survie et limite l'activation de la caspase 3 (Chinchilla et al., 2010). PTCH1 contient un domaine ADD (pro-apoptotic « addiction/dependence domain ») commun aux récepteurs à dépendance qui interagit avec les composants intracellulaires et induit la mort cellulaire. Ce domaine est présent sur la partie C-terminale de PTCH1 et est exposé après clivage par des caspases (Kagawa et al., 2011; Thibert et al., 2003). Des mutations de PTCH1 sur le site de clivage permettant d'exposer le domaine ADD abolissent l'apoptose dépendante de PTCH1. De plus, un PTCH1 tronqué au C-terminal, reproduisant la forme clivée par les caspases, induit la mort cellulaire même en présence de SHH. Les trois morphogènes HH des vertébrés ont montré un effet antiapoptotique en culture cellulaire qui n'a pas pu être bloqué par les différents antagonistes de SMO, ni reproduit par la surexpression de *SMO* ou l'agoniste de SMO et indépendant de l'activité transcriptionnelle de *GLI* (Chinchilla et al., 2010). Ces résultats suggèrent que ce mécanisme de signalisation est dépendant des protéines HH et de PTCH1 mais indépendant de SMO.

Dans les cellules épithéliales, SHH et PTCH1 participent à la régulation du cycle cellulaire indépendamment des autres composants en aval de la voie en régulant l'équilibre de l'import/export nucléaire de la cyclin B1, régulateur de la division cellulaire (Barnes et al., 2001).

1.4.1.2.2.2 La voie non canonique de type II

La voie non canonique de type II est dépendante de SMO et fait appel à l'activation des voies de signalisation indépendante de *GLI*, notamment via l'activation d'une protéine G. La protéine G_i associée à SMO peut mener à l'activation de petites GTPases, comme RhoA et Rac1. Ainsi, il est supposé que SMO prévient l'activation de RAC1 par son interaction avec TIAM1 en absence de ligand HH. SMO engage également des voies de signalisations dépendantes du calcium (PKC), via la production d'IP3 (Belgacem and Borodinsky, 2011).

La voie non canonique est ainsi impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine et stimule la migration des fibroblastes *in vitro* (Polizio et al., 2011).

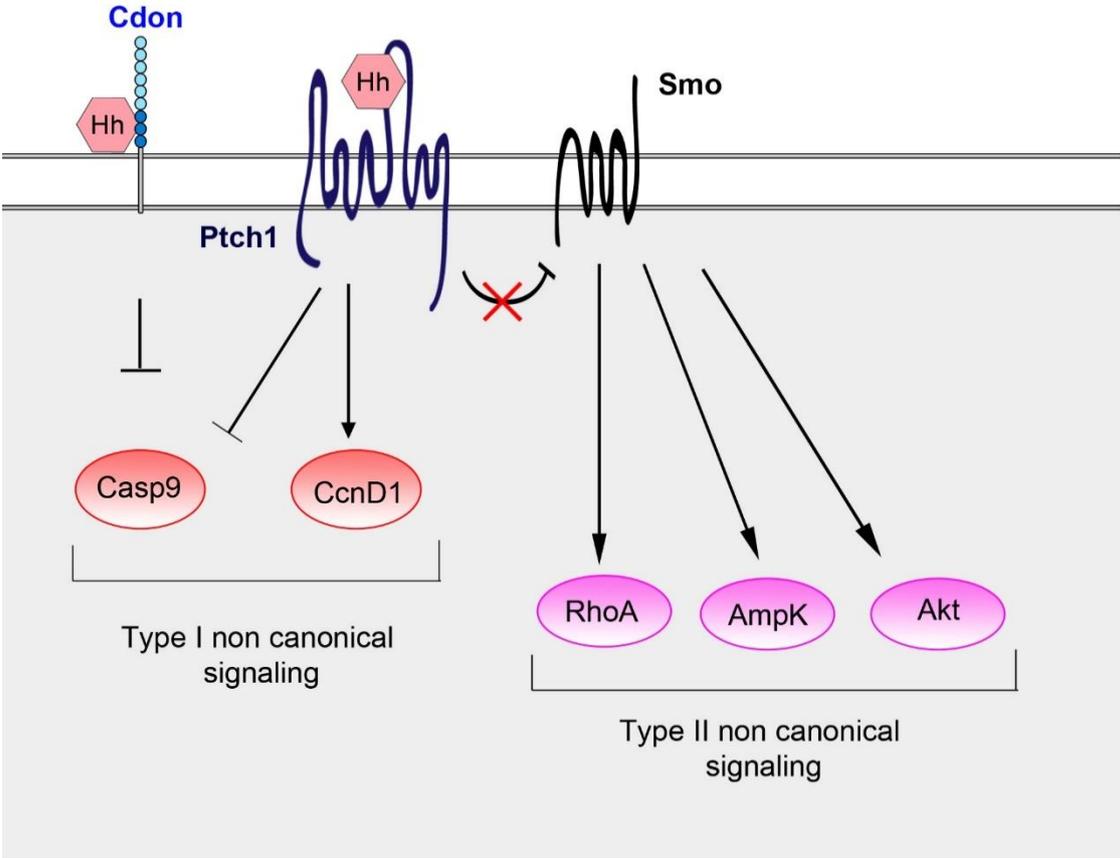


Figure 27. La voie de signalisation Hh non canonique I et II (Chapouly et al., 2019) .

1.4.1.3 Rôle dans le développement

Au cours du développement embryonnaire, la voie de signalisation HH joue un rôle majeur dans la régulation des interactions mésenchyme/épithélium. Des trois protéines, SHH est la plus exprimée pendant le développement et son absence chez la souris (*Shh*^{-/-}) est létale dès les premiers stades du développement embryonnaire. SHH est impliquée dans le développement de plusieurs organes comprenant le SNC, les poumons, l'estomac, le cœur et les membres (Bitgood and McMahon, 1995). La déficience en *IHH* (*Ihh*^{-/-}) est létale et entraîne des anomalies du tube digestif et des os, montrant son implication dans le développement de ces organes (Ramalho-Santos et al., 2000; St-Jacques et al., 1999). Quant à DHH, il organise le développement des testicules et des nerfs périphériques puisque les souris déficientes en *DHH* (*Dhh*^{-/-}) sont viables mais présentent des anomalies gonadiques et nerveuses (Bitgood et al., 1996; Parmantier et al., 1999). Les ligands HH participent à trois grands processus au cours du développement embryonnaire : la régulation de l'organisation spatiale de l'embryon, la spécification cellulaire et la régulation de la différenciation et de la prolifération cellulaire.

1.4.1.4 Rôle dans le cancer

Une dysfonction ou une activation aberrante de la signalisation HH est associée à divers cancers (Taipale and Beachy, 2001), telle que le naevomatose basocellulaire (syndrome de Gorlin), le carcinome basocellulaire, le médulloblastome, le rhabdomyosarcome et le méningiome entre autres (Hahn et al., 1996). La voie HH contribuerait au développement d'un tiers des tumeurs malignes (Murone et al., 1999). Cette activation anormale de la voie HH dans les cancers est causée soit par des mutations dans des gènes codant pour des éléments de la voie de signalisation (indépendante de ligand), soit par la surexpression d'un ligand HH (dépendante de ligand). L'activation aberrante de la voie HH ou l'expression excessive de molécules de signalisation HH semblent favoriser le développement des cancers en stimulant la prolifération cellulaire (Taipale and Beachy, 2001).

1.4.1.4.1 Mutations de Ptch1

Les liens entre les mutations et le cancer ont été établis pour la première fois en 1996 lorsque des mutations inactivant le récepteur PTCH1 ont été identifiées dans le carcinomes basocellulaire et le syndrome de Gorlin (Hahn et al., 1996; Uden et al., 1996). Des mutations somatiques de PTCH1 sont également retrouvées dans des médulloblastomes et des carcinomes basocellulaires. Ces mutations entraînent une activation constitutive de la protéine SMO en l'absence de la protéine fonctionnelle PTCH1. Il s'agit de cancers indépendants des ligands HH (Figure 28).

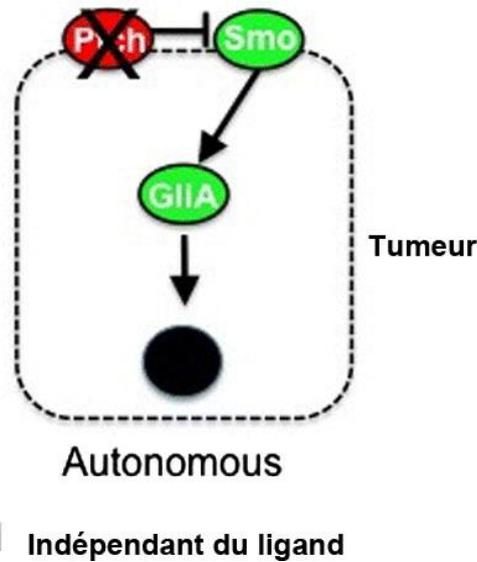


Figure 28. Perturbation de la signalisation Hh dans une tumeur indépendante du ligand, *Ptch1* dépendante (Marini et al., 2011)

1.4.1.4.2 Surexpression des ligands Hh

La surexpression de *SHH* ou *IHH* a été montrée dans différents cancers dit dépendants du ligand, notamment le cancer de la prostate (Fan et al., 2004; Karhadkar et al., 2004; Sanchez et al., 2004), du pancréas (Thayer et al., 2003), du tractus gastrointestinal (Berman et al., 2003), des poumons (Watkins et al., 2003a), du foie (Sicklick et al., 2006), du sein (Kubo et al., 2004) et du cerveau (Kinzler et al., 1987). Dans ces cancers, les ligands agissent de façon autocrine ou paracrine pour stimuler la prolifération des cellules tumorales (autocrine pour le cancer bronchique à petites cellules, les cancers du tractus digestif (Berman et al., 2003; Watkins et al., 2003b) ; paracrine pour le gliome et lymphome à lymphocytes B (Dierks et al., 2007)) ou des cellules stromales (desmoplasie pancréatiques, adénocarcinome du pancréas et du colon (Bailey et al., 2008; Chen et al., 2011a; Korc, 2007; Nakamura et al., 2010; Tian et al., 2009; Yauch et al., 2008)) (Figure 29).

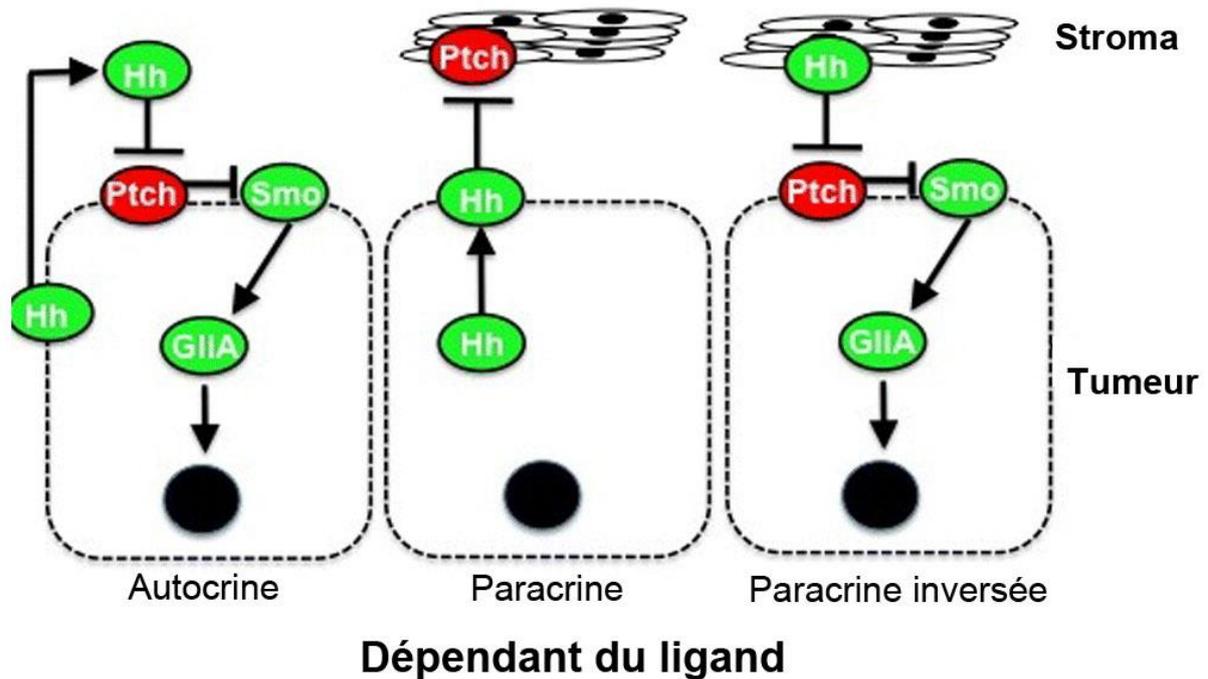


Figure 29. Les modes de recrutement des ligands Hh par les cellules tumorales (Marini et al., 2011)

1.4.1.4.3 Surexpression des facteurs de transcription Gli

La surexpression des facteurs de transcriptions *GLI* peut entraîner le développement de certains cancers, comme dans le mélanome induit par NRAS (neuroblastoma rat sarcoma viral oncogen homologue) (Stecca et al., 2007), la tumorigenèse pancréatique induite par KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogen homologue) (Ji et al., 2007) ou bien dans le cancer du sein métastatique induit par le TGF β 1 (Johnson et al., 2011).

1.4.1.5 Les modulateurs pharmacologiques de la voie Hh dans les essais cliniques

1.4.1.5.1 Antagonistes de la voie de signalisation Hh

Les acteurs de la voie de signalisation HH sont aujourd'hui la cible de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement du cancer. Dans les années 1950, dans une ferme de l'Idaho, USA, plusieurs moutons consommant des graines de fleur sauvage de la famille oxyselalum ont donné naissance à des cyclopes. Après 11 ans d'investigation un alcaloïde produit par cette plante et responsable de la malformation des animaux a été découvert et nommé cyclopamine (dérivé du terme cyclope)(Keeler and Binns, 1968). La cyclopamine inhibe SMO via une interaction directe avec cette protéine : le premier inhibiteur de la voie HH était né (Incardona et al., 1998; Berman et al., 2002; Chen et al., 2002). Un

dérivé de la cycloamine, l'IPI-926 ou Pipeline-Saridegib (Infinity Pharmaceuticals), plus facile à produire et plus soluble a été étudié comme agent thérapeutique potentiel. Puis de nombreux inhibiteurs de SMO qui diffèrent en structure de la cycloamine ont été développés : le GDC 0449 ou Vismodegib (Genentech/Curis), le LDE 225 et le LEQ 506 (Novartis Pharmaceuticals), le BMS-833923 ou XL-139 (Bristol-Myers Squibb), le PF-0449913 (Pfizer), le LY2940680 (Lilly) et les SANT 74-75 (Merck Chemicals) ; l'ensemble de ces molécules empêche le passage de SMO de sa forme inactive à sa forme active. Des inhibiteurs du transport de SMO inactif du cytoplasme vers le cil primaire sont également développés : les SANT 1-4 (Merck Chemicals) (Buonamici et al., 2010; Rudin et al., 2009; Tremblay et al., 2009; Y and M, 2005; Yang et al., 2009). Si les études actuelles se focalisent sur les inhibiteurs de SMO, il existe également des molécules qui agissent sur d'autres cibles de la signalisation HH : certaines bloquent la transcription de GLI comme les GANT 58 et 61 (Tocris Bioscience) (Lauth et al., 2007), d'autres comme la robotnikinin (Harvard Scientists) se fixent à SHH et empêchent sa fixation sur PTCH1 (Stanton et al., 2009).

1.4.1.5.2 Agonistes de la voie de signalisation Hh

Il existe des activateurs naturels de la voie de signalisation HH, tels que le cholestérol et certains oxystérols qui activent SMO en se liant à son domaine extracellulaire (Huang et al., 2016; Nedelcu et al., 2013). De plus deux agonistes ont été décrits, le Smothened Agonist et la purmorphamine, qui se fixent directement sur le récepteur SMO, entraînant son activation via un changement de conformation protéique. Leur effet agoniste a été caractérisé dans des cellules en culture, telles que les fibroblastes et les cellules mésenchymateuses (Stanton and Peng, 2010), et *in vivo* notamment dans l'ischémie du membre inférieur (Caradu et al., 2018a), la neuropathie diabétique la démence induite par le VIH (Singh et al., 2017), l'AVC (Chechneva et al., 2014) et la trisomie 21 (Trazzi et al., 2011).

1.4.2 Signalisation Hh et système vasculaire

La voie de signalisation HH a un rôle crucial au niveau vasculaire cependant son étude est difficile et la littérature reste encore contradictoire quant aux différents mécanismes intracellulaires utilisés.

1.4.2.1 Rôle dans le développement du système vasculaire

La voie HH est importante dans le développement de la vascularisation du sac vitellin, puisque les embryons déficients pour *SMO* (*Smo*^{KO}) ne développent pas de vaisseaux sanguins au niveau du sac vitellin (Byrd et al., 2002). IHH semble être le principal ligand responsable de cet effet cependant sa délétion n'abolit pas totalement la formation de vaisseaux sanguins, suggérant une implication de SHH et/ou DHH dans la vascularisation du sac vitellin ou qu'ils compensent les effets d'IHH en son absence (Dyer et al., 2001; Nagase et al., 2006).

Dans le cœur, il a été montré que SHH est nécessaire pour l'expression de *VEGFA*, *VEGFB*, *VEGFC* et *ANGPT2* induite par le facteur de croissance FGF9 (fibroblast growth factor 9) dans les cardiomyocytes et les cellules périvasculaires (Lavine et al., 2006). La signalisation HH aux cardiomyocytes est nécessaire au développement des veines coronaires, tandis qu'elle semble moins l'être pour la croissance des artères coronaires (Lavine et al., 2008).

1.4.2.2 Rôle dans l'angiogenèse

Ajouté à son rôle dans la vascularisation embryonnaire, la voie HH a aussi été impliqué dans la régulation post-natale de l'angiogenèse, particulièrement dans le cadre de l'ischémie (Pola et al., 2001) et du cancer (Chen et al., 2011b).

Dans le muscle ischémié, la voie HH est réactivée et semble promouvoir la revascularisation des tissus ischémiques. En effet, son inhibition diminue la densité capillaire et la reperfusion du muscle ischémié tandis que sa suractivation augmente la densité capillaire

Néanmoins, le(s) ligand(s) HH régulant l'angiogenèse induite par l'ischémie n'ont pas encore été identifiés. En effet, chez les souris délétées pour *Shh* chez l'adulte (Caradu et al., 2018b), l'angiogenèse est transitoirement accélérée, suggérant que SHH endogène serait anti-angiogénique. Par ailleurs, nous avons démontré que l'angiogenèse est altérée chez les souris délétées pour *Dhh* chez l'adulte (résultats non publiés). De plus, l'activation de la voie de signalisation HH dans les cellules endothéliales ne semble pas intervenir dans l'angiogenèse post-ischémique. En effet, les souris dont les cellules endothéliales sont déficientes en *Smo* ne présentent pas de modifications de l'angiogenèse. Il est proposé que le voie de signalisation HH améliore l'ischémie du membre inférieur en rétablissant l'intégrité de la cellule endothéliale sans promouvoir l'angiogenèse (Caradu et al., 2018a).

Les propriétés pro-angiogéniques des protéines HH se retrouvent dans d'autres tissus ischémiques notamment le cœur (Ahmed et al., 2010; Kusano et al., 2005), le cerveau

(Chechneva et al., 2014; Chen et al., 2017; Jin et al., 2017), la peau (Asai et al., 2006) et les nerfs périphériques (Kusano et al., 2004). Dans ces organes, l'administration de SHH ou d'un agoniste de SMO augmente la densité capillaire après une ischémie. De même que pour l'ischémie du membre inférieur (Gupta et al., 2018; Renault et al., 2013), l'angiogenèse induite par SHH dans le cœur n'implique pas l'activation de la voie HH dans les cellules endothéliales (Gupta et al., 2018), et, au contraire, est associée à une augmentation des taux de VEGFA.

L'hyperactivation de la voie HH dans les tumeurs, discutée précédemment, est supposée promouvoir l'angiogenèse et être en partie responsable de l'invasion vasculaire tumorale. En effet, l'inhibition de SMO diminue la densité vasculaire de xénogreffes de cancer du côlon (Chen et al., 2011b) et de carcinome basocellulaire squameux (Kuroda et al., 2017) ou de mélanome (Geng et al., 2007) produisant des protéines HH. Cette hyperactivation par les cellules cancéreuses (i.e. la surexpression de *GLI1* ou de *SHH*), augmente l'expression de facteurs pro-angiogéniques comprenant le VEGFA (Cao et al., 2012; Cui et al., 2012; Liao et al., 2009), MMP2, MMP9 (Cui et al., 2012) et l'héparanase (Zhu et al., 2014)

1.4.2.3 Rôle dans le maintien de l'intégrité vasculaire

1.4.2.3.1 Maintien des jonctions inter cellules endothéliales

Le rôle de la voie de signalisation HH dans le maintien de l'intégrité des jonctions inter-cellules endothéliales a été mis en évidence pour la première fois en 2011 par l'équipe d'A. Prats. Dans cette étude, les auteurs démontrent que la voie de signalisation HH est nécessaire au maintien de l'intégrité de la BHE chez l'embryon et chez l'adulte et que les cellules endothéliales sont les cellules médiatrices de ces effets (Alvarez et al., 2011; Hollier et al.). Plus précisément, l'activation de la voie de signalisation HH dans les cellules endothéliales diminue la perméabilité de la BHE et augmente la résistance électrique trans-endothéliale en favorisant l'interaction de la CDH5 avec la β -caténine et en stimulant l'expression des protéines de jonctions serrées (CLDN5, Occludine, JAM-A et ZO-1) (Alvarez et al., 2011; Wang et al., 2014).

L'intégrité de la BHE chez l'embryon semble dépendre de SHH qui est produit par les astrocytes (Alvarez et al., 2011) alors que chez l'adulte, elle dépend de DHH. DHH est produit par les cellules endothéliales elles-mêmes sous le contrôle de KLF2 (Krüppel-like Factor 2) et agit sous sa forme longue de 43 kDa (Hollier et al.).

Notamment DHH ne régule pas uniquement l'intégrité des jonctions inter-cellules endothéliales dans le cerveau mais aussi dans le nerf sciatique (Chapouly et al., 2016), le

cœur et les poumons. En effet, les souris déficientes pour DHH spécifiquement dans les cellules endothéliales (Dhh^{ECKO}) présentent une perméabilité vasculaire spontanée et exacerbée dans le cerveau, les poumons et le cœur (Hollier et al.; Caradu et al., 2018a; Hollier et al., 2020). De plus l'organisation des jonctions adhérentes des cellules endothéliales de l'aorte est altérée.

Dans des conditions pathologiques, notamment dans la neuro-inflammation ou le Glioblastome, *SHH* et *DHH* sont respectivement surexprimés dans les astrocytes (Alvarez et al., 2011; Hollier et al.) et les cellules cancéreuses (Azzi et al., 2015) sous la forme de protéines maturées et inhibe les effets de DHH par compétition (Hollier et al.).

1.4.2.3.2 Régulation de l'Activation des CE

En plus de réguler l'intégrité des jonctions intercellulaires, DHH prévient l'activation de cellules endothéliales en inhibant l'expression des molécules d'adhésion, ICAM-1, VCAM-1 et l'expression des cytokines pro-inflammatoires CCL2 et IL-6 dans les cellules endothéliales. En conséquence, le recrutement des neutrophiles dans le poumon des souris Dhh^{ECKO} traitées par le LPS est exacerbé. De plus, des données intéressantes montrent qu'un traitement avec DHH ou le Smoothed Agonist peut prévenir l'augmentation de l'expression de *VCAM-1* induites par le TNF- α (Caradu et al., 2018a; Yang et al., 2011).

1.4.2.3.3 Régulation de la vasomotricité

Aussi, les protéines HH pourraient également réguler les propriétés vasoactives des cellules endothéliales puisque l'administration de microparticules contenant SHH stimule l'expression de la NOSe et sa phosphorylation (Benameur et al., 2010; Agouni et al., 2007). De plus, les microparticules contenant SHH corrigent l'ischémie-reperfusion (Agouni et al., 2007) ou l'altération de la vasorelaxation induite par l'angiotensine-II (Marrachelli et al., 2013) et l'augmentation de l'expression de HHIP à la surface des microparticules dérivées de l'endothélium dans le cas de la maladie du greffon contre l'hôte aigue promeut l'apoptose des cellules endothéliales et la diminution de l'expression de la NOS3 (Nie et al., 2016).

1.4.2.4 Signalisation Hh dans les CE

Aujourd'hui, la (ou les) voie(s) de signalisation induite par DHH pour maintenir l'intégrité vasculaire n'est pas connue. DHH produit par la cellule endothéliale agit de manière autocrine pour maintenir l'intégrité vasculaire. L'implication de la voie canonique semble peu probable car plusieurs études suggèrent que la voie canonique n'est pas fonctionnelle dans les cellules endothéliales et qu'à l'inverse, la signalisation des ligands HH passerait par les

voies non-canoniques de type I et II via l'activation des voies RhoA/ROCK (Chinchilla et al., 2010; He et al., 2013; Polizio et al., 2011; Renault et al., 2010) ou PI3K/Akt (Kanda et al., 2003; Renault et al., 2010). Les cellules endothéliales de veine de cordon ombilical humain (HUVECs) et les cellules endothéliales microvasculaires (HMVECs) changent profondément de morphologie en présence de SHH, IHH ou DHH. La stimulation des cellules endothéliales par les ligands HH résultent en la formation de fibre de stress d'actine et de tubulogenèse, suggérant l'activation d'une voie de signalisation non canonique au vu de l'absence de transcription détectable de GLI (Chinchilla et al., 2010; Renault et al., 2010).

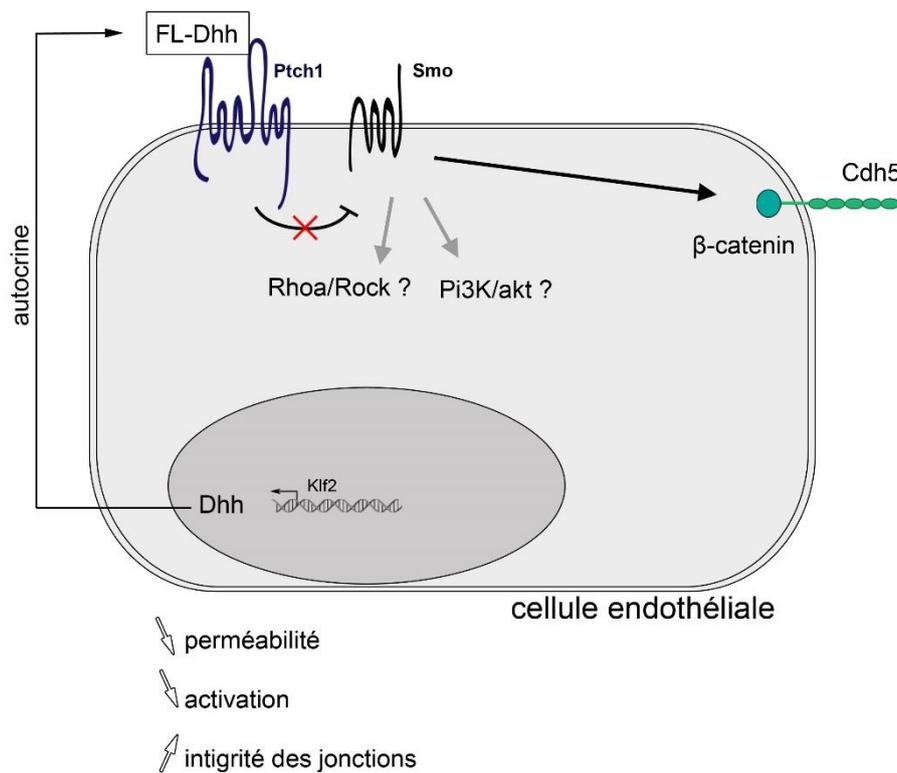


Figure 30. Schéma résumant l'état de l'art concernant la signalisation Hh dans les cellules endothéliales.

1.5 ADAM17

ADAM17 est un membre de la famille des protéases ADAM (A Disintegrin and Metalloprotease). ADAM17 a été découverte en 1997 et tout d'abord appelée TACE (TNF- α converting enzyme), décrite simultanément par deux groupes de recherche comme l'enzyme clivant le TNF- α transmembranaire en TNF- α soluble (Black et al., 1997; Moss et al., 1997). Il est évident aujourd'hui que ce n'est pas la seule fonction d'ADAM17.

1.5.1 Rôles physiologiques et pathologiques d'ADAM17

L'étude des rôles physiologiques et physiopathologiques d'ADAM17 est complexe car la délétion du gène chez la souris est létale (Peschon et al., 1998). La fonction catalytique d'ADAM17 la plus connue est de cliver l'ectodomaine de diverses protéines transmembranaires. La protéolyse se produit généralement au niveau de la partie proche de la membrane de la molécule. Après le clivage, les molécules se lient à leur récepteur sur la même cellule (effet autocrine) ou peuvent lier des récepteurs sur des cellules proches ou plus éloignées (effet juxtacrine et paracrine) et même circuler dans le sang (effet endocrine). Il a été montré qu'ADAM17 a plus de quatre-vingt-dix protéines de nature très variée comme substrats (Tableau 4), suggérant l'implication de cette enzyme dans de nombreux processus physiologiques.

Tableau 4. Certains substrats d'ADAM-17, protéines pour lesquelles il existe une évidence qu'ADAM17 est responsable du clivage ou y participe.

Substrats	Références
Growth hormone receptor	(Schantl et al., 2004)
Il-6 receptor	(Matthews et al., 2003)
L-selectin	(Wang et al., 2010)
Transforming growth factor- α	(Le Gall et al., 2009)
Tumor necrosis factor- α	(Black, 2002)
Tumor necrosis factor receptor I	(McMahan et al., 2013)
Tumor necrosis factor receptor II	(DeBerge et al., 2015)
Vascular cell adhesion molecule 1	(Garton et al., 2003)

Cette enzyme serait impliquée dans la régulation du développement car des facteurs de croissance et leurs récepteurs sont substrats d'ADAM17. Elle joue aussi un rôle dans la régulation des signaux générés par les récepteurs Notch qui agissent sur la prolifération, la différenciation et l'apoptose à tous les stades du développement (Artavanis-Tsakonas et al.,

1999). Ainsi, la mortalité précoce des souris déficientes en ADAM17 pourrait être expliquée par un défaut de maturation des protéines impliquées dans le développement.

ADAM17 a un rôle prépondérant dans l'inflammation puisqu'il clive et permet la libération de cytokines et l'activation de leurs récepteurs. L'action d'ADAM17 dans la réaction inflammatoire est double. Par exemple dans le système TNF, ADAM17 clive le TNF- α ce qui augmente la biodisponibilité de la cytokine, tandis qu'en clivant ses récepteurs, il entraîne une désensibilisation à l'action de la cytokine. Par ailleurs, ADAM17 est également impliqué dans le clivage de molécules d'adhésion et dans le contrôle de l'adhésion leucocytaire. Différentes études ont montré *in vitro* qu'ADAM17 clive la fractalkine (Garton et al., 2001; Tsou et al., 2001), la sélectine L (Peschon et al., 1998) et VCAM-1 (Garton et al., 2003). Cette régulation de l'activité des cytokines et des molécules d'adhésion semble suggérer un contrôle d'ADAM17 sur la réaction immuno-inflammatoire.

Au niveau vasculaire, ADAM17 semble jouer un rôle dans certaines pathologies. Dans la maladie génétique des petits vaisseaux CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy), impliquée dans la démence et l'AVC, TIMP3 contribue à la dysfonction cérébrovasculaire et inhibe ADAM17. En effet, TIMP3 joue sur l'inhibition d'ADAM17 afin de réguler le clivage du ligand de l'EGF et par conséquent contribue au contrôle du tonus artériel cérébral et du flux sanguin. Ce travail met en évidence le concept d'une balance entre l'activité d'ADAM17 et de TIMP3 pour réguler le flux sanguin cérébral (Capone et al., 2016).

L'inactivation d'ADAM17 dans les cellules endothéliales *in vivo* dans un modèle de néovascularisation pathologique entraîne une diminution de la croissance de cellules tumorales et de l'angiogenèse de la rétine (Weskamp et al., 2010). De plus, ADAM17 aurait un rôle dans la signalisation dépendante du VEGFA et serait impliquée dans différents processus biologiques de la cellule endothéliale.

Dans le cadre de l'anévrisme de l'aorte descendante, il a été montré qu'ADAM17 promeut l'altération de l'intégrité des cellules endothéliales et de leurs jonctions, notamment la CDH5, JAM-A et claudin (Shen Mengcheng et al., 2018).

Ces différentes études suggèrent qu'ADAM17 pourrait être un acteur important dans la régulation de l'intégrité vasculaire.

1.5.2 Structure et expression

ADAM17 est une glycoprotéine transmembranaire de Type I et son gène est localisé sur le chromosome 2 chez l'Homme (Hirohata et al., 1998) et 12 chez la souris (Cerretti et al., 1999). Elle existe sous une pro-forme de 120 kDa et une forme mature de 90 kDa. L'expression d'ADAM17 est ubiquitaire et elle est fortement exprimée dans divers tissus tels que le cerveau, le cœur, le rein et le muscle squelettique. Son expression varie pendant le développement embryonnaire et la vie adulte (Black et al., 1997).

Chaque domaine structural composant ADAM17 est directement ou indirectement un régulateur potentiel de son activité enzymatique (Figure 31). La partie cytoplasmique peut établir des interactions avec des protéines cytoplasmiques telles que SAP97 (synapse-associated protein 97) (Peiretti et al., 2003), FHL2 (four and a half lim domain 2) (Canault et al., 2006a; Peiretti et al., 2003) et la kinase ERK (Soond et al., 2005), contribuant à réguler l'activité, le transport et l'adressage d'ADAM17. Elle est également composée d'un domaine transmembranaire et d'un domaine extracellulaire. Ce dernier possède un domaine apparenté à l'EGF puis un domaine riche en cystéines permettant la reconnaissance de certains substrats et l'adhésion cellulaire. De même pour le domaine disintégrine suivant qui lie l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ (Düsterhöft et al., 2014). Le domaine proche de la membrane subit une régulation complexe et est suivie d'une séquence courte appelée le domaine CANDIS (Conserved ADAM seventeen dynamic interaction sequence) qui est un domaine essentiel à l'activité de l'enzyme (Düsterhöft et al., 2015). Le domaine catalytique d'ADAM17 contient l'ion Zn^{2+} indispensable à l'activité de l'enzyme. Le pro-domaine N-terminal est retiré en deux sites par un clivage séquentiel via la pro-protéine convertase furin (Wong et al., 2015). De façon intéressante, ce pro-domaine recombinant a été montré comme un inhibiteur de l'activité d'ADAM17 *in vitro* et *in vivo* en agissant à la manière d'une protéine chaperonne qui permettrait à l'enzyme de rester sous sa forme latente inactive et protégée de la dégradation protéolytique lors du transport intracellulaire (Milla et al., 2006; Wong et al., 2016).

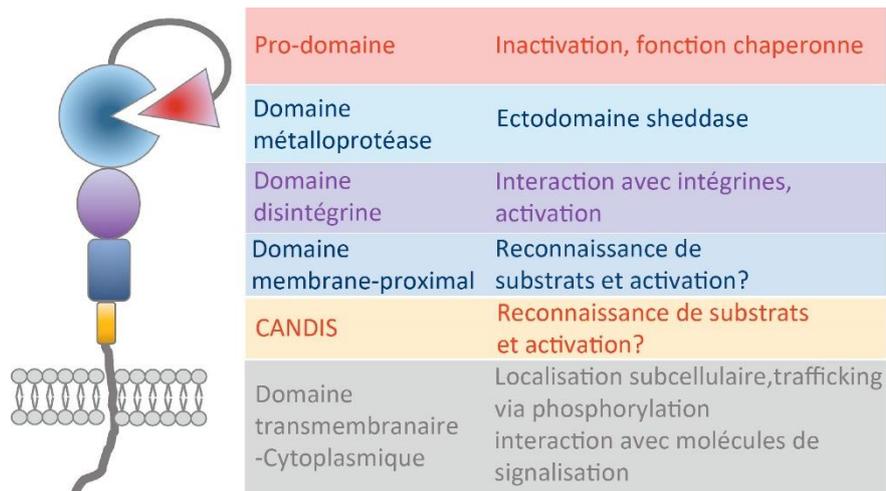


Figure 31. La structure et fonction d'ADAM17, la métalloprotéase peut être divisée en six domaines aux fonctions distinctes (Zunke and Rose-John, 2017).

1.5.3 Régulation d'ADAM17

1.5.3.1 Régulation de son expression

Dans toutes les cellules et tissus étudiés, les ARNm d'ADAM17 sont présents constitutivement. Il a été montré *in vitro* une augmentation du nombre d'ARNm d'ADAM17 dans les cellules endothéliales stimulées par des cytokines pro-inflammatoires ou des facteurs de croissance (Bzowska et al., 2004) ainsi que dans les lignées de cellules monocytaires traitées par des LDLs de patients diabétiques de type 2 (Worley et al., 2007). On retrouve ce résultat *in vivo*, dans les tissus pathologiques inflammatoires dans des cas d'ostéoarthrite, d'arthrite rhumatoïde (Patel et al., 1998), de cardiomyopathie dilatée (Sato et al., 1999) et de myocardite (Sato et al., 2000). Cependant les variations des niveaux d'ARNm observés dans la littérature ne sont jamais drastiques.

L'étude de la région 5' du promoteur du gène d'*Adam17* murin a montré l'existence de différents sites de fixation de facteurs de transcriptions comme AP2 et Sp1 (Mizui et al., 1999). Le promoteur humain contient des éléments de réponse fonctionnels à l'hypoxie (H3 et H4) qui peuvent lier le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1) (Charbonneau et al., 2007).

De même, l'expression protéique d'ADAM17 est augmentée dans diverses conditions pathologiques, notamment dans l'athérosclérose (Canault et al., 2006b) et dans l'anévrisme de l'aorte ascendante (Shen Mengcheng et al., 2018).

Néanmoins, certaines études suggèrent que la régulation du clivage des substrats d'ADAM17 requiert la modulation directe de son activité plutôt que la synthèse de l'enzyme ou de ses substrats (Yoda et al., 2013).

1.5.3.2 Régulation de son activité

Considérant le nombre élevé de ses substrats, la régulation de l'activité d'ADAM17 est cruciale. Cependant, les mécanismes cellulaires impliqués dans l'activation d'ADAM17 restent mal connus.

1.5.3.2.1 La maturation d'ADAM17 par la furine

Le clivage du pro-domaine d'ADAM17 lors du transport de la protéine dans les compartiments de l'appareil de Golgi entraîne le passage de sa pro-forme à sa forme mature. Cette étape indispensable pour obtenir la forme active d'ADAM17 est médiée par la pro-protéine convertase furine (Schlöndorff et al., 2000). Proposé nécessaire, le clivage du pro-domaine ne semble cependant pas suffisant à l'activation d'ADAM17. En effet, le pro-domaine pourrait rester associé à ADAM17 et l'activité de l'enzyme aurait lieu seulement après la dissociation du pro-domaine, permettant au site actif dépendant du Zn^{2+} d'adopter la conformation nécessaire à l'activité d'ADAM17.

1.5.3.2.2 La phosphorylation

La partie cytoplasmique possède différents sites de phosphorylation qui pourrait être des éléments de contrôle de son activation. Notamment, il a été montré que les kinase MAPK p38 et ERK peuvent phosphoryler cette partie et réguler positivement l'activité d'ADAM17 (Xu and Derynck, 2010; Xu et al., 2012). Une autre étude démontre qu'ADAM17 phosphorylée par la voie PI3 kinase activée par une phosphoinositide kinase 1 clive l'amphiréguline, ligand de l'EGFR (Zhang et al., 2006). Ces données suggèrent que la phosphorylation de la partie cytoplasmique d'ADAM17 régule son activité. Cependant, d'autres études ont montré qu'une protéine ADAM17 sans région cytoplasmique pouvait être quand même biologiquement active et cliver ses substrats (Hall and Blobel, 2012; Schwarz et al., 2013). Cela pourrait être expliqué par le fait que le domaine intracellulaire non phosphorylé promeut la fixation de TIMP3 (Xu et al., 2012), un inhibiteur endogène d'ADAM17 (Amour et al., 1998).

1.5.3.2.3 Interaction avec des protéines cytoplasmiques et localisation cellulaire

L'activité d'ADAM17 peut être modulée par l'interaction de protéines intracellulaires avec sa partie cytoplasmique. Le domaine cytoplasmique d'ADAM17 possède des motifs homologues à ceux nécessaires à la fixation des protéines comportant des séquences SH2 et SH3. De plus, l'association d'ADAM17 à une kinase ou à une phosphatase, par exemple PTPH1 (Protein-Tyrosine Phosphatase H1) (Zheng et al., 2002), souligne l'importance de la phosphorylation ou la déphosphorylation dans sa régulation. Grâce à une approche en double hybride, il a été montré que l'extrémité C-terminale d'ADAM17 est capable d'interagir avec SAP97 (Peiretti et al., 2003). Cette dernière aurait un rôle dans le processus de localisation membranaire de certains récepteurs et canaux membranaires (Fujita and Kurachi, 2000). La surexpression de SAP97 réduit fortement la libération des substrats d'ADAM17 ce qui souligne son importance dans la régulation de l'activité de clivage de l'enzyme (Peiretti et al., 2003). Le domaine cytoplasmique d'ADAM17 lie également FHL2, une protéine impliquée dans l'association de la forme mature d'ADAM17 au cytosquelette (Canault et al., 2006a). L'interaction ADAM17/FHL2 semble fonctionnelle car une délétion de FHL2 *in vitro* entraîne une augmentation d'ADAM17 à la membrane et une diminution de la libération des substrats d'ADAM17. Il n'est pas encore connu comment FHL2 et SAP97 régulent l'activité d'ADAM17. Toutefois, les deux protéines modulent la localisation cellulaire d'ADAM17, suggérant que cette action régule son activité (Canault et al., 2006a; Peiretti et al., 2003).

Le nombre de partenaires identifiés augmente mais il reste encore beaucoup à découvrir sur les mécanismes exacts et les conséquences de ces interactions sur l'activité d'ADAM17.

1.5.3.2.4 Régulation de l'activation d'ADAM17 par des inhibiteurs naturels

Des quatre TIMP, seul TIMP3 inhibe l'activité d'ADAM17, son expression est induite par le PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) et par des cytokines anti-inflammatoires comme le TGF- β (Edwards et al., 1996) mais diminuée par les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β (Bugno et al., 1999). La modulation de l'expression de TIMP3 pourrait avoir des conséquences sur l'activité d'ADAM17. D'ailleurs, parmi des souris hétérozygotes pour le récepteur à l'insuline, celles développant un diabète présentent une déficience constitutive en TIMP3 qui a pour conséquence une activité exacerbée d'ADAM17 et un excès de TNF- α circulant. L'inflammation vasculaire observée qui en résulte apporte un argument

expérimental aux complications vasculaires associées à la résistance à l'insuline et au syndrome métabolique (Federici et al., 2005).

2. Objectif de l'étude

L'IC est la première cause d'hospitalisation dans le monde avec 3,6 millions de nouveaux patients diagnostiqués chaque année. L'ICFEp représente 50% des cas d'IC, cependant, aucun traitement n'est disponible pour ces patients, notamment parce que la physiopathologie de cette maladie reste mal comprise.

Comme décrit dans l'introduction, il est actuellement proposé que la dysfonction des vaisseaux irrigant le cœur ait un rôle central dans la physiopathologie de cette maladie.

L'objectif de mon travail de thèse a donc été d'explorer le rôle de la dysfonction endothéliale dans la physiopathologie de l'ICFEp.

Plus précisément, nous nous sommes attachés :

- (1) à mieux caractériser le phénotype des vaisseaux cardiaques dans un modèle murin de dysfonction diastolique. Dans ce but, nous avons notamment choisi d'utiliser les souris femelles $Lepr^{db/db}$ qui présentent plusieurs facteurs de risque de l'ICFEp.
- (2) à mesurer les conséquences d'une dysfonction endothéliale sur la structure et la fonction cardiaque.
- (3) à mieux caractériser la voie de signalisation Hedgehog qui est notamment nécessaire au maintien de l'intégrité de l'endothélium des vaisseaux cardiaques

Une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'ICFEp et du rôle de la dysfonction endothéliale dans son développement pourrait donner lieu à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la prise en charge des patients.

3. Matériels et Méthodes

3.1 Souris transgéniques

3.1.1 Souris diabétiques et obèses *Lepr^{db/db}*

Les souris diabétiques *Lepr^{db/db}* dérivent à l'origine d'une mutation spontanée autosomique récessive dans l'allèle *lepr^{db}*, localisé sur le chromosome 4, découverte par Coleman et Hummel en 1967 (Hummel, Coleman et al. 1972). Cette mutation consiste dans le remplacement d'une guanidine par une thymidine dans cet allèle et crée un site d'épissage anormal qui conduit à l'insertion de 106 nucléotides dans le transcrit. Cette insertion provoque la perte de fonction du signal de transduction normalement induit par le récepteur à la leptine. Des souris *db/db*, sous le fond génétique C57BL/KsJ, ont été obtenues chez JAX. Les animaux mutants sont spontanément hyperphagiques et hyper-sécrètent de l'insuline, ils deviennent obèses, hyperglycémiques, hyper-insulinémiques et insulino-résistants dans les premiers mois de leur vie puis, plus tard, développent une hypo-insulinémie associée à une hyperglycémie avec un pic entre 3 et 4 mois.

Des souris sont croisées entre-elles de façon à obtenir dans une même portée des souris *db/db* et leurs contrôles sauvages. Les souris sont phénotypées par leur poids et leur couleur. Les souris sauvages sont de couleur grise, les souris hétérozygotes sont noires, non obèses et non diabétique et les souris *db/db* sont noires et obèses.

Les souris hétérozygotes et *db/db*, avec un âge compris entre 6 et 48 semaines, sont utilisées pour les expérimentations.

3.1.2 Souris Dhh^{ECKO}

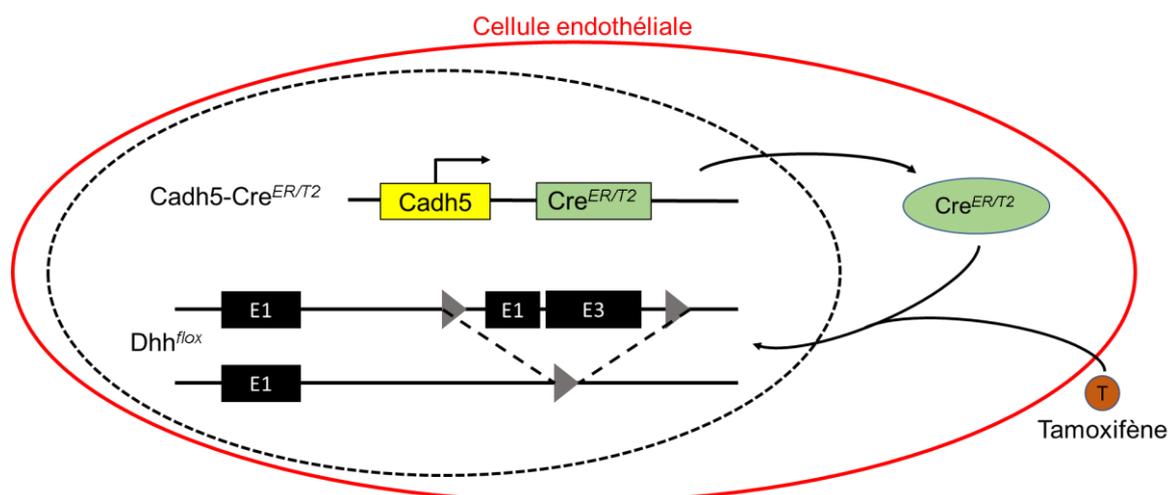


Figure 32. Schéma représentant souris DHHECKO

Les souris Dhh^{flox/flox} ont été obtenues à l'Institut Clinique de la Souris via le consortium international de phénotypage de souris à partir d'un vecteur généré par le European conditional mice mutagenesis program, EUCOMM. Les souris Cdh5-Cre^{ERT2} ont été obtenues grâce à RH. Adams. Les souris Cdh5-Cre^{ERT2} ont été génotypées avec les amorces suivantes : 5'-TAAAGATATCTCACGTA CTGACGGTG-3' et 5'-TCTCTGACCAGAGTCATCCTTAGC-3' qui amplifient 493 pb de la séquence Cre recombinase. Les souris Dhhflox/flox ont été génotypées avec les amorces suivantes : 5'-TGGGTGTTCCCTTACAATCCGC-3' et 5'-CAACCACTGGACCGAAGGAGGAA-3' qui amplifient un fragment de 375 pb de l'allèle sauvage ou un fragment de 428 pb si l'allèle est flox/flox. La Cre recombinase des souris Cdh5-Cre^{ERT2} a été active par injection intrapéritonéale de 1 mg de tamoxifène pendant 5 jours consécutifs à 8 semaines. Les souris ont été phénotypées entre 2 et 4 semaines plus tard. Les mâles et les femelles ont été utilisés dans des proportions équivalentes pour les expériences.

3.1.3 Hébergement

Les souris sont hébergées en animalerie conventionnelle avec une photopériode de 12h, en cages communes sur portoirs ventilés, ont accès à de l'enrichissement dans chaque cage, et à l'eau et à la nourriture *ad libitum*, en accord avec les protocoles internationaux d'hébergement des animaux de laboratoire.

3.2 Thérapies

3.2.1 Cromoglycate de sodium

Afin d'inhiber la dégranulation des mastocytes, les souris sont traitées avec 50 mg/kg/jour de cromoglycate de sodium par injection intra-péritonéale pendant 28 jours. Les souris non-traitées sont injectées en intra-péritonéale avec une solution de NaCl à 0,9% pendant 28 jours.

3.2.2 Cétirizine

Comme traitement antihistaminique, les souris ont reçu une dose de 4 mg/kg/jour de cétirizine (Arrow) dans l'eau de boisson pendant 28 jours. L'eau de boisson des souris non traitées contenait un excipient présent dans la cétirizine.

3.3 Test de fatigue

Après trois jours d'habitation au tapis de course, un test de fatigue est réalisé sur le groupe de souris. Les souris courent avec une pente de 20° sur le tapis de course (Ugo Basile) commençant à une vitesse de 12 m/min. La vitesse est augmentée graduellement (Tableau 5) jusqu'à ce que la souris soit épuisée. L'épuisement est défini par l'incapacité de la souris à rester hors de la grille électrifiée pendant 10s.

Tableau 5. Vitesses du tapis de course pendant le test de fatigue

Temps (min)	Vitesse (m/min)
0	12
0,5	14
1	16
6	18
30	20
45	22
60	24
75	26

3.3.1 Immunohistochimie

Avant le marquage, les cœurs sont arrêtés en diastole avec du KCl, perfusé puis fixé dans de la formaline 10% pendant 4 heures, inclus en paraffine et coupé en coupe de 7 µm d'épaisseur. Pour les coupes épaisses, les cœurs sont fixés en formaline 10% pendant 30

minutes puis coupé en tranche de 100 µm au vibratome. Alternativement, les cœurs frais sont congelés dans de l'OCT, puis coupé en coupe de 7 µm d'épaisseur.

Les cellules endothéliales sont identifiées par un anticorps de rat anti-CD31 (Histonova, cat# DIA-310) ou de l'isolectine b4. L'albumine est marquée par un anticorps de chèvre anti-albumine (Abcam, Cat# ab8940). Les leucocytes sont identifiés par un anticorps de rat anti-souris CD45 (BD Pharmingen Inc, Cat# 550539). Les macrophages sont identifiés par un anticorps de rat anti-CD68 (Biolegend, Cat# 137001). Les neutrophiles sont identifiés par un anticorps de rat anti-LyG6 (BD Pharmingen Inc, Cat# 551459). Les lymphocytes T sont identifiés par un anticorps de chèvre anti-CD3 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Cat# sc-1127). Les mastocytes sont identifiés par un anticorps de chèvre anti-CD117 (R&D systems, Cat# AF1356). Les cellules B sont identifiées par un anticorps de rat anti-B220/CD45R (R&D systems, Cat# MAB1217).

3.3.2 Aortes en face

Les aortes sont perfusées puis fixées 30 minutes en formaline 10%, ouvertes, marquées par un anticorps souris anti-Cdh5 (R&D systems, Cat#CVR-2020-11646AF1002) avant d'être montées en face.

3.4 Biologie cellulaire

3.4.1 Culture

Les expériences in vitro sont réalisées sur des cellules endothéliales veineuses ombilicales humaines (human umbilical vein ECs, Lonza). Les cellules HUVECs sont mises en culture dans un milieu endothélial basal-2 supplémenté avec des BulletKits EGM-1 (Lonza). Les cellules HeLa ATCC CCL-2 sont mises en culture dans un milieu Roswell Park Memorial Institute supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal. Avant tout traitement, les cellules sont déplétées en sérum dans un milieu à 0,5% de sérum de veau fœtal pendant 24 heures.

3.4.2 Transfection siRNA

Les HUVECs sont transfectées avec le siRNA Dhh humain : rArCrUrCrCrUrUrArArArGgArGrGrArCrUrArUrUrUrArGCC, ou le siRNA Ptch1 humain : rArGrArArArUrArCrCrCrArCrArGrCrArUrArGrUrGrArCdCdT ou le siRNA ADAM17 humain : rUrArCrUrGrUrArCrArGrGrGrCrUrUrUrCrCrUrUrUrCrCrUrC ou le duplex universel de siRNA contrôle négatif (Origen) avec le réactif de transfection JetPRIME™ (Polyplus Transfection), selon les instructions du fabricant.

3.4.3 Transfection de plasmides

Le plasmide humain Ptch1 marqué myc, Ptch1-1B-myc a été fourni par R. Toftgard et le plasmide humain Dhh forme longue a été décrit précédemment (Caradu et al., 2018a). Le plasmide humain ADAM17-HA provient d'Adgene. Les cellules HeLa sont transfectée avec le réactif de transfection JetPRIME™ (Polyplus Transfection), selon les instructions du fabricant.

3.4.4 Co-immunoprécipitation/Western Blot

Avant les analyses de western blot, Ptch1 est immunoprécipité avec des anticorps anti myc-tag (Millipore, Cat# 05-724). L'expression de Dhh, Ptch1 et Adam17 est quantifiée par SDS PAGE avec des anticorps de souris anti-Dhh (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Cat# sc-271168), de lapin anti-Ptch1 (Abcam, Cat#ab53715) et de lapin anti-Adam17 (Cell Signaling Technology, Cat#3976). La quantité de protéine déposée est contrôlée par un anticorps de lapin anti- β -actin (Cell Signaling Technology, Cat#4970). Les anticorps secondaires proviennent d'Invitrogen (Cat#A-21039, A-21084, A-21036). La révélation s'effectue sur un Odyssey Infrared imager (LI-COR).

3.4.5 RTqPCR

L'ARN est isolé avec du Tri Reagent® (Molecular Research Center Inc) comme indiqué par le fabricant, à partir de 3×10^5 de cellules ou à partir de tissus congelés dans de l'azote liquide et homogénéisés. Pour les analyses quantitatives de RT-PCR, l'ARN total est transcrit à l'inverse avec la transcriptase inverse M-MLV (Promega) et l'amplification est faite sur un DNA Engine Opticon®2 (MJ Research Inc) en utilisant du B-R SYBER® Green SuperMix (Quanta Biosciences).

Table 6. Liste des primers utilisés.

Actb	F	5'-GGAGGAGCTGGAAGCAGCC-3'
	R	5'-GCTGTGCTACGTCGCCCTG-3'
18s	F	5'-CGCGGTTCTATTTTGTGGT-3'
	R	5'-AGTCGGCATCGTTTATGGTC-3'
Vcam-1	F	5'-CGTACACCATCCGCCAGGCA-3'
	R	5'-TAGAGTGCAAGGAGTTCGGGCG-3'
Icam-1	F	5'-TGGCCTGGGGGATGCACACT-3'
	R	5'-CCACCGGGCTGTAGGTGGGT-3'
Sele	F	5'-ACGTCCCGGGAAAGATGAAC-3'
	R	5'-GTCAGGAGTGAGTTCTGC-3'
Tcap	F	5'- GAATACCAGCTGCCGTACCA -3'
	R	5'- TTGTGATCTCAGCCACGTCC -3'
Adam17	F	5'- GATGAGCCAGCCAGGAGATAG -3'
	R	5'- AATGCAGCCCATCCAGAATC -3'

L'expression relative de chaque ARNm est calculée par la méthode de cycle de seuillage comparative et normalisée à l'expression d'ARN du 18s ou de l'Actb.

3.4.6 Migration cellulaire

La migration cellulaire est évaluée via une chambre à chimiotactisme (Neuro Probe, Inc., Gaithersburg, MD, USA). Un filtre de polycarbonate (avec des pores de 8 μm) (GE Infrastructure, Fairfield, CN, USA) est recouvert avec une solution à 0.2% de gélatine (Sigma-Aldrich Co.) et insérée entre les chambres. 5×10^4 cellules par puit sontensemencées dans la chambre supérieure, et la chambre inférieure est remplie de milieu EBM-2 contenant 0,5% de SVF. Les cellules sont incubées pendant 6 heures à 37°C puis observées au microscope à un grossissement de x20. Le nombre de cellules ayant migrées est quantifié sur 3 photos par puit, la migration est exprimée en moyenne du nombre de cellules ayant migrées par photo. Chaque condition est analysée en triplicat et chaque expérience est réalisée au moins trois fois.

3.4.7 Prolifération cellulaire/survie

Dans une plaque 96-puits, 5×10^3 cellules par puit sontensemencées. Au temps indiqué, 10 μl de 5 mg/mL de MTT sont ajoutés à chaque puit. Les cellules sont incubées 4 heures à 37°C puis le milieu cellulaire est remplacé par 100 μL de DMSO. La densité optique est lue à 590 nm avec une référence à 620 nm. Chaque condition inclut huit puits pour chaque expérience et chaque expérience est réalisée au moins trois fois.

3.4.8 Perméabilité/ Transwell®

100 000 cellules sontensemencées dans les puits de Transwell®. Le lendemain, 0.5 mg/mL de FITC-dextran 70 kDa (Sigma) est ajouté à la chambre supérieure. La fluorescence du FITC dans la chambre inférieure est mesurée une heure après.

3.4.9 Séquençage aléatoire du transcriptome entier

L'ARN est isolé avec du Tri Reagent® (Molecular Research Center Inc) comme indiqué par le fabricant à partir de cœur de souris Dhh^{ECKO} et Dhh^{F/F} à un mois post-injection au tamoxifène. La préparation des ARNm est réalisée selon les recommandations du fabricant (KAPA mRNA HyperPrep Kit from ROCHE). Les préparations d'échantillons finaux sont séquencé par le Nextseq 500 ILLUMINA, correspondant à 2x30Millions de lectures par échantillons après démultiplexage.

La qualité des data bruts sont évalués avec FastQC. Les séquences de mauvaise qualité sont rognées ou supprimées avec le logiciel Trimmomatic pour conserver les paires de lecture de bonne qualité. Star v2.5.3a est utilisé pour aligner les lectures sur une référence de génome de mm10 avec des options standards. La quantification des abondances de gène et d'isoforme est réalisée avec with rsem 1.2.28, avant normalisation par edgeR bioconductor package. Finalement, les analyses différentielles sont conduites avec le test de ratio de probabilité du système glm de edgeR. De multiples p-values ajustées sont calculées avec la procédure de Benjamini-Hochberg pour contrôler le FDR.

3.5 Autres techniques

Les techniques de biologie cellulaire, d'analyse d'expression de gène et d'immunohistologie sont décrites avec précision dans les chapitres Matériels et Méthodes de l'article inclus dans la partie Résultats.

4. Résultats

4.1 Les mastocytes déclenchent la maladie des microvaisseaux et la dysfonction diastolique dans les souris diabétiques et obèses

4.1.1 Travaux et résultats obtenus

4.1.1.1 La maladie des petits vaisseaux cardiaques est caractérisée par un profil pro-activation, pro-perméabilité et pro-inflammation chez les souris $Lepr^{db/db}$

Afin de mieux de mieux caractériser la maladie des petits vaisseaux associée à une dysfonction diastolique, nous avons utilisé des souris femelles déficientes pour le récepteur à la leptine $Lepr^{db/db}$. Ces souris présentent l'avantage de récapituler trois facteurs de risque de l'ICFEP, c'est-à-dire, le diabète de type II, l'obésité et le genre féminin et présentent plusieurs caractéristiques de la maladie humaine (Pfeffer Marc A. et al., 2019).

Dans un premier temps, nous avons vérifié le phénotype cardiaque de ces souris. En accord avec les résultats obtenus par d'autres groupes (Alex et al., 2018a), nous avons observé que ces souris présentent une augmentation significative de la pression télédiastolique à partir de 3 mois d'âge sans diminution de la fraction d'éjection. Ce phénotype est associé à une hypertrophie de cardiomyocytes et à un épaississement de la paroi postérieure du VG (Manuscrit Figure 1).

Nous nous sommes alors attachés à phénotyper les microvaisseaux cardiaques des souris femelles $Lepr^{db/db}$. Nous avons notamment réalisé des analyses histologiques et des analyses d'expression de gènes (RT-qPCR et séquençage aléatoire du transcriptome entier) sur des cœurs entiers et ou sur la fraction enrichie en cellules vasculaires.

Nous avons mis en évidence que chez ces souris, la maladie des petits vaisseaux cardiaques est caractérisée par une raréfaction capillaire, une augmentation du diamètre et de la perméabilité vasculaire, ainsi qu'une activation des cellules endothéliales. Par ailleurs, cette maladie des petits vaisseaux est associée à une activation anormale des mastocytes et à une augmentation de l'infiltration de cellules inflammatoires circulantes dans le cœur, notamment de macrophages M2 et des Lymphocytes B.

Le traitement au cromoglycate de sodium a fait l'objet d'un brevet (Renault et al.) et pourrait être envisagé comme thérapie, associés à des traitements visant les comorbidités si

nécessaire, afin d'améliorer la fonction cardiaque chez les patients ICFEp. De plus, cette étude a abouti à un papier actuellement en révision dans le journal ATVB.

4.1.1.2 Les mastocytes participent au développement de la maladie des petits vaisseaux cardiaques chez les souris $Lepr^{db/db}$

Les mastocytes étant les acteurs les plus précoces de la réponse inflammatoire, nous avons testé si l'activation des mastocytes était consécutive à la maladie des petits vaisseaux ou bien si les mastocytes participaient au développement de la maladie des petits vaisseaux cardiaques chez les souris $Lepr^{db/db}$.

Nous avons alors soit bloqué la libération du contenu des granules des mastocytes ou bien bloqué spécifiquement l'activation des récepteurs H1 pour l'Histamine chez les souris $Lepr^{db/db}$ et démontré que la maladie des petits vaisseaux, notamment l'augmentation de leur perméabilité et de leur diamètre, était consécutive à l'activation des mastocytes dans le cœur.

De façon intéressante, le traitement des souris $Lepr^{db/db}$ par le cromoglycate de sodium ou la cétirizine, prévenait aussi l'apparition de la dysfonction diastolique chez ces souris, confirmant d'une part que la dysfonction diastolique est fortement associée à la maladie des petits vaisseaux et suggérant d'autre part que la dysfonction diastolique pourrait être dû à la maladie des petits vaisseaux.

4.1.1.3 Conclusion

L'ensemble de ces résultats démontrent que la dysfonction diastolique observée chez les souris $Lepr^{db/db}$ est associée à une maladie/dysfonction des petits vaisseaux cardiaques ce qui est en accord avec le paradigme actuel de la physiopathologie de l'HFpEF. Par ailleurs nos travaux démontrent le rôle essentiel des mastocytes dans le développement de la maladie des petits vaisseaux cardiaques (Figure 33). En effet les mastocytes activés, via la libération d'histamine, augmentent le diamètre et la perméabilité des capillaires cardiaques (Figure 33).

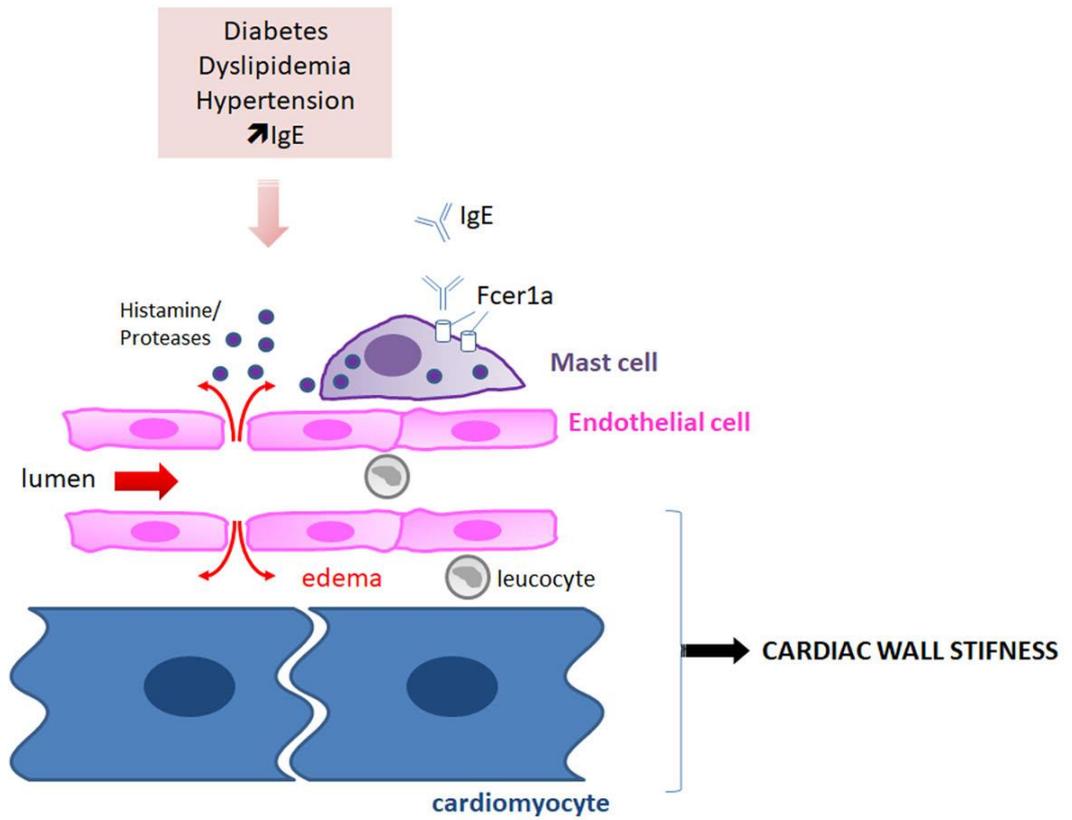


Figure 33. Schéma récapitulant les résultats de l'étude

Title page

Mast cells are the trigger of small vessel disease and diastolic dysfunction in diabetic obese mice

Authors and affiliations

Sarah Guimbal, MS¹, Lauriane Cornuault, MS¹, Pierre-Louis Hollier, MS¹, Candice Chapouly, PharmD, PhD¹, Marie-Lise Bats, PharmD, PhD¹, Alain-Pierre Gadeau, PhD¹, Thierry Couffinhal, MD, PhD^{1*} and Marie-Ange Renault, PhD^{1*}

* These authors contributed equally to this work

¹ Univ. Bordeaux, Inserm, Biology of Cardiovascular Diseases, U1034, CHU de Bordeaux, F-33604 Pessac, France

Running title

Mast cells promote diastolic dysfunction

Corresponding author

Marie-Ange Renault

Inserm U1034

1, avenue de Magellan

33604 Pessac

France

e-mail : marie-ange.renault@inserm.fr

Tel : (33) 5 57 89 19 79

Category: Original Article

Word count: 7401

1. Abstract

Heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) is a major healthcare issue which has been difficult to manage to date, due to its complex and not well understood pathophysiology. Specifically, if a wealth of literature focuses on HFpEF cardiac component, very little information can be found on its vascular component. **Objective:** Our goal is to unravel the critical role of cardiac small vessel disease in the pathophysiology of diastolic dysfunction. **Approach and Results:** To do so, we used Leptin receptor deficient ($Lepr^{db/db}$) female mice, a recognized model of diastolic dysfunction. In these mice, the increased end diastolic pressure (EDP) signifying diastolic dysfunction is associated with vascular leakage, endothelial cell activation and leucocyte infiltration. Strikingly, a RNA sequencing analysis of the cardiac vascular fraction of both $Lepr^{db/db}$ and control mice confirmed endothelial dysfunction and systemic inflammation, but above all, revealed a strong increase in several mast cell markers (notably FcεR1a, Tryptase and Chymase). We then confirmed this accumulation of activated mast cells in the heart of $Lepr^{db/db}$ mice via histology. Importantly, we found that both mast cell degranulation inhibition and specific histamine blockade reduced vascular leakage, leucocyte infiltration and subsequently EDP in $Lepr^{db/db}$ mice. This demonstrated, for the first time, that mast cells, via histamine release, participate in the development of cardiac small vessel disease leading to diastolic dysfunction. **Conclusion:** Cardiac small vessel disease is a key mechanism of HFpEF pathophysiology that can be targeted to prevent the occurrence of diastolic dysfunction, by using both mast cell stabilizers and antihistaminic drugs.

Introduction

A significant proportion of patients with clinical syndrome of heart failure (HF) happens to have a normal ventricular ejection fraction (EF) referred to as heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) as opposed to patients with reduced ejection fraction (HFrEF) (Pfeffer et al., 2019). HFpEF currently accounts for about 50% of all HF patients, and its prevalence relative to HFrEF is rising at a rate of approximately 1% per year. HFpEF patients are generally older, more often female and have a high prevalence of cardiovascular and non-cardiovascular comorbidities, such as obesity, metabolic syndrome, diabetes mellitus type 2, hypertension, atrial fibrillation or renal dysfunction (Pfeffer et al., 2019). HFpEF is diagnosed in the presence of HF signs and/or symptoms, preserved systolic left ventricular (LV) function, with an LV ejection fraction $>50\%$ and LV end-diastolic volume index $<97 \text{ ml/m}^2$ with evidence of diastolic LV dysfunction (Sharma and Kass, 2014). In recent years, there have been significant advances in understanding aetiologies and mechanisms of HFrEF, leading to new therapeutic options. In contrast, if some progresses on HFpEF pathophysiology have been made, therapeutic targets are still missing and no therapies are available to reduce hospitalization or mortality for HFpEF patients. There is, therefore, an urgent need for a better understanding of HFpEF pathophysiology in order to develop new drugs (Lyle and Brozovich, 2018). A unifying, however untested, theory of the pathophysiology of HFpEF suggests that comorbidities lead to a systemic low grade inflammation, which triggers coronary microvascular dysfunction (Marechaux et al., 2016; Marti et al., 2012; Paulus and Tschope, 2013; Sharma and Kass, 2014) and subsequently heart failure.

Endothelial dysfunction mostly refers to impaired endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasorelaxation. Nevertheless, endothelial dysfunction actually regroups an ensemble of features that include acquirement of a pro-inflammatory /pro-thrombotic phenotype due to an increased expression of adhesion and pro-thrombotic molecules such as vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), abnormal vascular leakage due to altered endothelial intercellular junctions and endothelial dedifferentiation promoting endothelial to mesenchymal transition (Li et al., 2018). EC dysfunction may then lead to a compromised heart perfusion because of impaired NO-dependent vasodilatation, cardiac oedema or thrombi formation. Besides, it may also promote cardiac fibrosis and inflammation (D'Amario et al., 2019; Marechaux et al., 2016; Marti et al., 2012). Finally, an impaired production of endothelial-derived active substances as NO, endothelin-1, angiotensin II (All), Neuregulin is also proposed to directly affect cardiomyocyte passive tension (Noireaud and Andriantsitohaina, 2014; Schiattarella et al., 2019b; Tirziu et al., 2010).

What is known so far is that HFpEF is associated with an increased endothelial expression of ICAM-1 and E-selectin, an increased oxidative stress and a decreased eNOS activity both in animal models and in patients (Franssen et al., 2016b). Also, brachial artery flow-mediated dilation assessment and laser Doppler flow measurement have revealed an impaired vascular and microvascular function in patients with HFpEF (Marechaux et al., 2016). Finally, HFpEF is typically associated with increased myocardial stiffening (including increased cardiomyocyte passive stiffness and accumulation of stiff and resistant collagen fibres). Nevertheless the causal role of endothelial dysfunction in the pathophysiology of HFpEF has never been established.

In the present study we used $Lepr^{db/db}$ female mice as a model of HFpEF to further characterize the phenotype and mechanisms of cardiac microvessel dysfunction associated with diastolic dysfunction. Notably, $Lepr^{db/db}$ female mice recapitulate the main risk factors for HFpEF i.e. obesity, diabetes and female gender. As a major breakthrough, this study demonstrates for the first time that abnormally increased mast cell activation participates in the pathophysiology of both cardiac microvessel disease and diastolic dysfunction in $Lepr^{db/db}$ female mice.

Methods

Mice

$Lepr^{db}$ mice (BKS.Cg-*Dock7^m*/+ $Lepr^{db/+}$ J) were obtained from Charles River laboratories and bred together to obtain $Lepr^{db/db}$ and control $Lepr^{db/+}$ mice.

Animal experiments were performed in accordance with the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes and approved by the local Animal Care and Use Committee of Bordeaux University. Only females were used. Mice were either sacrificed by cervical dislocation or exsanguination under deep anesthesia (ketamine 100 mg/kg and xylazine 20 mg/kg, IP).

Cromolyn Sodium/Cetirizine therapy

To prevent mast cell degranulation, mice were treated with 50 mg/kg/day cromolyn sodium (Abcam) via intra-peritoneal injections for 28 days. Untreated mice received 0,9% NaCl daily intra-peritoneal injections. To investigate the role of Histamine release by mast cell, mice were treated with 4 mg/kg/day cetirizine (Arrow Génériques) orally (in the drinking water) for 28 days.

Blood tests/NFS

Blood samples were collected on heparin retroorbital bleeding. Blood cell counts were determined using an automated counter (scil Vet abc Plus+). Plasmas were separated by a 10 min centrifugation at 2500 g and stored at -80°C. Concentrations of the following biochemical markers were measured using an Architect CI8200 analyzer (Abbott Diagnostics, North Chicago, Illinois, USA): triglycerides by the lipoprotein-lipase/glycerol kinase/oxidase/peroxidase method; total cholesterol by the esterase/oxidase/peroxidase method and HDL cholesterol by the accelerator/selective detergent/esterase/oxidase/peroxidase method. LDL cholesterol was then estimated using the Friedewald formula (LDL cholesterol (mmol/L) = total cholesterol – HDL cholesterol – (triglycerides/2,2) or LDL cholesterol (mg/dL) = total cholesterol – HDL cholesterol – (triglycerides/5)).

Echocardiography

Left-ventricular ejection fraction and LV dimension will be measured on a high-resolution echocardiographic system equipped with a 30-MHz mechanical transducer (VEVO 2100, VisualSonics Inc.) as previously described (Renault et al., 2009; Roncalli

et al., 2011). Mice were anchored to a warming platform in a supine position, limbs were taped to the echocardiograph electrodes, and chests were shaved and cleaned with a chemical hair remover to minimize ultrasound attenuation. UNI'GEL ECG (Asept Inmed), from which all air bubbles had been expelled, was applied to the thorax to optimize the visibility of the cardiac chambers. Ejection fractions were evaluated by planimetry as recommended (Schiller et al. 1989). Two-dimensional, parasternal long-axis and short-axis views were acquired, and the endocardial area of each frame was calculated by tracing the endocardial limits in the long-axis view, then the minimal and maximal areas were used to determine the left-ventricular end-systolic (ESV) and end-diastolic (EDV) volumes, respectively. The system software uses a formula based on a cylindrical-hemiellipsoid model ($\text{volume} = \frac{8 \cdot \text{area}^2}{3\pi \cdot \text{length}}$) (Mohan et al., 1992). The left-ventricular ejection fraction was derived from the following formula: $(\text{EDV} - \text{ESV}) / \text{EDV} \cdot 100$. The cardiac wall thickness (Left ventricular posterior wall (LVPW), Inter-ventricular septum (IVS) and left ventricular internal diameter (LVID) were calculated by tracing wall limits in both the long and short axis views.

LV pressure /systolic blood pressure measurement

LV diastolic pressure measurement was assessed using pressure–volume conductance catheter technique. Briefly, mice will be anesthetized with Isoflurane. A Scisense pressure catheter (Transonic) will be inserted into the LV through the common carotid artery. Pressure will be recorded using LabChart software. End diastolic pressure, dP/dt minimum and maximum, Tau and heart rate were

automatically calculated by a curve fit through end-systolic and end-diastolic points on the pressure plot.

Immuno-histological assessments

Prior to staining, heart were stopped in diastole using KCl, perfused and then fixed in 10% formalin for 4 hours, paraffin embedded and cut into 7 μm thick sections. Alternatively, heart were fresh frozen in OCT, then cut into 7 μm thick sections.

ECs were identified using rat anti-CD31 antibodies (Histonova, cat# DIA-310). Albumin was stained using sheep anti-albumin antibodies (Abcam, Cat# ab8940). Pan-leucocytes were identified using rat anti-mouse CD45 antibodies (BD Pharmingen Inc, Cat# 550539). Macrophages were identified using rat anti-CD68 antibodies (Biolegend, Cat# 137001). Neutrophils were identified using rat anti-Ly6G antibodies (BD Pharmingen Inc, Cat# 551459). T lymphocytes were identified using goat anti-CD3 antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Cat# sc-1127). Mast cells were identified using goat anti-CD117 antibodies (R&D systems, Cat# AF1356). B-cells were stained using rat anti-B220/CD45R antibodies (R&D systems, Cat# MAB1217)

Fcer1a was identified using Armenian hamster anti-Fcer1a antibodies (eBioscience™, Cat# 14-5898-82). Cardiomyocytes were immunostained using rabbit anti-desmin antibodies (DB 148, Cat#DB148), mouse anti-sarcomeric actin antibodies (Sigma, Cat# A2172) and rabbit anti-Cx43 antibodies (Sigma, Cat# C6219)

For immunofluorescence analyzes, primary antibodies were resolved with Alexa Fluor®-conjugated secondary polyclonal antibodies (Invitrogen, Cat# A-21206, A-21208, A-11077, A-11057, A-31573, A-10037) and nuclei were counterstained with DAPI (1/5000). Negative controls using secondary antibodies only were done to check for antibody specificity.

Cardiomyocyte membranes were stained using Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor™ 488 Conjugate (Invitrogen).

Fibrosis was quantified after Sirius red staining of heart sections by quantifying the percentage of red-positive area. Cardiomyocyte mean surface area was measured using the Image J software after membrane staining with Wheat Germ Agglutinin (WGA), Alexa Fluor™ 488 Conjugate (Invitrogen) in 5 pictures randomly taken under x630 magnification. Pictures were taken in areas where cardiomyocytes were oriented transversally. Capillary density (CD31+ vessels) was quantified in 4 pictures taken under x260 magnification in areas where cardiomyocytes were oriented transversally.

To assess the mean capillary diameter, the diameter of 10 capillary randomly chosen in each picture was measured via Image J. Inflammatory cell density (CD45+, CD68+, CD3+ and GR1+) was quantified in 8 pictures randomly taken under x260 magnification. Mast cell density and mast cell degranulation was assessed after Toluidine blue staining of heart sections. Mast cells were counted in the entire section.

All pictures and quantifications (done using ImageJ/Fiji v2.0.0-rc-59 software (National Institute of Health, USA)) were performed by a blinded investigator. More precisely, all samples were assigned a random number prior to animal sacrifice, data

collection and analysis. At the end of the experiment, the genotype/treatment for each animal was unveiled to allow data comparison and experimental conclusion.

Isolation of mouse cardiac vascular fraction

Heart were dissociated using 2 mg/mL type IV collagenase (Gibco™, ThermoFisher) for 1 hour at 37°C and the resulting dissociated cells were filtrated on a 30 µm strainer. ECs cells were labelled with rat anti-mouse CD31 microbeads (Miltenyi Biotec). Labelled ECs and attached cells were then isolated magnetically. Importantly, collagenase digestion is incomplete and the CD31+ positive fraction included about 70% CD31+ endothelial cells, 29% NG2+ pericytes and 1% CD45+ leucocytes. The CD31+ fraction was referred as cardiac vascular fraction in the entire manuscript.

Quantitative RT-PCR

RNA was isolated using Tri Reagent® (Molecular Research Center Inc) as instructed by the manufacturer, from heart tissue that had been snap-frozen in liquid nitrogen and homogenized. For quantitative RT-PCR analyses, total RNA was reverse transcribed with M-MLV reverse transcriptase (Promega) and amplification was performed on an AriaMx Real Time PCR system (Agilent Technologies) using B-R SYBER® Green SuperMix (Quanta Biosciences). Primer sequences are reported in Supplementary table 1.

The relative expression of each mRNA was calculated by the comparative threshold cycle method and normalized to 18S rRNA expression.

Soluble/insoluble collagen measurement

Total cardiac collagen and insoluble cardiac collagen were quantified using the Sircol™ Soluble Collagen Assay and The Sircol™ INSOLUBLE Collagen Assay (Biocolor) according to the manufacturer's instructions.

GMPc quantification

GMPc was quantified using the Abnova™ Cyclic GMP Complete ELISA Kit (Thermo Fischer Scientific) according to the manufacturer's instructions.

RNA sequencing

RNA was isolated using Tri Reagent® (Molecular Research Center Inc) as instructed by the manufacturer from the cardiac vascular fraction of *Lepr^{db/db}* mice and control *Lepr^{db/+}* mice. mRNA library preparation were realized following manufacturer's recommendations (KAPA mRNA HyperPrep Kit from ROCHE). Final samples pooled library prep were sequenced on Nextseq 500 ILLUMINA, corresponding to 2x30Millions of reads per sample after demultiplexing.

Quality of raw data has been evaluated with FastQC (Andrews, 2010). Poor quality sequences has been trimmed or removed with Trimmomatic (Bolger et al., 2014) software to retain only good quality paired reads. Star v2.5.3a (Dobin et al., 2013) has been used to align reads on mm10 reference genome using standard options. Quantification of gene and isoform abundances has been done with rsem 1.2.28,

prior to normalisation with edgeR bioconductor package (Robinson et al., 2010). Finally, differential analysis has been conducted with the glm framework likelihood ratio test from edgeR. Multiple hypothesis adjusted p-values were calculated with the Benjamini-Hochberg procedure to control FDR. The FPKM values of all transcripts of which expression was significantly different between both groups in Supplemental table 2.

Western blot analysis

Plamatic IgE level was evaluated by SDS PAGE using rat anti-mouse IgE antibodies (R&D systems Cat# MAB9935).

Statistics

Results are reported as mean \pm SEM. Comparisons between groups were analyzed for significance with the non-parametric Mann-Whitney test or a 2 way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test (for kinetics analyses) **using GraphPad Prism v8.0.2 (GraphPad Inc, San Diego, Calif)**. Differences between groups were considered significant when $p \leq 0.05$ (*: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$).

Results

Lepr^{db/db} female mice have diastolic dysfunction from 3 months of age.

First we quantified and characterized the kinetics of appearance of cardiovascular risk factors in the $Lepr^{db/db}$ female mice and in their control $Lepr^{db/+}$ littermates bred in our laboratory. $Lepr^{db/db}$ female mice are significantly overweight from 6 weeks of age while diabetes appears from 3 months of age. Plasmatic HDL cholesterol is elevated from 6 weeks of age while LDL cholesterol is only increased after 6 months of age. Plasmatic triglycerides are elevated from 3 month of age. Besides $Lepr^{db/db}$ female mice have mild hypertension from 3 month of age and display significantly increased circulating leucocytes (monocytes and neutrophils) later in life at 1 year of age (Supplemental Figure 1).

Then we assessed cardiac function in these mice mainly via echocardiography and LV catheterization. $Lepr^{db/db}$ female mice have normal ejection fraction ($\geq 50\%$) during at least their first year of life (Figure 1A). However, they display diastolic dysfunction attested by a significantly increased end diastolic pressure (EDP) from 3 months of age (Figure 1B). However, the maximum and minimum dP/dt , the relaxation time constant τ and the heart rate were not modified at rest (Supplemental Figure 2 A-D). Increased EDP was associated with increased heart weight/tibia length ratio and increased diastolic left ventricular (LV) posterior wall thickness attesting cardiac hypertrophy (Figure 1C-D). Diastolic interventricular septum thickness and LV internal diameter were not different from that of control mice (Figure 1E-F). Consistent with cardiac hypertrophy, cardiomyocyte were significantly larger in 3 month old $Lepr^{db/db}$ female mice (Figure 1G, H). Myocyte dedifferentiation, attested by Myosin-7 (*Myh7*) over expression appears later on at 6 month of age (Figure 1I). Notably, while both cardiac ANP and BNP mRNA expression increased with age, they were not different in $Lepr^{db/db}$ mice and control mice (Supplemental Figure 2 E-F).

Altogether, this first set of data confirmed that $Lepr^{db/db}$ mice have diastolic dysfunction with preserved systolic function and may be used as a mouse model of HFpEF (Alex et al., 2018b; Horgan et al., 2014).

$Lepr^{db/db}$ female mice do not have cardiomyocyte gross anomalies.

To search for cardiomyocyte major anomalies, we first performed Desmin and sarcomeric alpha actin staining on heart cross sections to visualize cardiomyocyte sarcomeres and Connexin 43 (Cx43) to identify intercalary disks. We did not observe any significant difference between $Lepr^{db/db}$ mice and their control littermates (Supplemental Figure 3A-B). Then we performed RT-qPCR to measure expression level of several cardiomyocyte markers notably, Titin isoforms N2-A and N2-B, Myocyte-specific enhancer factor 2C (MEF2C), Cx43, Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (Serca2) and Cardiac phospholamban (Pln) (Supplemental Figure 3C-H). None of these markers were significantly different in $Lepr^{db/db}$ mice compared to their control littermates.

In conclusion, $Lepr^{db/db}$ female mice do not have cardiomyocyte gross anomalies, which is consistent with the unchanged dP/dT minimum and maximum.

$Lepr^{db/db}$ female mice do not have significant cardiac fibrosis.

Cardiac fibrosis, often associated with HFpEF, was first evaluated via picroSirius red staining. As shown in supplemental figure 3, the red staining was equivalent in 3 month old $Lepr^{db/db}$ and in their control littermates (Supplemental Figure 4A-B). This result was confirmed using the Sircol™ collagen assay (Supplemental Figure 4C). Moreover neither collagen type I alpha 1 chain (Col1a1), nor collagen type III alpha 1 chain (Col3a1) mRNA expression was modified (Supplemental Figure 4D-E). Finally, no difference in Lysyl oxidase (Lox) mRNA expression, an enzyme promoting collagen cross linking was observed (Supplemental Figure 4F). To test whether cardiac fibrosis may appear later in life, we performed the same assays in a year old animals. Similarly to what we found in 3 month old animal, neither picrosirius red stain nor the Sircol™ collagen assay showed any differences between $Lepr^{db/db}$ mice and control littermate (Supplemental Figure 4G-H). Although Lox mRNA was significantly increased in a year old $Lepr^{db/db}$ mice compared to their control littermate (Supplemental Figure 4J), it did not lead to increased amount of insoluble collagen in the heart (Supplemental Figure 4K).

In conclusion, diastolic dysfunction in $Lepr^{db/db}$ female mice is not associated with increased cardiac fibrosis.

3 month old $Lepr^{db/db}$ female mice have cardiac microvessel disease.

To phenotype the cardiac microvessel of 3 month old $Lepr^{db/db}$ female mice, we performed both immuno-histological and gene expression analyses. Gene expression analysis was performed by a transcriptomic analysis via RNA sequencing of the cardiac vascular fraction which includes ECs, pericytes, few smooth muscle cells and

few perivascular inflammatory cells (Supplemental Table 2). The main RNA sequencing results were confirmed by RT-qPCR performed on total heart RNA samples.

First we quantified cardiac capillary density and found that capillary density is significantly decreased in the heart of $Lepr^{db/db}$ female mice (Figure 2A-B) which is fully consistent with previous analyses performed on human patient with HFpEF (Mohammed et al., 2015b). Transcriptomic analysis via RNA sequencing of the cardiac vascular fraction of these mice showed a switch in the balance between vasodilator and vasoconstrictor molecules in favor of vasoconstriction of cardiac arterioles (Figure 2C) notably, because of the **downregulated expression of Apelin (Apln)** and the increased expression of Type-1 angiotensin II receptor (*Agtr1*), Thromboxane-A synthase (*Tbxas1*), **Arachidonate 5-lipoxygenase (Alox5)** and **Prostaglandin G/H synthase 2 (Ptgs2)** (Figure 2C). **This result is consistent with the decreased GMPc content of the aorta of $Lepr^{db/db}$ mice indicating decreased guanylate cyclase activity (Figure 2D).** However, when we measured the mean **cardiac** capillary diameter (notably cardiac capillaries are not muscularized), we found that it was significantly increased in $Lepr^{db/db}$ mice compared to control mice (Figure 2E). **To assess vascular permeability we measure albumin extravasation and found a significantly increased albumin extravasation in $Lepr^{db/db}$ mice compared to their control littermate which indicate abnormal vessel permeability (Figure 2F, G).** Besides, the transcriptomic analysis of the cardiac vascular fraction also revealed oxidative stress attested by **Cytochrome P450 1B1 (Cyp1b1)** and **Cytochrome P450 1A1 (Cyp1a1)** upregulation (Figure 2H) and a pro-coagulation phenotype attested by **P2Y purinoceptor 12 (P2ry12)**, **Coagulation factor XIII A chain (F13a1)** and **Platelet factor 4 (PF4)** upregulation

(Figure 2I). Finally, both the transcriptomic analysis of the cardiac vascular fraction and gene expression analysis performed on total heart extract showed a significantly increased expression of adhesion molecule Icam1 and E-selectin (Figure 3A-D) demonstrating EC activation. EC activation was associated with upregulation of multiple inflammatory cytokines including Interleukin-6 (Il6), C-C motif chemokine 2 (Ccl2), C-C motif chemokine 3 (Ccl3) and C-C motif chemokine 7 (Ccl7) (Figure 3E-G).

Altogether, these results demonstrate that $Lepr^{db/db}$ have cardiac microvessel disease characterized by a decreased capillary density but an increased capillary diameter. Moreover, they display oxidative stress together with a pro-inflammatory and a pro-coagulant phenotype.

3 month old $Lepr^{db/db}$ female mice have cardiac inflammation.

In association with cardiac EC activation, leucocyte infiltration in the cardiac tissue of $Lepr^{db/db}$ mice was significantly increased (Figure 4A-B). Among Leukocytes, cells were mostly CD68+/Mrc1+ M2 macrophages (Supplemental Figure 5A-B). Besides, leukocytes also included CD3+ T-lymphocytes (Supplemental Figure 5C-D), Ly6G+ neutrophils (Supplemental Figure 5E-F) and B220 B-lymphocytes (Supplemental Figure 5G-H). Both M2 macrophage and B-lymphocyte densities were increased in $Lepr^{db/db}$ mice. However, T-lymphocytes and neutrophils densities were not different between $Lepr^{db/db}$ mice and their control littermates.

3 month old Lepr^{db/db} female mice have abnormal cardiac mast cell activation.

Apart from highlighting EC dysfunction and cardiac inflammation, transcriptomic analysis of the cardiac vascular fraction also revealed that among the 50 genes with $\log_2FC \geq 2$, 7 genes were mast cell markers (Figure 4C-D). We confirmed Carboxypeptidase A3 mast cell (Cpa3) and High affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit alpha (Fcer1a) overexpression in total heart extracts (Figure 4E-F) and confirmed that Fcer1a was indeed expressed by CD45+, CD117+ cardiac mast cell (Figure 4G). We then quantified the total number of cardiac mast cell after Toluidine blue staining of heart section but found no significant differences between Lepr^{db/db} mice and their control littermate however (Figure 4H-I), when we calculated the percentage of activated/degranulating mast cells, we found that it was significantly increased in the heart of Lepr^{db/db} mice (Figure 5A-B). Since mast cells are typically activated by IgE, we measured IgE circulating levels in plasma extracts from Lepr^{db/db} mice and control littermates. Consistent with increased mast cell activated IgE circulating level were significantly increased in Lepr^{db/db} mice (Figure 5C-D).

Mast cells are known to induce cardiovascular effects through the release of their granule content (Kritikou et al., 2016), notably proteases, histamine and the production of eicosanoids and cytokines. Consistent with increased cardiac mast cell activation, both Tryptase (Tpsab1) and Chymase (Cma1) mRNA were significantly increased in the heart of Lepr^{db/db} mice compared to the one of their control littermates (Figure 5E-F). Also the transcriptomic analysis of the cardiac vascular fraction revealed increased eicosanoid metabolic process attested by increased arachidonate 5-lipoxygenase (Alox5), thromboxane A synthase 1 (Tbxas1) and leukotriene C4

synthase (Ltc4s) expression (Figure 5G). The increased Alox5 mRNA expression was confirmed in total heart samples (Figure 5H).

Activated cardiac mast cells, via histamine release, induce cardiac small vessel disease in Lepr^{db/db} mice.

To investigate the role of mast cell degranulation in the pathophysiology of cardiac microvessel disease in Lepr^{db/db} mice, 2 month old Lepr^{db/db} mice (i.e. before they display increased EDP) were treated with 50 mg/Kg/day cromolyn sodium versus vehicle. Mice were sacrificed 28 days later. First, we verified cromolyn sodium therapy was effective and did decrease the percentage of degranulating mast cells in the heart (Figure 6A), Then, we investigated the effect of cromolyn sodium therapy on cardiac microvessel phenotype and cardiac inflammation. Cromolyn sodium therapy did not modify cardiac microvessel density (Figure 6B-C), however it did reduce capillary diameter (Figure 6D) and permeability attested by decreased albumin extravasation (Figure 6E-F). Moreover, CD45+ leucocyte recruitment was significantly decreased (Figure 6G-H).

To summarize, mast cells promote cardiac capillary permeability and vasodilation, which is consistent with the well-known effect of histamine contained in mast cell granules (Elieh Ali Komi et al., 2019). To verify cardiac capillary permeability and vasodilation was indeed due to histamine, 2 month old Lepr^{db/db} mice were treated with 4 mg/kg/jours cetirizine versus vehicle. As expected, both the diameter of cardiac capillaries (Figure 6I-J) and their permeability (Figure 6K-L) were significantly reduced in Lepr^{db/db} mice treated with cetirizine vs vehicle-treated Lepr^{db/db} mice.

In conclusion, mast cells promote cardiac small vessel disease via histamine release in $Lepr^{db/db}$ mice.

Activated cardiac mast cells promote the appearance of diastolic dysfunction in $Lepr^{db/db}$ mice.

Finally, to measure the pathophysiological consequences of histamine-induced small vessel disease on cardiac function, we investigated cardiac function in both cromolyn sodium-treated and cetirizine treated- $Lepr^{db/db}$ mice. Ejection fraction, which is normal in $Lepr^{db/db}$ mice was not modulated neither by cromolyn sodium treatment (Figure 7A) neither by cetirizine treatment (Figure 7B). However, EDP was significantly decreased both cromolyn sodium-treated (Figure 7C) and cetirizine-treated (Figure 7D) $Lepr^{db/db}$ mice indicating improved diastolic function. Cromolyn sodium therapy did neither modify the heart weight nor the LV posterior wall thickness nor the mean cardiomyocyte size (Figure 7E-I), indicating that cromolyn sodium therapy does not prevent cardiac hypertrophy.

Altogether these results indicated that mast cells, via secretion of their granule content, promote the development of diastolic dysfunction, however, they do not participate in the development of cardiomyocyte hypertrophy.

Discussion

The present study supports the microvascular hypothesis of HFpEF especially in the setting of obesity and type 2 diabetes. In this paper, we used $Lepr^{db/db}$ female mice as a model of diastolic dysfunction. $Lepr^{db/db}$ female mice have the advantage of

recapitulating the main risk factors for HFpEF, i.e. diabetes, obesity female gender and hypertension. $Lepr^{db/db}$ mice were previously shown to display diastolic dysfunction (Alex et al., 2018b; Hanif et al., 2017; Pant et al., 2019) and to recapitulate significant features of human HFpEF (Alex et al., 2018c; Horgan et al., 2014). In the present study, we thoroughly characterized the cardiac microvascular phenotype of these mice, notably, via a transcriptomic analysis. We revealed that cardiac microvessel disease is characterized by a decreased capillary density, abnormal vessel permeability and vasoconstriction of arterioles but increased capillary diameter; moreover we showed that ECs display oxidative stress and have a pro-inflammatory and pro-coagulant phenotype. Strikingly, we demonstrated for the first time that, in $Lepr^{db/db}$ mice, cardiac microvessel disease is associated with increased mast cell activation and proved that it participates to the pathophysiology of both cardiac microvessel disease and diastolic dysfunction (Supplemental Figure 6).

The current paradigm for HFpEF proposes that myocardial remodelling and dysfunction in HFpEF results from the following sequence of events: 1) comorbidities including obesity, diabetes and/or hypertension would induce a systemic low grade pro-inflammatory state; 2) this pro-inflammatory state would induce EC dysfunction characterized by an increased ROS production, a decreased NO synthesis and an increased expression of adhesion molecules such as VCAM-1 and E-selectin; 3) EC dysfunction would lead to a compromised heart perfusion secondary to impaired NO-dependent vasodilatation, oedema and pro-inflammatory/pro-thrombotic phenotype, macrophage infiltration and fibrosis (Marechaux et al., 2016; Marti et al., 2012). The present data show that the $Lepr^{db/db}$ female mice model largely recapitulates this paradigm while adding further features. Notably, we demonstrated that mast cell activation, which is either part of the low grade pro-inflammatory state or induced by

the low grade inflammatory state of diabetic obese mice, promotes microvascular dysfunction especially vascular permeability and capillary dilation and participates in the development of diastolic dysfunction. However, EC activation may precede mast cell activation (data not shown). Consistent with a central role of inflammation (Tromp et al., 2018) and microvascular disease in the pathophysiology of HFpEF, *Lepr^{db/db}* mice do not display significant cardiac fibrosis or major cardiomyocyte abnormalities. Notably, we found that cardiomyocyte hypertrophy does not seem to promote the increased EDP. Indeed, although cromolyn sodium therapy prevents increased EDP, this effect is not associated to cardiomyocyte hypertrophy and dedifferentiation after the onset of diastolic dysfunction, as demonstrated by *Myh7* overexpression.

Mast cells are immune cells that reside in the connective tissues including the myocardium. They are characterized by the expression of c-Kit receptors and by their granules containing active mediators including proteases, notably *Cma1*, *Tpsab1* and histamine. Mast cells may be activated by IgEs via their receptor *Fcer1a*, Complement factors via Toll-like receptors, IgGs or cytokines (Hermans et al., 2019). They have been associated with several cardiovascular diseases including atherosclerosis, myocardial infarction and aneurysms (Kritikou et al., 2016), pathologies in which mast cells are contributing to the pathogenesis essentially through the release of their granule content. Importantly, circulating Tryptase was recently suggested to be a marker for cardiovascular diseases (Mohajeri et al., 2019). Moreover, mast cells have been previously involved in diastolic dysfunction induced by ovariectomy in rats (Wang et al., 2016a) and diabetic cardiomyopathy in streptozotocin-treated mice (Huang et al., 2013). The present study thus confirms the

significant role of mast cells in cardiovascular diseases. How mast cells are activated in the setting of cardiovascular diseases remains unknown (Hermans et al., 2019). We found that, in $Lepr^{db/db}$ mice, increased activation of mast cells is associated with increased circulating levels of IgEs. IgE/Fc ϵ 1a is the main route of mast cell activation in allergic diseases. Interestingly, IgEs were reported to be elevated in the serum of patients with cardiovascular diseases (Kovanen et al., 1998) (Korkmaz et al., 1991) (Xu et al., 2018b) including coronary arterial disease and myocardial infarction. Consistently, Asthma was shown to be related to an increased incidence of coronary heart disease, particularly in women (Liu et al., 2017). More specifically, one study reported that coronary flow reserve, considered as an early marker of endothelial dysfunction is significantly lower in patients with high IgE levels (Unal et al., 2017). Altogether, these results further support that $Lepr^{db/db}$ mice are a relevant model of human cardiovascular diseases.

In conclusion, the present study further confirms that inflammation and cardiac microvessel disease are at the heart of HFpEF pathophysiology (Tromp et al., 2018) and identified for the first time mast cells as critical players of cardiac microvessel disease and diastolic dysfunction, making them a promising therapeutic target for HFpEF treatment.

Acknowledgments

We thank Philippe Alzieu, Annabel Reynaud, Sylvain Grolleau, and Maxime David for their technical help. We thank Christelle Boullé for administrative assistance.

This work benefited from equipment and services from the iGenSeq (RNA sequencing) and iCONICS (RNAseq analysis) core facilities at the ICM (Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, Hôpital Pitié-Salpêtrière, PARIS, France).

Sources of Funding

This study was supported by grants from the Fondation pour la Recherche Médicale (équipe FRM), from the Region « Nouvelle Aquitaine » and the Agence Nationale pour la Recherche (Appel à Projet Générique). Finally, this study was co-funded by the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” and by the University of Bordeaux.

Disclosures

None declared

References

1. Pfeffer MA, Shah AM, Borlaug BA. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction In Perspective. *Circ Res.* 2019;124(11):1598-1617. doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.313572
2. Sharma K, Kass DA. Heart failure with preserved ejection fraction: mechanisms, clinical features, and therapies. *Circ Res.* 2014;115(1):79-96. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.302922 CIRCRESAHA.115.302922 [pii]

3. Lyle MA, Brozovich FV. HFpEF, a Disease of the Vasculature: A Closer Look at the Other Half. *Mayo Clin Proc.* 2018;93(9):1305-1314. doi:10.1016/j.mayocp.2018.05.001
4. Marti CN, Gheorghiade M, Kalogeropoulos AP, Georgiopoulou VV, Quyyumi AA, Butler J. Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60(16):1455-1469. doi:S0735-1097(12)02523-5 [pii] 10.1016/j.jacc.2011.11.082
5. Marechaux S, Samson R, van Belle E, Breyne J, de Monte J, Dedrie C, Chebai N, Menet A, Banfi C, Bouabdallaoui N, Le Jemtel TH, Ennezat PV. Vascular and Microvascular Endothelial Function in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Journal of cardiac failure.* 2016;22(1):3-11.
6. Paulus WJ, Tschope 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(4):263-271. doi:S0735-1097(13)01890-1 [pii] 10.1016/j.jacc.2013.02.092
7. Li Y, Lui KO, Zhou B. Reassessing endothelial-to-mesenchymal transition in cardiovascular diseases. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(8):445-456. doi:10.1038/s41569-018-0023-y
8. D'Amario D, Migliaro S, Borovac JA, Restivo A, Vergallo R, Galli M, Leone AM, Montone RA, Niccoli G, Aspromonte N, Crea F. Microvascular Dysfunction in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Front Physiol.* 2019;10:1347. doi:10.3389/fphys.2019.01347
9. Tirziu D, Giordano FJ, Simons M. Cell communications in the heart. *Circulation.* 2010;122(9):928-937. doi:122/9/928 [pii] 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.847731
10. Noireaud J, Andriantsitohaina R. Recent insights in the paracrine modulation of cardiomyocyte contractility by cardiac endothelial cells. *Biomed Res Int.* 2014;2014:923805. doi:10.1155/2014/923805

11. 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(7752):351-356. doi:10.1038/s41586-019-1100-z
12. Franssen C, Chen S, Unger A, Korkmaz HI, De Keulenaer GW, Tschope C, Leite-Moreira AF, Musters R, Niessen HW, Linke WA, Paulus WJ, Hamdani N. Myocardial Microvascular Inflammatory Endothelial Activation in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Jacc*. 2016;4(4):312-324.
13. Renault MA, Roncalli J, Tongers J, Misener S, Thorne T, Jujo K, Ito A, Clarke T, Fung C, Millay M, Kamide C, Scarpelli A, Klyachko E, Losordo DW. The Hedgehog transcription factor Gli3 modulates angiogenesis. *Circ Res*. 2009;105(8):818-826.
14. Roncalli J, Renault MA, Tongers J, Misener S, Thorne T, Kamide C, Jujo K, Tanaka T, Li M, Klyachko E, Losordo DW. Sonic hedgehog-induced functional recovery after myocardial infarction is enhanced by AMD3100-mediated progenitor-cell mobilization. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(24):2444-2452.
15. Mohan JC, Sethi KK, Arora R, Khalilullah M. Cross sectional echocardiographic left ventricular ejection fraction: method based variability. *Indian Heart J*. 1992;44(1):23-28.
16. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010.
17. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114-2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
18. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15-21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635
19. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010;26(1):139-140. doi:10.1093/bioinformatics/btp616

20. Alex L, Russo I, Holoborodko V, Frangogiannis NG. 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*. 2018;315(4):H934-H949. doi:10.1152/ajpheart.00238.2018
21. Horgan S, Watson C, Glezeva N, Baugh J. Murine models of diastolic dysfunction and heart failure with preserved ejection fraction. *Journal of cardiac failure*. 2014;20(12):984-995. doi:10.1016/j.cardfail.2014.09.001 S1071-9164(14)01196-8 [pii]
22. Mohammed SF, Hussain S, Mirzoyev SA, Edwards WD, Maleszewski JJ, Redfield MM. Coronary microvascular rarefaction and myocardial fibrosis in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation*. 2015;131(6):550-559. doi:CIRCULATIONAHA.114.009625 [pii] 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.009625
23. Kritikou E, Kuiper J, Kovanen PT, Bot I. The impact of mast cells on cardiovascular diseases. *Eur J Pharmacol*. 2016;778:103-115. doi:10.1016/j.ejphar.2015.04.050
24. Elieh Ali Komi D, Wöhrl S, Bielory L. Mast Cell Biology at Molecular Level: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. Published online December 12, 2019. doi:10.1007/s12016-019-08769-2
25. Pant T, Dhanasekaran A, Bai X, Zhao M, Thorp EB, Forbess JM, Bosnjak ZJ, Ge Z-D. Genome-wide differential expression profiling of lncRNAs and mRNAs associated with early diabetic cardiomyopathy. *Sci Rep*. 2019;9(1):15345. doi:10.1038/s41598-019-51872-9
26. Hanif W, Alex L, Su Y, Shinde AV, Russo I, Li N, Frangogiannis NG. Left atrial remodeling, hypertrophy, and fibrosis in mouse models of heart failure. *Cardiovasc Pathol*. 2017;30:27-37. doi:S1054-8807(17)30050-9 [pii] 10.1016/j.carpath.2017.06.003
27. Alex L, Russo I, Holoborodko V, Frangogiannis NG. 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*. 2018;315(4):H934-H949. doi:10.1152/ajpheart.00238.2018

28. Tromp J, Westenbrink BD, Ouwerkerk W, van Veldhuisen DJ, Samani NJ, Ponikowski P, Metra M, Anker SD, Cleland JG, Dickstein K, Filippatos G, van der Harst P, Lang CC, Ng LL, Zannad F, Zwinderman AH, Hillege HL, van der Meer P, Voors AA. Identifying Pathophysiological Mechanisms in Heart Failure With Reduced Versus Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(10):1081-1090. doi:10.1016/j.jacc.2018.06.050
29. Hermans M, Lennep JR van, van Daele P, Bot I. Mast Cells in Cardiovascular Disease: From Bench to Bedside. *Int J Mol Sci*. 2019;20(14). doi:10.3390/ijms20143395
30. Mohajeri M, Kovanen PT, Bianconi V, Pirro M, Cicero AFG, Sahebkar A. Mast cell tryptase - Marker and maker of cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther*. 2019;199:91-110. doi:10.1016/j.pharmthera.2019.03.008
31. Wang H, da Silva J, Alencar A, Zapata-Sudo G, Lin MR, Sun X, Ahmad S, Ferrario CM, Groban L. Mast Cell Inhibition Attenuates Cardiac Remodeling and Diastolic Dysfunction in Middle-aged, Ovariectomized Fischer 344 × Brown Norway Rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2016;68(1):49-57. doi:10.1097/FJC.0000000000000385
32. Huang ZG, Jin Q, Fan M, Cong XL, Han SF, Gao H, Shan Y. Myocardial remodeling in diabetic cardiomyopathy associated with cardiac mast cell activation. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e60827. doi:10.1371/journal.pone.0060827
33. Kovanen PT, Mänttari M, Palosuo T, Manninen V, Aho K. Prediction of myocardial infarction in dyslipidemic men by elevated levels of immunoglobulin classes A, E, and G, but not M. *Arch Intern Med*. 1998;158(13):1434-1439. doi:10.1001/archinte.158.13.1434
34. Korkmaz ME, Oto A, Saraçlar Y, Oram E, Oram A, Ugurlu S, Karamehmetoglu A, Karaagaoglu E. Levels of IgE in the serum of patients with coronary arterial disease. *Int J Cardiol*. 1991;31(2):199-204. doi:10.1016/0167-5273(91)90216-c
35. Xu Z, Wang T, Guo X, Li Y, Hu Y, Ma C, Wang J. The Relationship of Serum Antigen-Specific and Total Immunoglobulin E with Adult Cardiovascular Diseases. *Int J Med Sci*. 2018;15(11):1098-1104. doi:10.7150/ijms.25857

36. Liu H, Fu Y, Wang K. Asthma and risk of coronary heart disease: A meta-analysis of cohort studies. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2017;118(6):689-695. doi:10.1016/j.anai.2017.03.012
37. Unal D, Gelincik A, Elitok A, Demir S, Olgac M, Coskun R, Kocaaga M, Colakoglu B, Buyukozturk S. Impact of high serum Immunoglobulin E levels on the risk of atherosclerosis in humans. *Asia Pac Allergy.* 2017;7(2):74-81. doi:10.5415/apallergy.2017.7.2.74

Figures

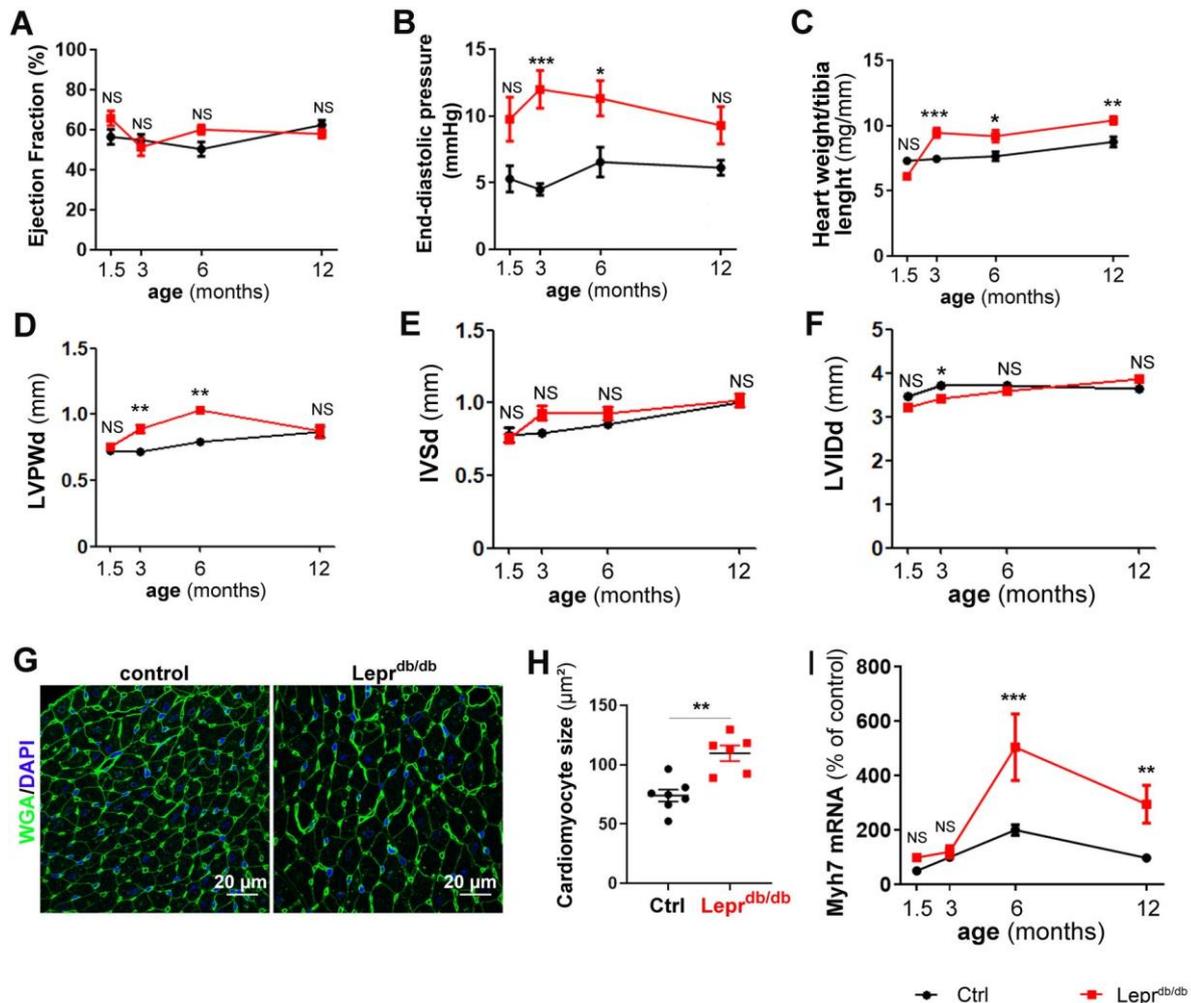


Figure 1: *Lepr^{db/db}* female mice have diastolic dysfunction from 3 months of age. *Lepr^{db/db}* female mice and their control *Lepr^{db/+}* littermates were subjected to echocardiography, LV catheterization and sacrificed at the indicated time points (n=8 to 15 per group). (A) Ejection fraction was measured via echocardiography. (B) End diastolic pressure was measured using a pressure catheter. (C) Heart hypertrophy was assessed by calculating the heart weight over tibia length ratio. (D) End diastolic left ventricular posterior wall thickness during (LVPWd) was measured via echocardiography. (E) End diastolic Interventricular septum thickness (IVSd) was measured via echocardiography. (F) End diastolic Left ventricular internal diameter

was measured via echocardiography. **(G)** Heart cross sections from 3 month old mice were stained with FITC-labeled WGA. Representative pictures are shown (scale bar: 20 μm). **(H)** The mean cardiomyocyte surface area was measured. **(I)** Myh7 mRNA expression was measured via RT-qPCR in heart biopsies. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$. ***: $p \leq 0.001$. NS: not significant. Two way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test or Mann Whitney test.

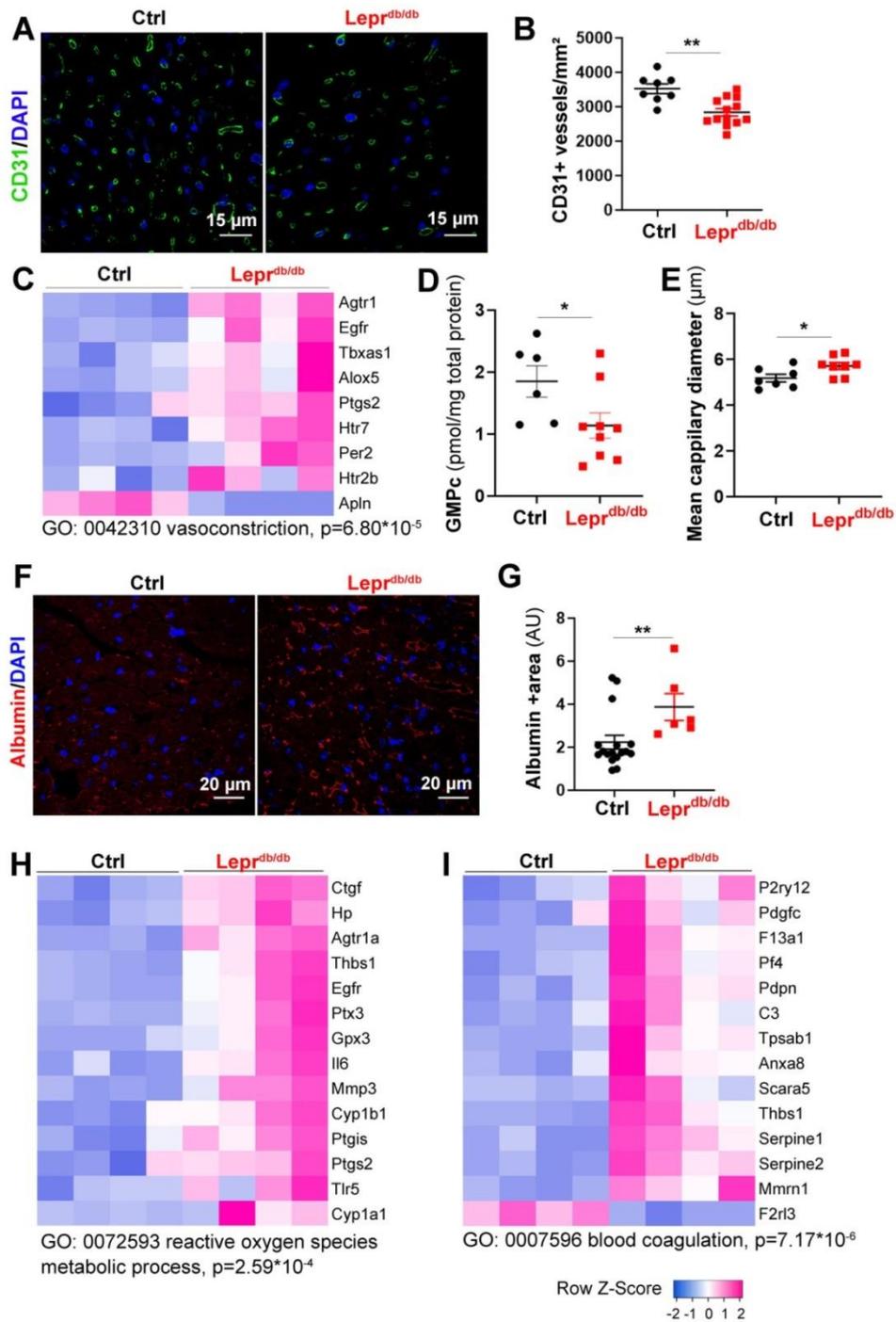


Figure 2: *Lepr^{db/db}* female mice have cardiac microvascular dysfunction.

Lepr^{db/db} female mice and their control *Lepr^{db/+}* littermates were sacrificed at 3 months of age. **(A)** Heart cross sections were immune-stained with anti-CD31 antibodies to identify ECs. Representative pictures are shown (scale bar: 15 μ m). **(B)** Capillary density was quantified as the number of CD31+ vessels/mm² (n=14 and 8 mice/ group). **(C)** RNA sequencing analysis of the cardiac vascular fraction revealed

that “vasoconstriction” is one of the biological processes significantly increased in $Lepr^{db/db}$ mice (n=4 mice/group). **(D)** The GMPc content of total aortas was quantified by ELISA (n=9 and 6 mice/group). **(E)** The mean cardiac capillary diameter was measured (n=7 and 6 mice/ group). **(F)** Heart cross sections were immuno-stained with anti-Albumin antibodies to assess vascular leakage. Representative pictures are shown (scale bar: 20 μ m). **(G)** Albumin extravasation was measured as the albumin+ surface area. ² (n=6 and 15 mice/ group). **(H)** RNA sequencing analysis of the cardiac vascular fraction revealed that “Reactive oxygen species metabolic process” is one of the biological processes significantly increased in $Lepr^{db/db}$ mice (n=4 mice/group). **(I)** RNA sequencing analysis of the cardiac vascular fraction revealed that “Blood coagulation” is one of the biological processes significantly increased in $Lepr^{db/db}$ mice (n=4 mice/group). **: $p \leq 0.01$. Mann Whitney test.

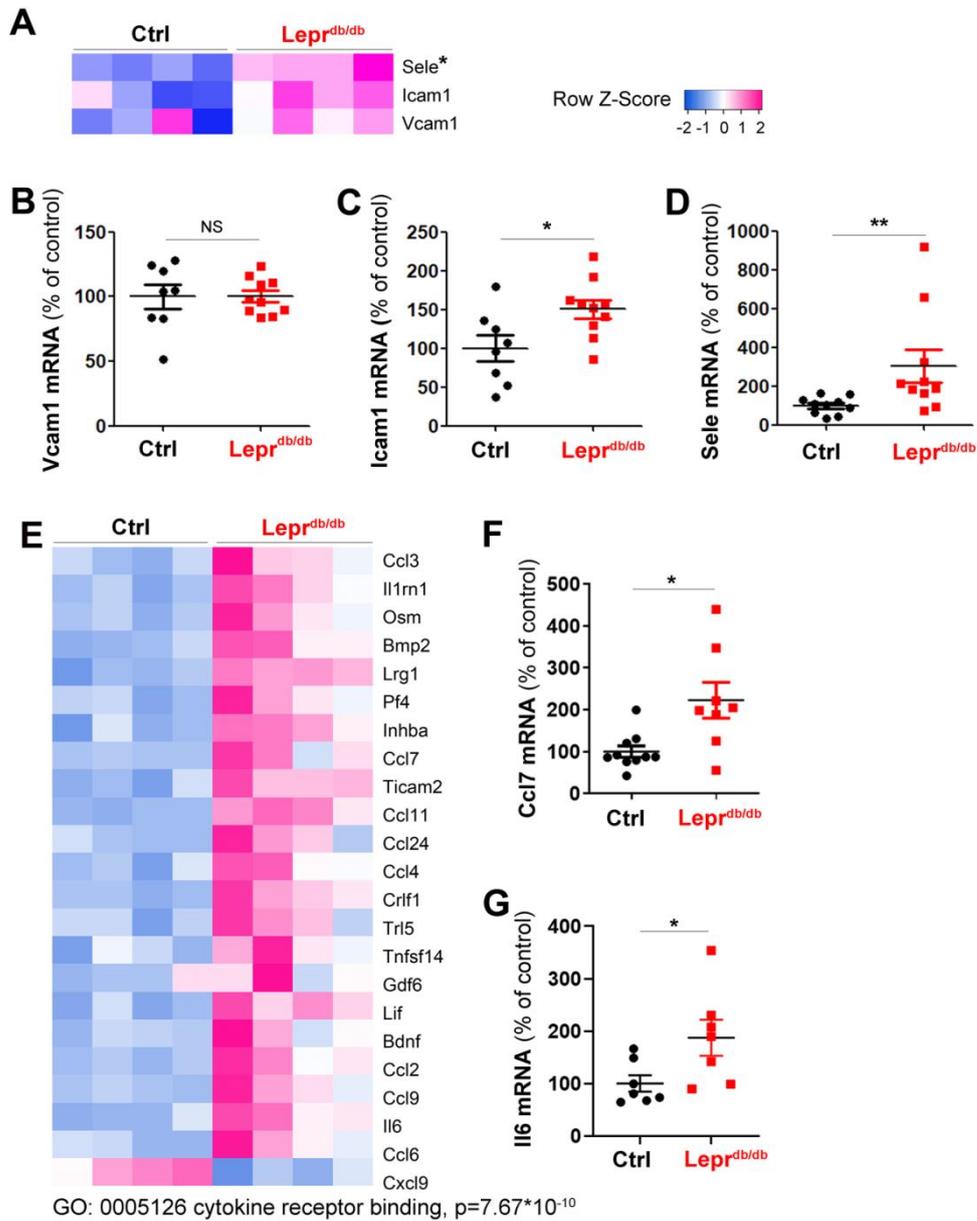


Figure 3: *Lepr^{db/db}* female mice have increased cardiac inflammation. *Lepr^{db/db}* female mice and their control *Lepr^{db/+}* littermates were sacrificed at 3 months of age. (A) RNA sequencing analysis of the cardiac vascular fraction revealed an increased expression of adhesion molecules. Vcam1 (B), Icam1 (C) and Sele (D) mRNA expression was measured via RT-qPCR in total heart biopsies (n=10 mice/group).

RNA sequencing analysis of the cardiac vascular fraction revealed that “Cytokine receptor binding” is one of the molecular function significantly increased in *Lepr^{db/db}* mice (n=4 mice/group). Ccl7 (**F**) and Il-6 (**G**) mRNA expression was measured via RT-qPCR in total heart biopsies (n=10 mice/group). *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$. NS: not significant. Mann Whitney test.

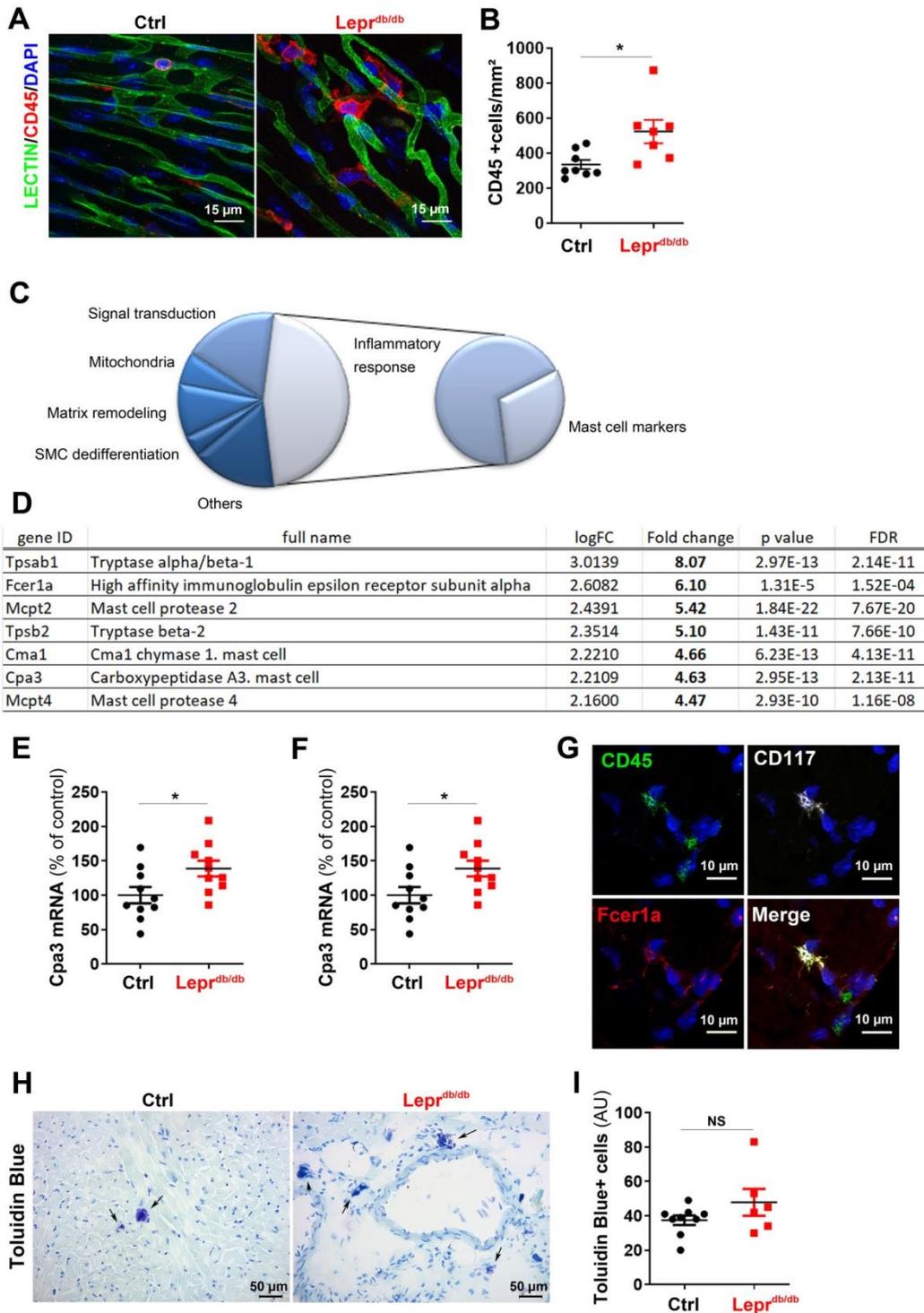


Figure 4: *Lepr^{db/db}* female mice have increased cardiac inflammation. *Lepr^{db/db}* female mice and their control *Lepr^{db/+}* littermates were sacrificed at 3 months of age. (A) BS1-lectin-FITC-perfused heart cross sections were immuno-stained with anti-CD45 antibodies to assess cardiac inflammation. Representative pictures are shown

(scale bar: 15 μm). **(B)** Leucocyte infiltration was measured as the number of CD45+ cells/ mm^2 (n=7 and 8 mice/ group). **(C)** RNA sequencing analysis of the cardiac vascular fraction was performed. Among the 50 most upregulated gene in $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ female mice, 7 are mast cell markers. **(D)** List of mast cell marker upregulated in $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ female mice. **(E)** Cpa3 and **(F)** Fcer1a mRNA expression was measured via RT-qPCR in total heart biopsies (n=10 mice/group). **(G)** Heart cross sections were co-immunostained with anti-CD45 (in green), anti-CD117 (in white) and anti-Fcer1a (in red) antibodies (scale bar: 10 μm). **(H)** Heart cross sections were stained with Toluidine Blue to identify mast cells. Representative pictures are shown (scale bar: 50 μm). **(I)** Mast cell infiltration was quantified as the number of toluidine blue+ cells/heart section. *: $p \leq 0.05$; NS: not significant. Mann Whitney test.

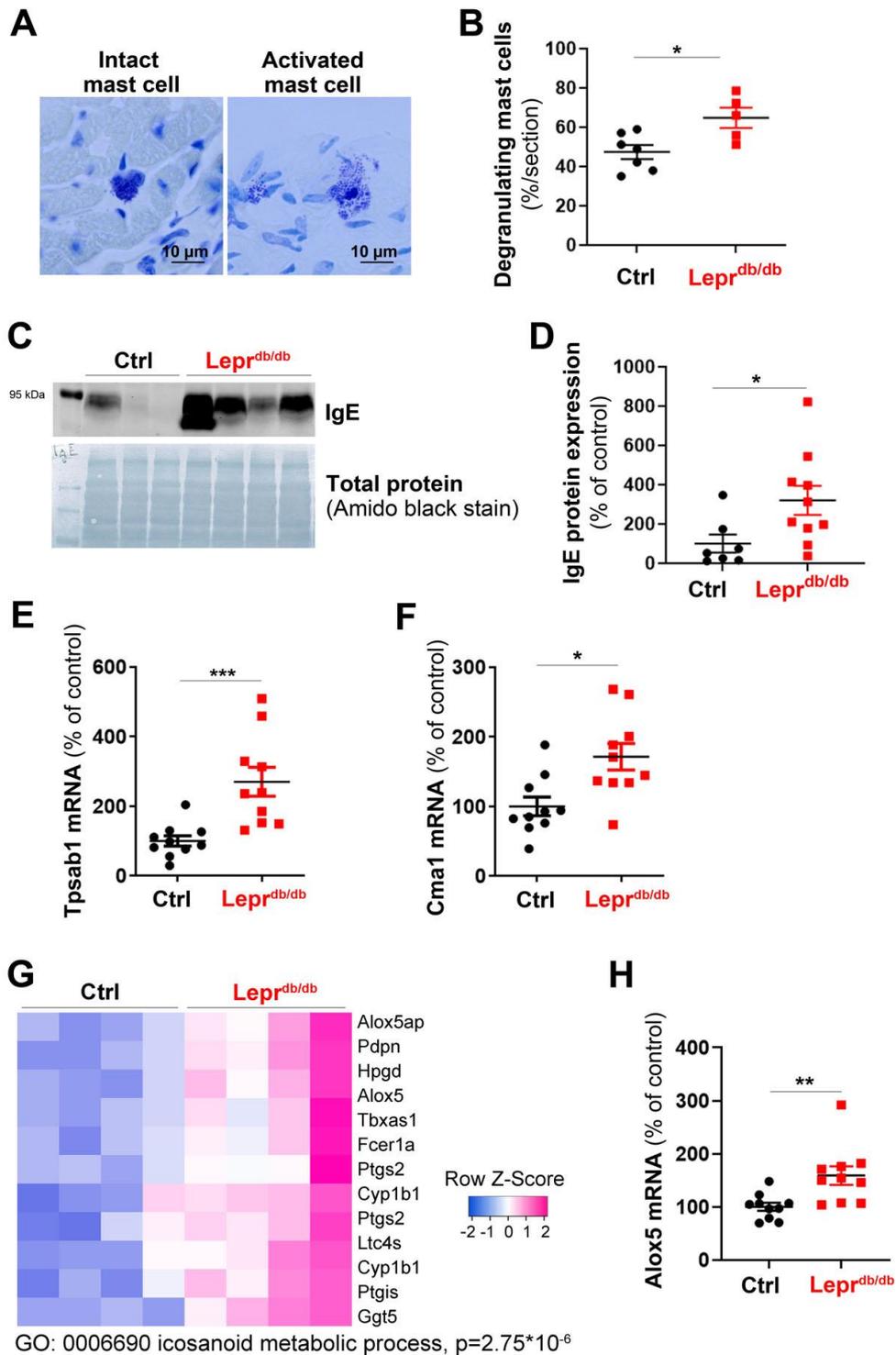


Figure 5: $Lepr^{db/db}$ female mice have increased circulating IgE and cardiac mast cell activation. $Lepr^{db/db}$ female mice and their control $Lepr^{db/+}$ littermates were

sacrificed at 3 months of age. **(A)** Heart cross sections were stained with Toluidine Blue to identify mast cells degranulation (scale bar: 10 μ m). **(B)** The percentage of degranulating mast cell was quantified. **(C)** Plasmatic IgE level was assessed by western blot analysis and **(D)** quantified (n=10 and 7 mice/group). Tpsab1 **(E)** and Cma1 **(F)** mRNA expression was measured via RT-qPCR in total heart biopsies (n=10 mice/group). **(G)** RNA sequencing analysis of the cardiac vascular fraction revealed that “Icosanoid metabolic process” is one of the molecular function significantly increased in *Lepr^{db/db}* mice (n=4 mice/group). **(H)** Alox5 mRNA expression was measured via RT-qPCR in total heart biopsies (n=10 mice/group). *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$. Mann Whitney test.

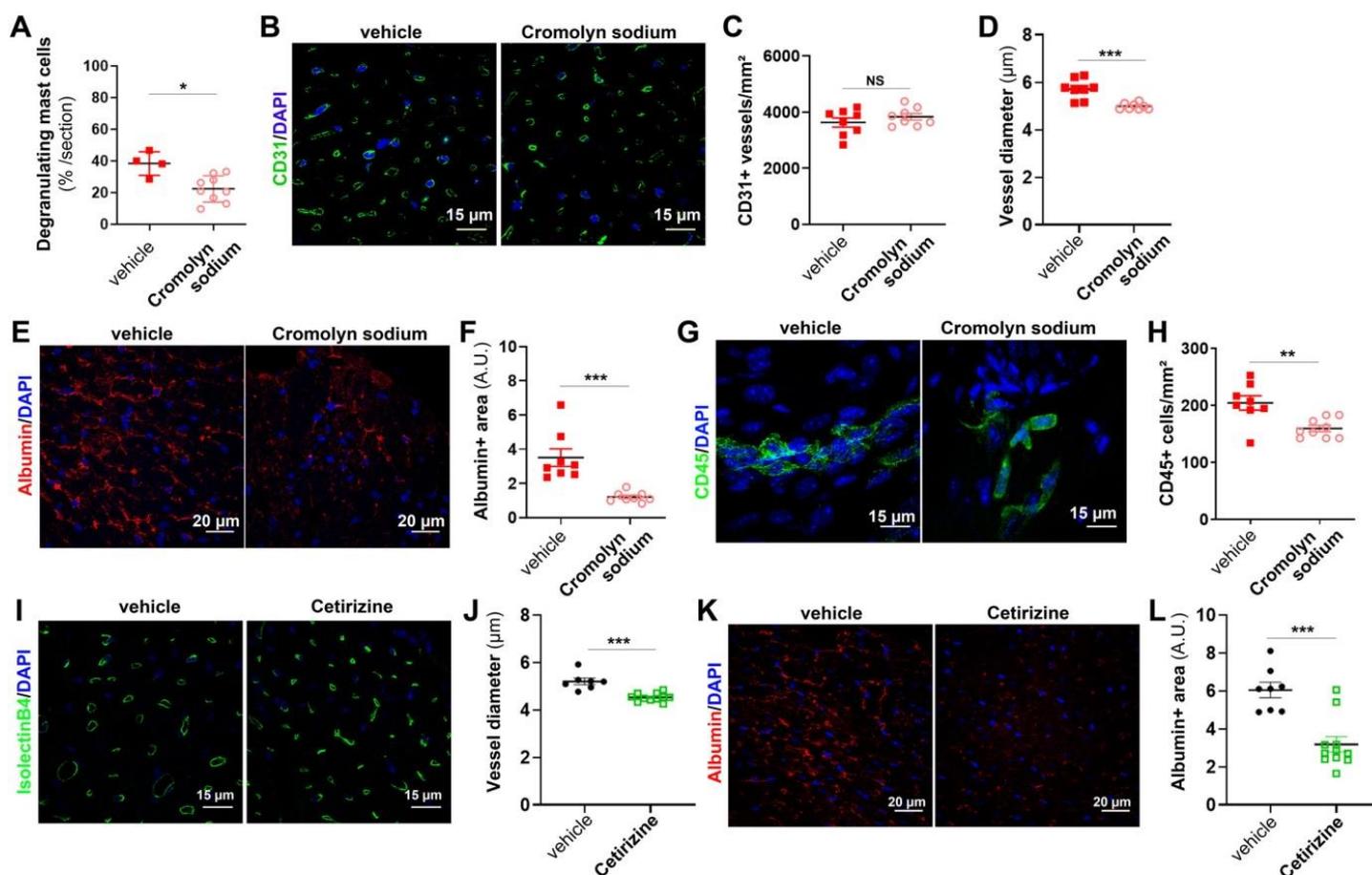


Figure 6: Mast cells promote cardiac small vessel disease in *Lepr^{db/db}* female

mice. (A-H) 2 month old *Lepr^{db/db}* female mice were treated or not with 50 mg/kg/day cromolyn sodium for 28 days. Mice were sacrificed at 3 month of age. (A) Mast cell activation was quantified as the percentage of degranulating mast cells (n=6-8 mice/group). (B) Heart cross sections were immune-stained with anti-CD31 antibodies to identify ECs. Representative pictures are shown (scale bar: 15 µm). (C) Capillary density was quantified as the number of CD31+ vessels/mm² (n= 8 mice/group). (D) The mean cardiac capillary diameter was measured (n= 8 mice/ group). (E) Heart cross sections were immunostained with anti-albumin antibodies to assess vascular leakage. Representative pictures are shown (scale bar: 20 µm). (F) Albumin extravasation was measured as the albumin+ surface area (n=8 mice/ group). (G) Heart cross sections were immunostained with anti-CD45 antibodies to assess

cardiac inflammation. Representative pictures are shown (scale bar: 15 μ m). **(H)** Leucocyte infiltration was measured as the number of CD45+ cells/mm² (n=10 mice/group). **(I-L)** 2 month old Lepr^{db/db} female mice were treated or not with 4 mg/kg/day cetirizine for 28 days. Mice were sacrificed at 3 month of age. **(I)** Heart cross sections were stained with FITC-labelled Isolectin B4 identify ECs. Representative pictures are shown (scale bar: 15 μ m). **(J)** The mean cardiac capillary diameter was measured (n= 10 and 7 mice/ group respectively). **(K)** Heart cross sections were immunostained with anti-albumin antibodies to assess vascular leakage. Representative pictures are shown (scale bar: 20 μ m). **(L)** Albumin extravasation was measured as the albumin+ surface area (n= 10 and 7 mice/ group respectively).*: p \leq 0.05; **: p \leq 0.01; ***: p \leq 0.001. NS: not significant. Mann Whitney test.

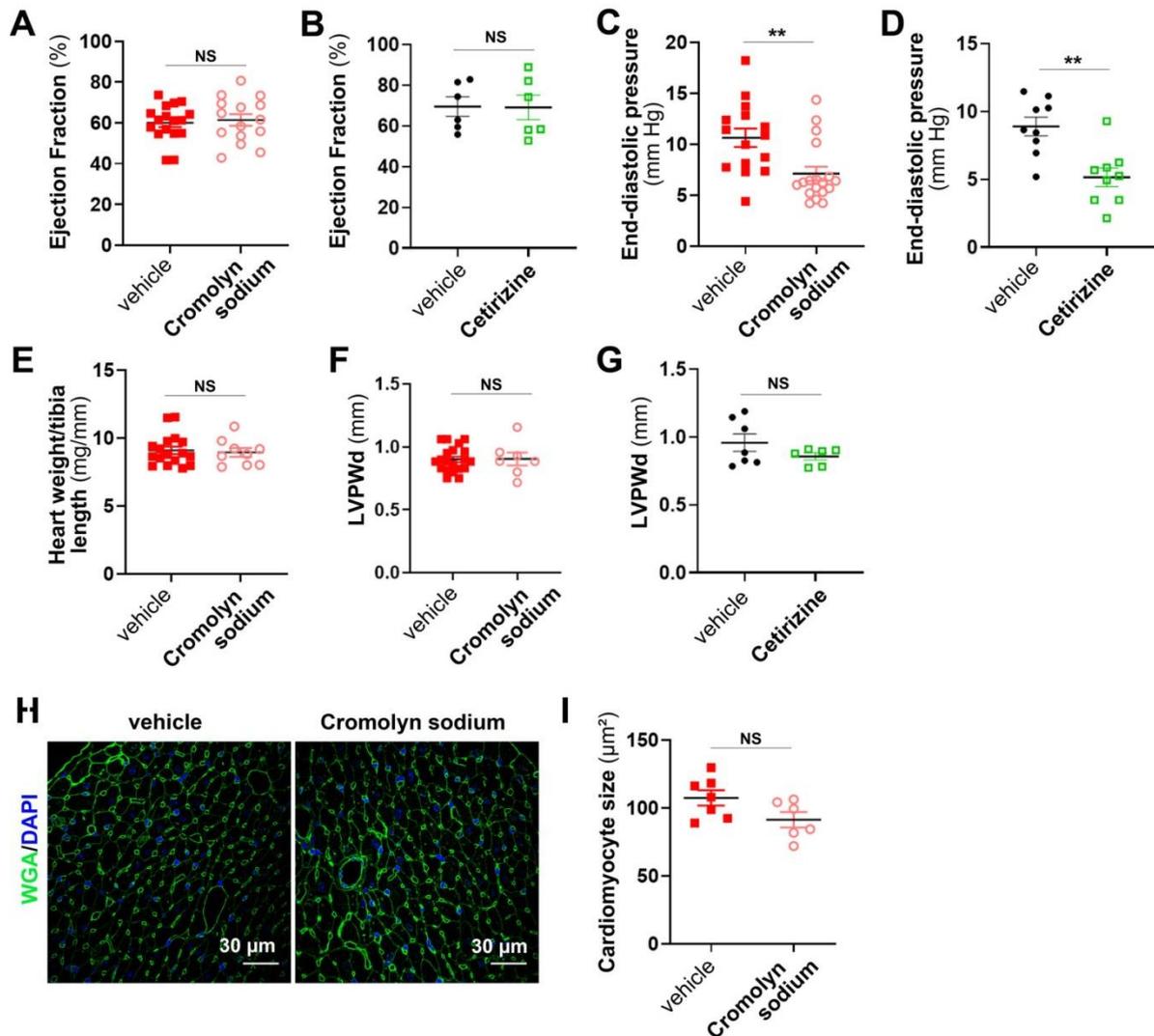


Figure 7: Mast cells promote diastolic dysfunction in $Lepr^{db/db}$ female mice. 2 month old $Lepr^{db/db}$ female mice were either treated with 50 mg/kg/day cromolyn sodium vs control vehicle or 4 mg/kg/day cetirizine vs control vehicle for 28 days. At 3 month of age, mice were subjected to echocardiography, LV catheterization and sacrificed. **(A-B)** Ejection fraction was measured via echocardiography (n=6-15 mice per group). **(C-D)** End diastolic pressure was measured using a pressure catheter (n=9-15 mice per group). **(E)** Heart hypertrophy was assessed by calculating the heart weight over tibia length ratio (n=9-15 mice per group). **(F-G)** End diastolic left ventricular posterior wall thickness during (LVPWd) was measured via

echocardiography. **(H)** Heart cross sections were stained with FITC-labeled WGA. Representative pictures are shown (scale bar: 30 μm). **(I)** The mean cardiomyocyte surface area was measured. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; NS: not significant. Mann Whitney test.

Mast cells are the trigger of small vessel disease and diastolic dysfunction in diabetic obese mice

Authors and affiliations

Sarah Guimbal, MS¹, Lauriane Cornuault, MS¹, Pierre-Louis Hollier, MS¹, Candice Chapouly, PharmD, PhD¹, Marie-Lise Bats, PharmD, PhD¹, Alain-Pierre Gadeau, PhD¹, Thierry Couffinhal, MD, PhD^{1*} and Marie-Ange Renault, PhD^{1*}

Supplementary data

Supplemental table

18S	F	5' -CGCGGTTCTATTTTGTGGT-3'
	R	5' -AGTCGGCATCGTTTATGGTC-3'
Myh7	F	5' -GGATGACGTCACCTCCAACA-3'
	R	5' -AGATCAGAGCCTCCTTCTCGT-3'
Vcam1	F	5' -CGTACACCATCCGCCAGGCA-3'
	R	5' -TAGAGTGCAAGGAGTTCGGGCG-3'
Icam1	F	5' -TGGCCTGGGGGATGCACACT-3'
	R	5' -CCACCGGGCTGTAGGTGGGT-3'
Sele	F	5' -ACGTCCCGGGAAAGATGAAC-3'
	R	5' -GTCAGGAGTGAGGTTCTCGC-3'
Ccl7	F	5' -AAGTGGGTGAGGAGGCTAT-3'
	R	5' -AGCTCCTATCCCTTAGGACCG-3'
Il6	F	5' -CACTTACAAGTCGGAGGCT-3'
	R	5' -CTGCAAGTGCATCATCGTTGT-3'
Cpa3	F	5' -GCCCTTGTTTTGAACGTGCT-3'
	R	5' -TTAAAGTGGGGCTGTTGGGAG-3'
Fcer1a	F	5' -TTCTCCACTGTCAAAGGCCA-3'
	R	5' -GGCAGTGTATTGAGTATTTGCTA-3'
Tpsab1	F	5' -CTTGGACTGGATCCACCACT-3'
	R	5' -TTGAGGCATAGCAGAGAGCG-3'
Cma1	F	5' -CAGCCTGTGAGGAAATCTGGAA-3'
	R	5' -GCAGTTGACAATCTGGGTCTTTA-3'
Alox5	F	5' -CATACCACATGCTGAGGTCCA-3'
	R	5' -CTACAAAAGCAGAAAGGGCCAC-3'
ANP	F	5' -CGTCTTGGCCTTTTGGCTTC-3'
	R	5' -GGTGGTCTAGCAGGTTCTTGAAA-3'
BNP	F	5' -AAGCTGCTGGAGCTGATAAGA-3'
	R	5' -GTTACAGCCCAAACGACTGAC-3'
Col1a1	F	5' -CAACCTCAAGAAGGCCCTGC-3'
	R	5' -TGTCCAAGGGAGCCACATCG-3'
Col3a1	F	5' -AGCACGAGGTCTTGCTGGAC-3'
	R	5' -ACCAGCTGTACCAGGCTGAC-3'
Lox	F	5' -CGCTAGGCACTCTTTGTAACAG-3'
	R	5' -AGTAGTTCATGACTAAGGGCTCA-3'

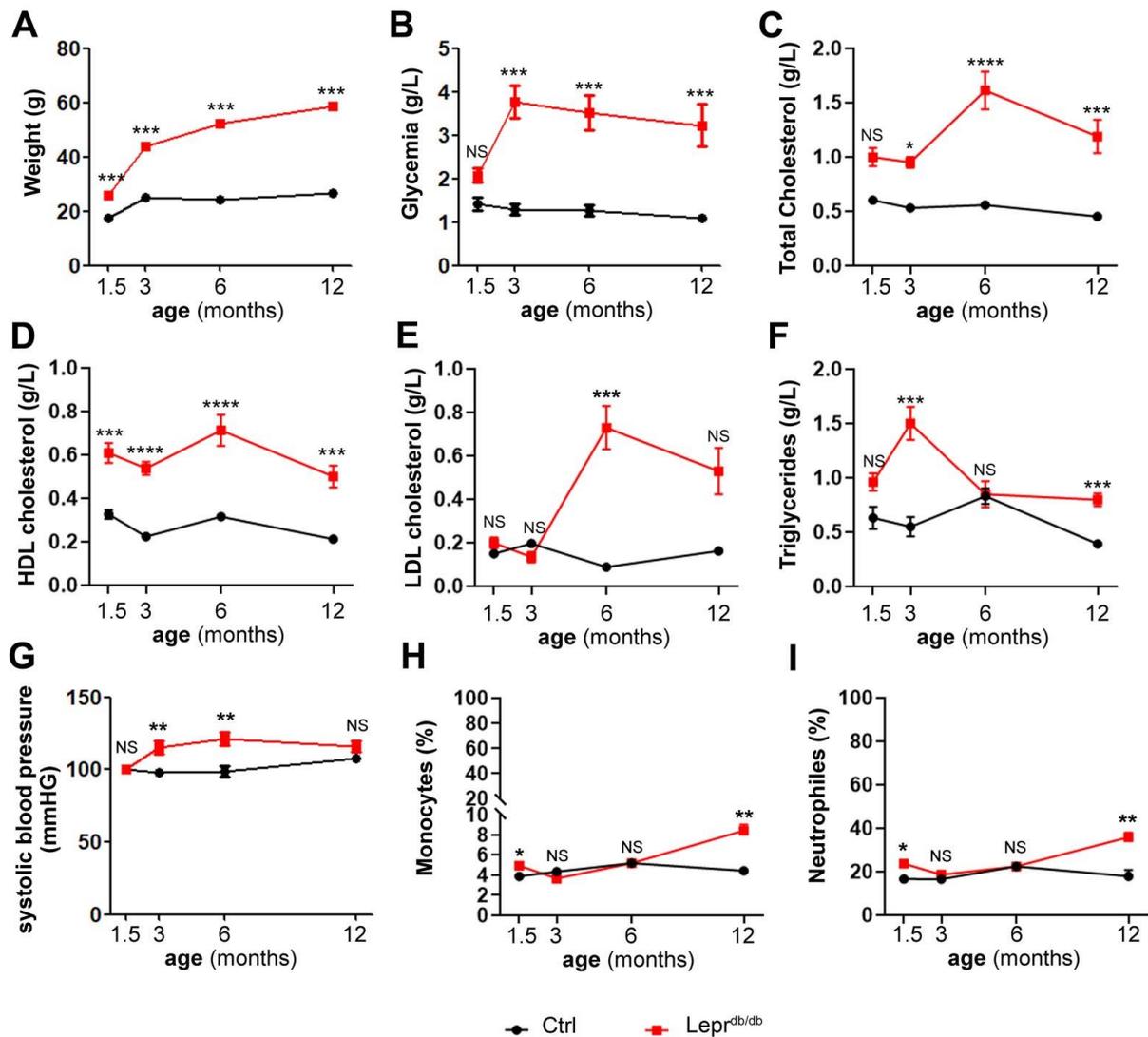
Titin isoform N2-A	F	5' -GAGACATTGCTCCGCTTTTC-3'
	R	5' -GATCTCCAAAGAGGCTGTC-3'
Titin isoform N2-B	F	5' - ACAGTGGGAAAGCAAAGACATC-3'
	R	5' - AGGTGGCCCAGAGCTACTTC-3'
MEF2C	F	5' - TAAGCAGGCAAGGGTCACTG-3'
	R	5' - AAAGTCCAGCTTATGCCGCT-3'
Cx43	F	5' - ATCAGGGAGGCAAGCCATGCTCA-3'
	R	5' - ACGTTGGCCCACACCACAAAGA-3'
Serca2a	F	5' -GATCCTCTACGTGGAACCTTTG-3'
	R	5' -GGTAGATGTGTTGCTAACAACG-3'
Pln	F	5' -TGCTCACTACCACATCAACTTCA-3'
	R	5' -TTCACCAAATCAAACTCCATTTG-3'

F forward, R reverse

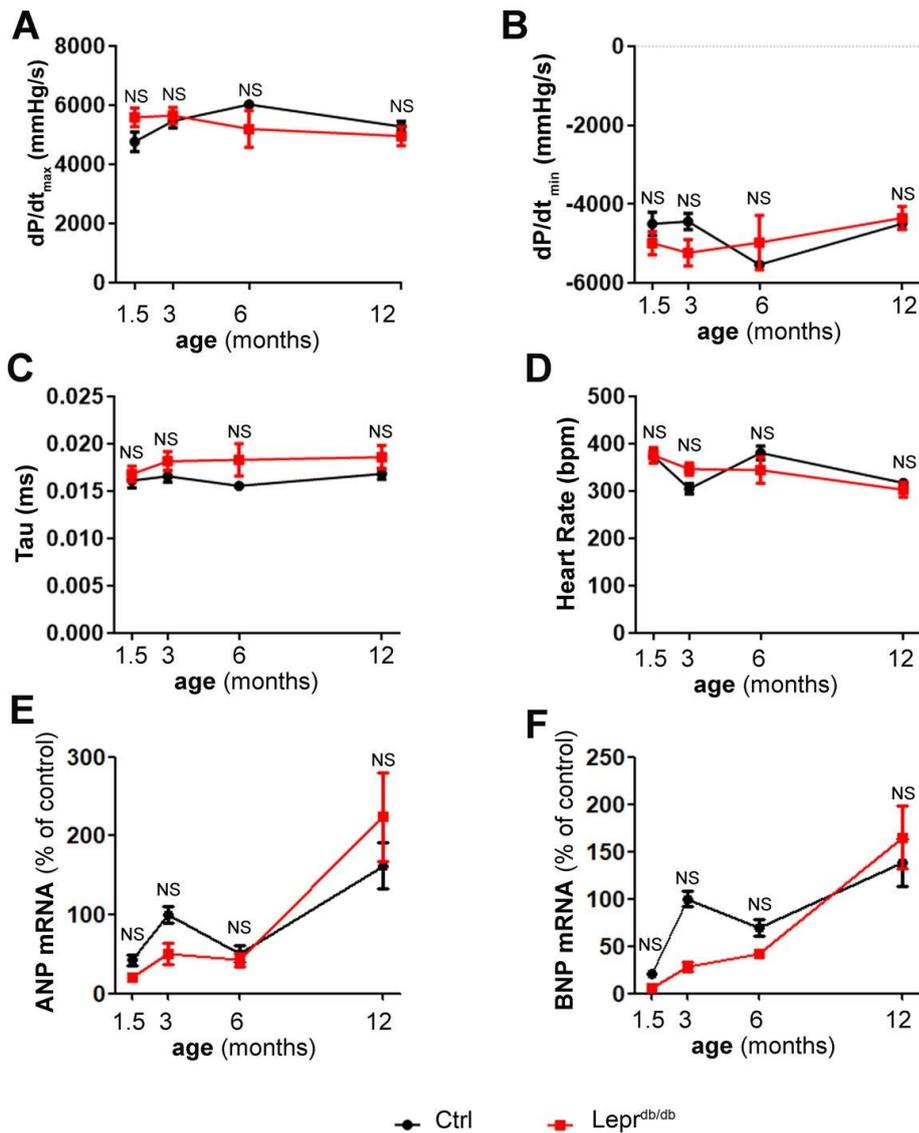
18S was used as the household gene

Supplemental Table I: List of primers used for reverse transcription (RT) quantitative polymer chain reaction (qPCR)

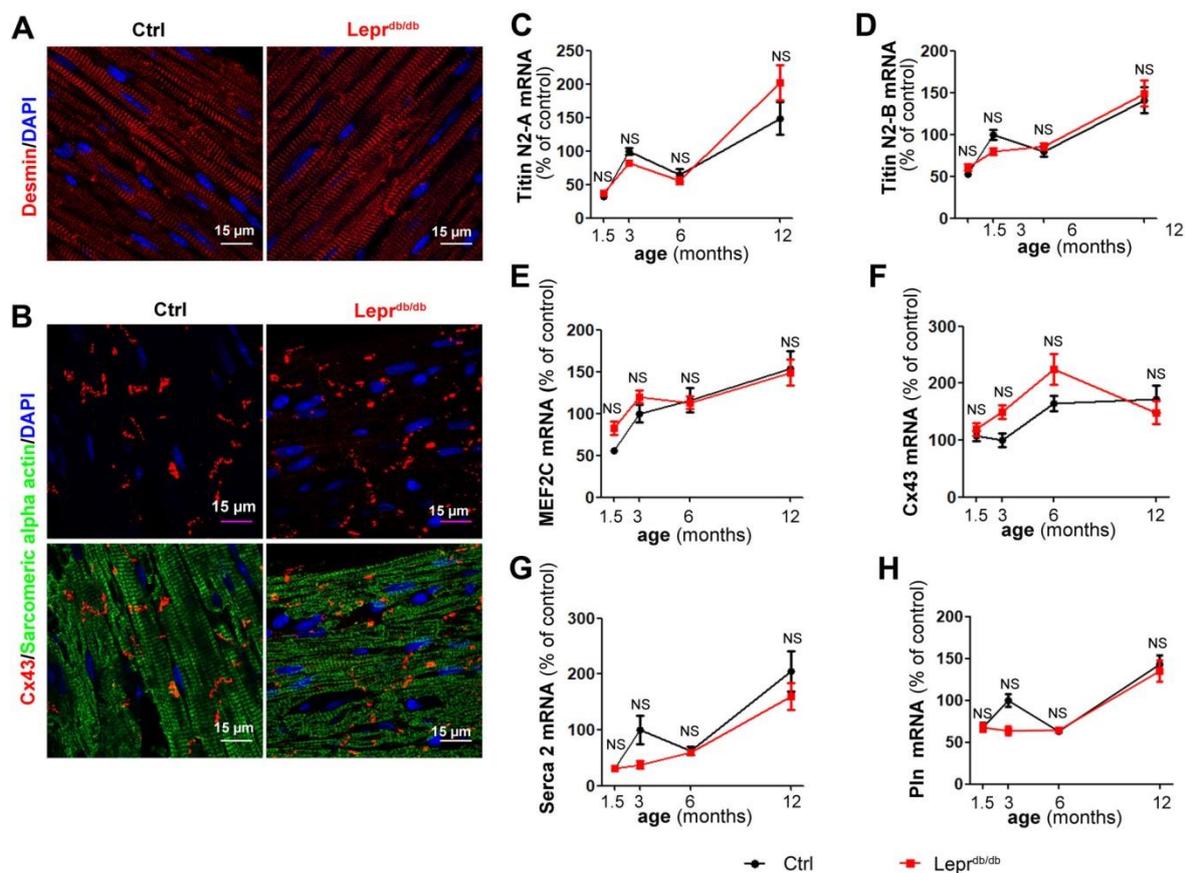
Supplemental Figures and Supplemental Figure legends



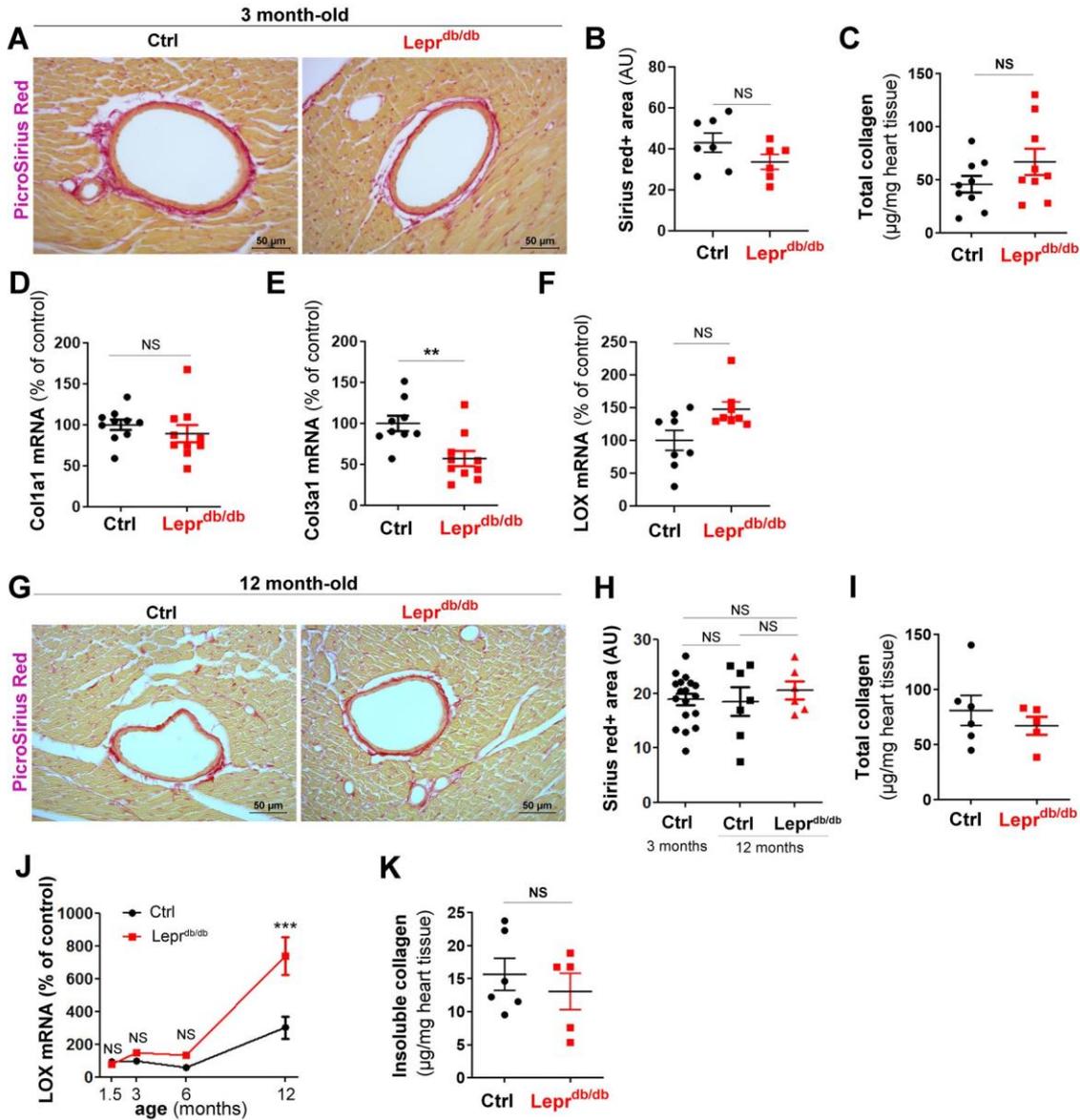
Supplemental Figure 1: (A) The weight of Lepr^{db/db} female mice and control Lepr^{db/+} mice was measured at 1, 5, 3, 6 and 12 months of age. **(B-F, H-I)** Lepr^{db/db} female mice and their control Lepr^{db/+} littermates were harvested with blood at 1, 5, 3, 6 and 12 months of age. Glycaemia **(B)**, Total cholesterol **(C)**, HDL cholesterol **(D)**, LDL cholesterol **(E)** and Triglycerides **(F)** were measured. **(G)** Systolic blood pressure was measured *invasively* using a pressure catheter in Lepr^{db/db} female mice and control Lepr^{db/+} mice at 1,5, 3, 6 and 12 months of age. Circulating monocyte **(H)** and neutrophils **(I)** were counted. *: p≤0.05. **: p≤0.01. ***: p≤0.001. NS: not significant. Two way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test



Supplemental Figure 2: $Lepr^{db/db}$ female mice and their control $Lepr^{db/+}$ littermates were subjected LV catheterization and sacrificed at the indicated time points (n=8 to 15 per group). dP/dt maximum (A), dP/dt minimum (B), Tau (C) and the heart rate (D) were recorded. ANP (E) and BNP (F) mRNA expression was measured via RT-qPCR in heart biopsies. NS: not significant. Two way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.

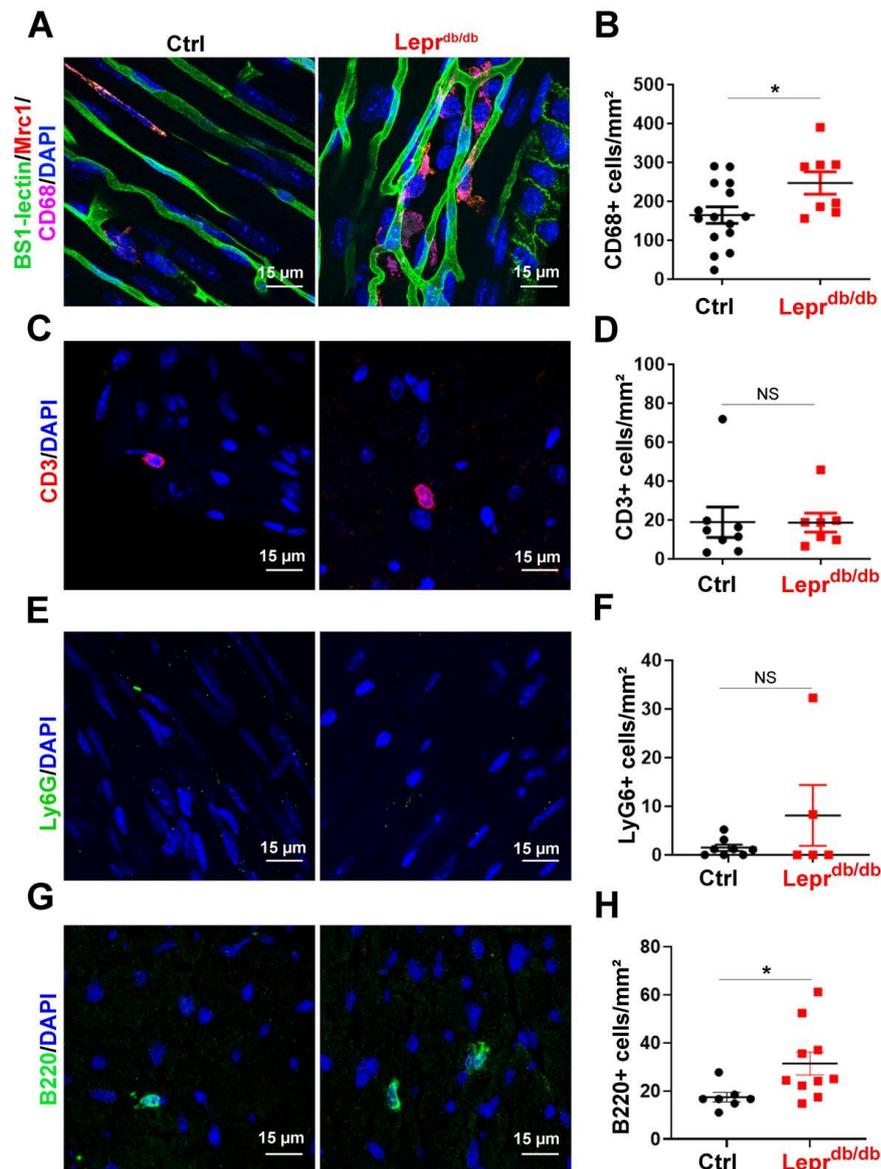


Supplemental Figure 3: *Lepr^{db/db}* female mice and their control *Lepr^{db/+}* littermates were sacrificed at 3 months of age. (A) Heart cross sections were immunostained with anti-Desmin antibodies to identify cardiomyocyte sarcomeres. Representative pictures are shown (scale bar: 15 μ m). (B) Heart cross sections were co-immunostained with anti-Cx43 antibodies (in red) to identify cardiomyocyte intercalated discs and anti-Sarcomeric alpha actin antibodies (in green). Representative pictures are shown (scale bar: 15 μ m). Titin isoform N2-A (C), Titin isoform N2-B (D), MEF2C (E), Cx43 (F), Serca2 (G) and Pln (H) mRNA expression was measured via RT-qPCR in heart biopsies. NS: not significant. Two way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test



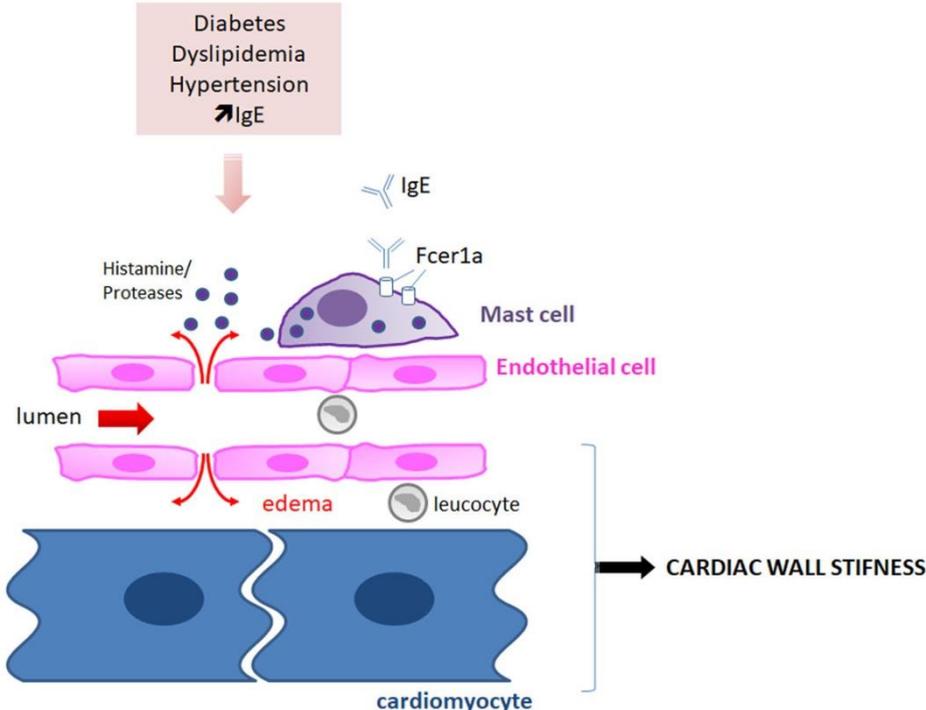
Supplemental Figure 4: *Lepr^{db/db}* female mice do not display significant cardiac fibrosis. (A-F) *Lepr^{db/db}* female mice and their control *Lepr^{db/+}* littermates were sacrificed at 3 months of age. (A) Heart cross sections were stained with Sirius red to identify collagen. Representative pictures are shown (scale bar: 50 µm). (B) Fibrosis was quantified as the Sirius red+ surface area (n=7 mice/group). (C) Total cardiac collagen was assessed using the Sicol™ assay. Col1a1 (D) Col3a1 (E) and LOX mRNA expression was measured via RT-qPCR in heart biopsies. (G-I, K) *Lepr^{db/db}* female mice and their control *Lepr^{db/+}* littermates were sacrificed at 12 months of age. (G) Heart cross sections were stained with Sirius red to identify collagen. Representative pictures are shown (scale bar: 50 µm). (H)

Fibrosis was quantified as the Sirius red+ surface area (n=7 mice/group). (I) Total cardiac collagen was assessed using the Sircol™ assay. (J) LOX mRNA expression was measured via RT-qPCR in heart biopsies at the indicated time points. (K) Unsoluble cardiac collagen was assessed using the Sircol™ assay. **: p≤0.01. ***: p≤0.001. NS: not significant. Two way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test or Mann Whitney test.



Supplemental Figure 5: Lepr^{db/db} female mice and their control Lepr^{db/+} littermates were sacrificed at 3 months of age. (A) Heart cross sections were immunostained with anti-CD68 antibodies to identify macrophages. Representative pictures are shown (scale bar: 15 μm). (B) Macrophage infiltration was quantified as the number of CD68+ cells/mm². (C) Heart cross sections were immunostained with anti-CD3 antibodies to identify T Lymphocytes. Representative pictures are shown (scale bar: 15 μm). (D) T-Lymphocyte infiltration was

quantified as the number of CD3+ cells/mm². (E) Heart cross sections were immunostained with anti-Ly6G antibodies to identify neutrophils. Representative pictures are shown (scale bar: 15 μm). (F) Neutrophil infiltration was quantified as the number of Ly6G+ cells/mm². (G) Heart cross sections were immunostained with anti-B220 antibodies to identify B Lymphocytes. Representative pictures are shown (scale bar: 15 μm). (H) B Lymphocyte infiltration was quantified as the number of B220+ cells/mm². *: p≤0.05. **: p≤0.01. ***: p≤0.001. NS: not significant. Mann Whitney test.



Supplemental Figure 6: Schema recapitulating the findings

4.2 Le rôle de la dysfonction endothéliale seule dans le développement de l'ICFEP

4.2.1 Rationnel et résultats obtenus

Bien que la dysfonction diastolique soit fortement associée à la maladie des petits vaisseaux cardiaques, si oui ou non la maladie des petits vaisseaux participe à la physiopathologie de la dysfonction diastolique n'est pas connu. Nous nous sommes donc fixés comme objectif d'évaluer les conséquences d'une dysfonction vasculaire génétiquement induite, c'est-à-dire en absence de tout autre facteur de risque cardiovasculaire, sur la structure et la fonction du myocarde.

Nous avons utilisé les souris déficientes pour *DHH* (Dhh^{ECKO}) comme modèle de dysfonction endothéliale génétiquement induite. En effet, les résultats précédents de l'équipe montrent que *DHH* est un garant de l'intégrité endothéliale, puisque les souris Dhh^{ECKO} présentent notamment une perméabilité vasculaire accrue et une activation des cellules endothéliales (Caradu et al., 2018a).

4.2.1.1 *Les souris Dhh^{ECKO} présentent une dysfonction des microvaisseaux cardiaques*

Dans un premier temps, afin de valider ce modèle de dysfonction endothéliale génétiquement induite, nous avons phénotypé les petits vaisseaux cardiaques des souris Dhh^{ECKO} un mois après avoir induit la délétion de *DHH* par administration de tamoxifène.

Nous avons tout d'abord quantifié la densité et le diamètre des capillaires dans le cœur des souris Dhh^{ECKO} et des souris contrôles. Celle-ci n'est pas différente chez les souris Dhh^{ECKO} comparé aux souris contrôles (Figure 34 A, B) cependant le diamètre des capillaires est significativement diminué (-5%) chez les souris Dhh^{ECKO} (Figure 34 C).

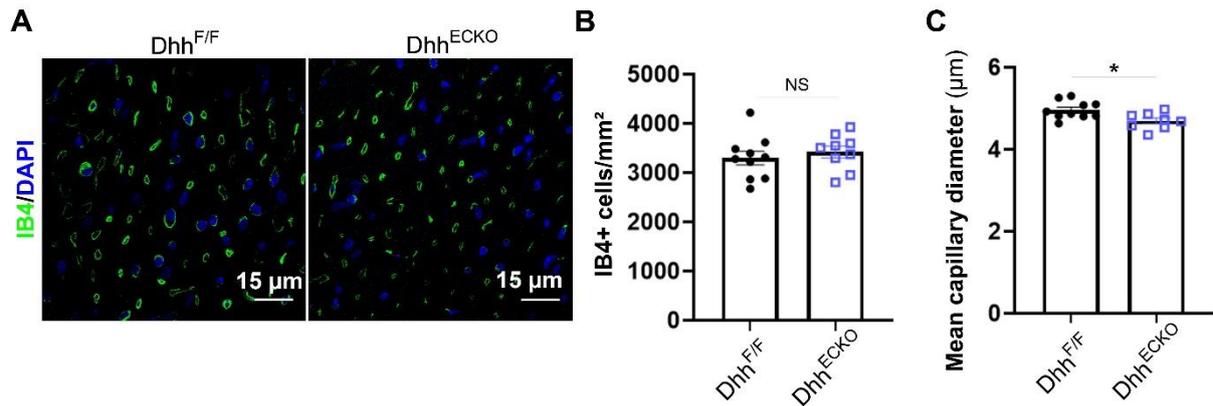


Figure 34. Les souris Dhh^{ECKO} et leurs contrôles ont été sacrifiés à un mois post-injection au tamoxifène. Le réseau vasculaire est marqué avec l'isolectine B4 (IB4) sur des coupes de cœur de 7 µm (A). La densité capillaire est quantifiée par le nombre de vaisseaux IB4+/mm² (n=9 souris/groupe) (B). Le diamètre des vaisseaux moyen a été mesuré (n=9 et 8 souris par groupe) (C). Analyses statistiques : Mann-Whitney. * : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 ; ns = non significatif

Afin de mettre en évidence des altérations phénotypiques de ces capillaires, nous avons tout d'abord mesuré la perméabilité vasculaire en quantifiant l'extravasation de la protéine plasmatique albumine et nous avons démontré une augmentation de sa présence dans l'espace périvasculaire (Figure 35 A, B). Ces résultats confirment nos résultats précédents démontrant une augmentation de l'extravasation du Dextran de 70 KDa et une altération de l'épaisseur des jonctions adhérentes de l'endothélium de l'aorte (Figure 35 C, D) (Caradu et al., 2018a).

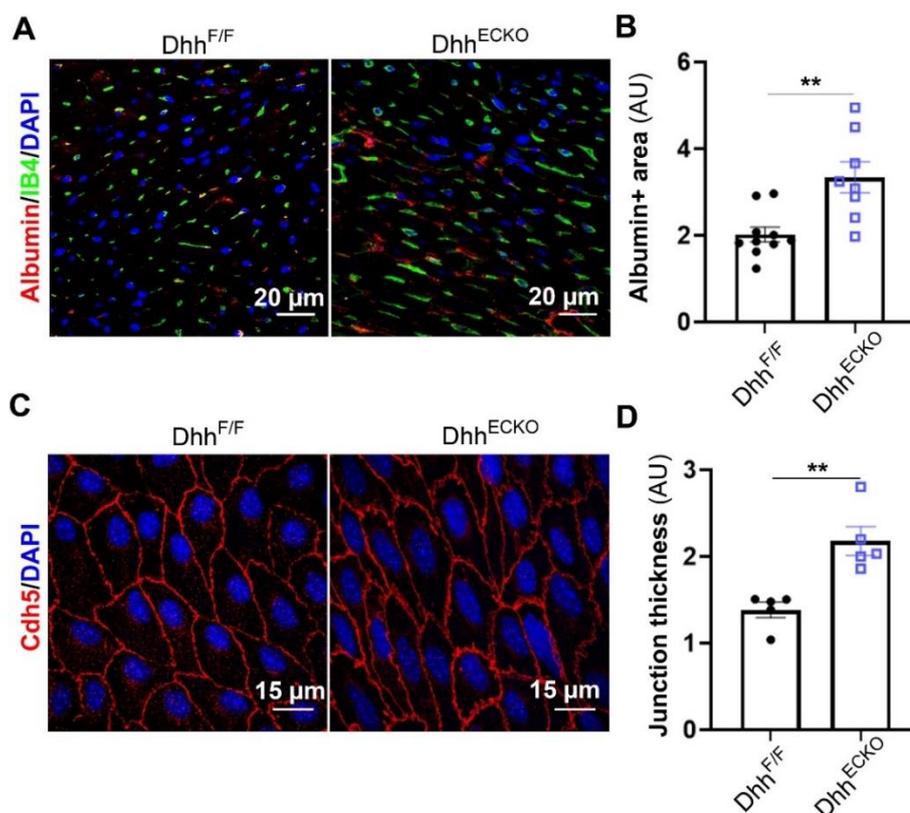


Figure 35. Les souris Dhh^{ECKO} et leurs contrôles ont été sacrifiés à un mois post-injection au tamoxifène. Les coupes de cœurs de 7µm ont été immunomarquées avec un anticorps anti-Albumine afin de quantifier la perméabilité vasculaire (A). L'extravasation de l'albumine a été quantifiée telle que l'aire d'albumine+ (n=9 et 8 souris par groupe) (B). Les aortes montées en face ont été marquées avec un anticorps anti-Cdh5 (C) afin de quantifier l'épaisseur des jonctions endothéliales (n=5 souris par groupe) (D). Analyses statistiques : Mann-Whitney. * : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 ; ns = non significatif

Nous avons ensuite recherché si le phénotype des cellules endothéliales des souris Dhh^{ECKO} était pro-inflammatoire. Nous avons notamment isolé les cellules CD31+ cardiaques de ces souris et quantifié l'expression des ARNm de *Icam1*, *Vcam1* et *Sele* (Figure 36 A-C). Ni l'expression de *Icam1*, ni celle de *Vcam1* ou de *Sele* est modifiée, cependant, nous avons mis en évidence une infiltration plus importante de leucocytes dans le tissu cardiaque chez les souris Dhh^{ECKO} (Figure 37 A, B). Cet infiltrat de leucocytes est composé de macrophages M2 CD68+, lymphocytes B CD3+ et de neutrophiles LyG+.

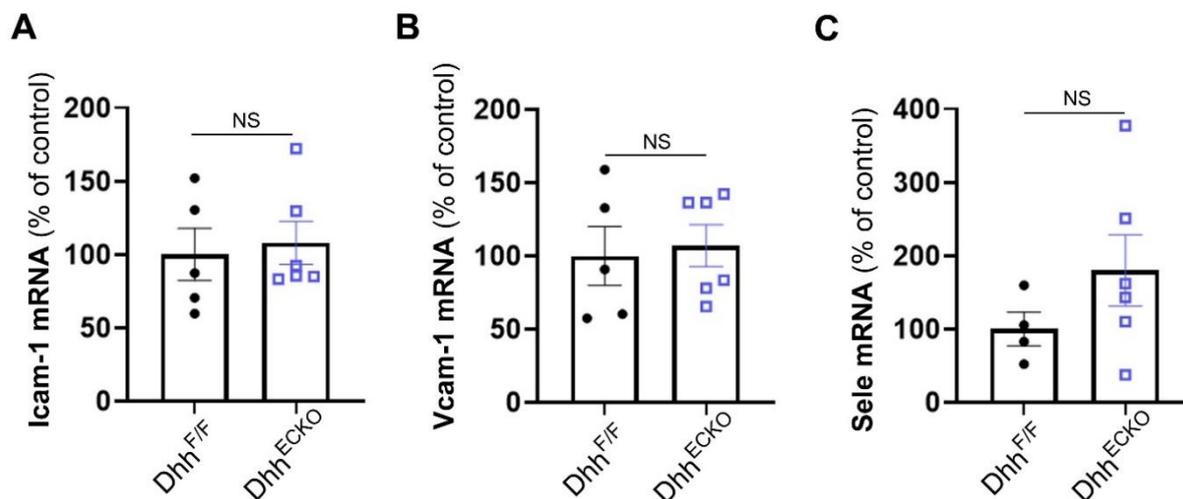


Figure 36. Les souris Dhh^{ECKO} et leurs contrôles ont été sacrifiés à un mois post-injection au tamoxifène. Les niveaux d'expression d'ARNm d'Icam-1 (A), Vcam-1 (B) et Sele (C) ont été mesurés par PCR quantitative sur des cellules endothéliales isolées de cœurs de souris Dhh^{ECKO} et leurs contrôles un mois après injection au tamoxifène. Analyses statistiques : Mann-Whitney. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; ns = non significatif

Nous avons retrouvé une augmentation de l'infiltration des macrophages CD68+ (figure 37 C, D) mais pas des lymphocytes ou des neutrophiles chez les souris Dhh^{ECKO} (Figure 38 A-C).

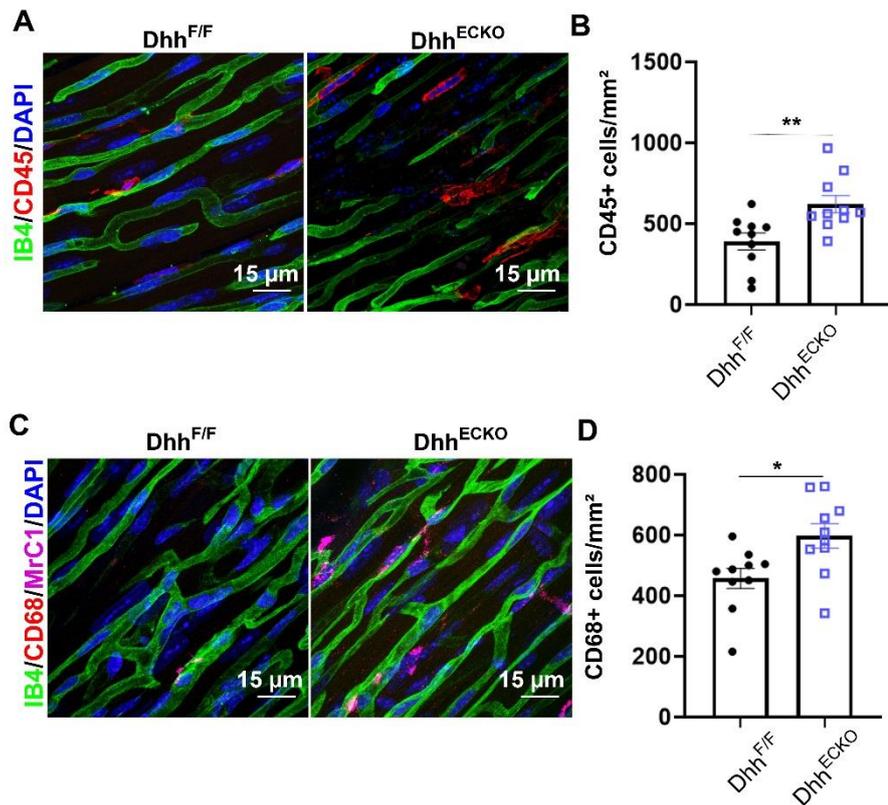


Figure 37. Les souris Dhh^{ECKO} et leurs contrôles ont été sacrifiés à un mois post-injection au tamoxifène. Les coupes de cœur de $7\mu m$ sont immunomarquées avec un anticorps anti-CD45 (A) et l'infiltrat de leucocytes a été quantifié par le nombre de cellules $CD45+/mm^2$ (B). Les coupes de cœurs sont immunomarquées avec un anticorps anti-CD68 et de l'isolectine B4 (C). Les macrophages ont été quantifiés par le nombre de cellules $CD68+/mm^2$ (D). Les noyaux sont marqués avec du DAPI. Analyses statistiques : Mann-Whitney. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; ns = non significatif

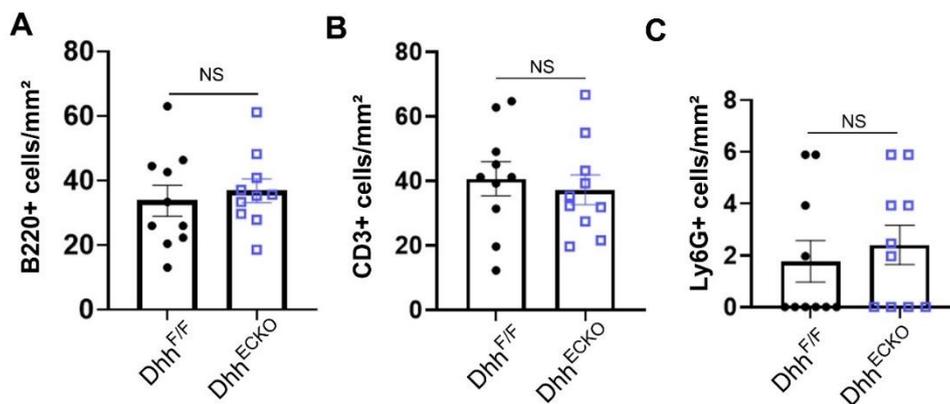


Figure 38. Les souris Dhh^{ECKO} et leurs contrôles ont été sacrifiés à un mois post-injection au tamoxifène. L'infiltrat de lymphocytes B a été quantifié par le nombre de cellules $B220+/mm^2$, de lymphocytes T par le nombre de cellules $CD3+/mm^2$ et de neutrophiles par le nombre de cellules $Ly6G+/mm^2$. Analyses statistiques : Mann-Whitney. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; ns = non significatif

Finalement, nous avons recherché la présence de fibrose périvasculaire. Le collagène a été marqué par le rouge Sirius. Nous avons démontré une augmentation significative de la présence de collagène autour des vaisseaux (Figure 39 A, B).

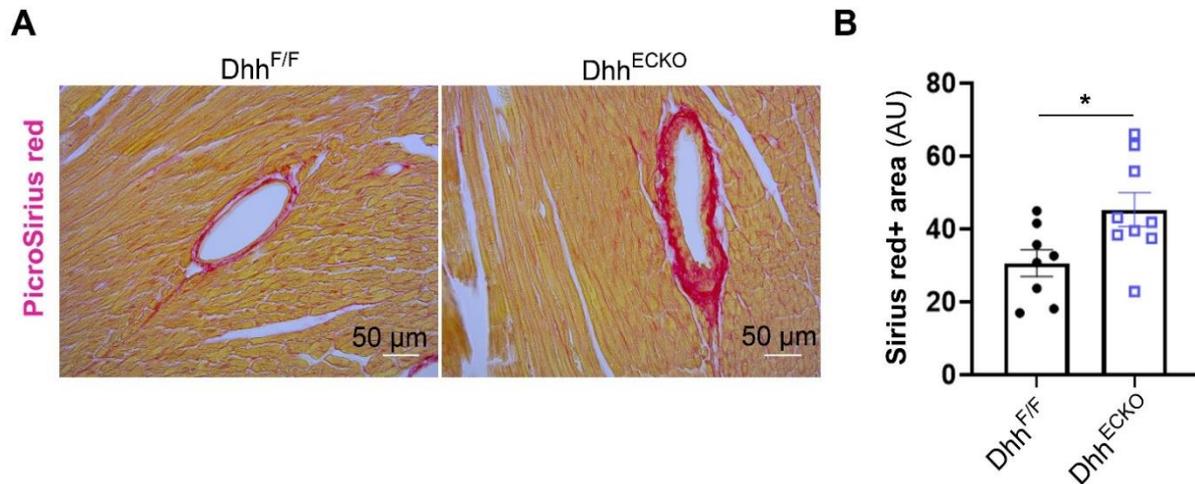


Figure 39. Les souris Dhh^{ECKO} et leurs contrôles ont été sacrifiés à un mois post-injection au tamoxifène. Les coupes de cœurs de 7µm sont marquées avec du Sirius red pour identifier le collagène (A). La fibrose périvasculaire est quantifiée par l'aire Sirius red+ (n=8 et 9 souris par groupe) (B). Analyses statistiques : Mann-Whitney. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; ns = non significatif

En conclusion, la maladie des petits vaisseaux cardiaques des souris Dhh^{ECKO} est caractérisée par une diminution du diamètre des capillaires et une synthèse accrue de matrice extracellulaire, une perméabilité augmentée, et probablement un phénotype pro-inflammatoire qui reste à caractériser. Par ailleurs, des résultats préliminaires, obtenus par myographie, suggèrent que la vasomotricité dépendante du •NO n'est pas altérée chez les souris Dhh^{ECKO} (Figure 40 A,B).

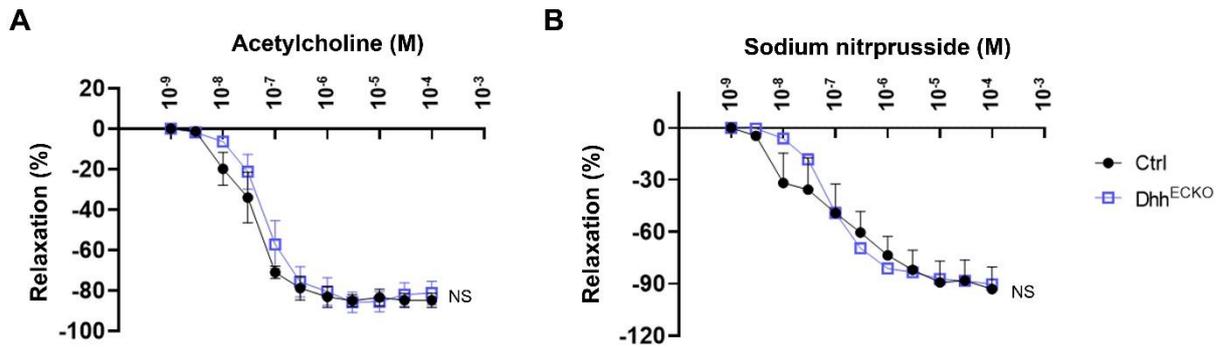


Figure 40. Les artères fémorales des souris DhhECKO et contrôles ont été prélevées et soumises à des tests de vasomotricité. La courbe cumulative de concentration-relaxation en réponse à l'acétylcholine et le nitroprusside de sodium est montrée. La réponse est exprimée en pourcentage de diminution de la précontraction induite par la phényléphrine. Les valeurs ont été normalisées à 80 mmol/L de niveau de contraction induit par le KCL initial. Analyses statistiques : Wilcoxon. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; ns = non significatif

4.2.1.2 *Le KO endothéliale de Dhh est suffisant pour induire une dysfonction diastolique.*

Dans le but d'évaluer les conséquences d'une dysfonction vasculaire sur la structure et la fonction cardiaque, nous avons mesuré la fonction cardiaque par échocardiographie et par cathétérisation du ventricule gauche chez les souris Dhh^{ECKO}. Les souris Dhh^{ECKO} présentent une augmentation significative des pressions télédiastoliques comparé aux souris contrôles, et cette augmentation est associée à une FEVG normale (>50%) (Figure 41 A, B), ce qui correspondant au phénotype retrouvé chez les patients atteints d'ICFep.

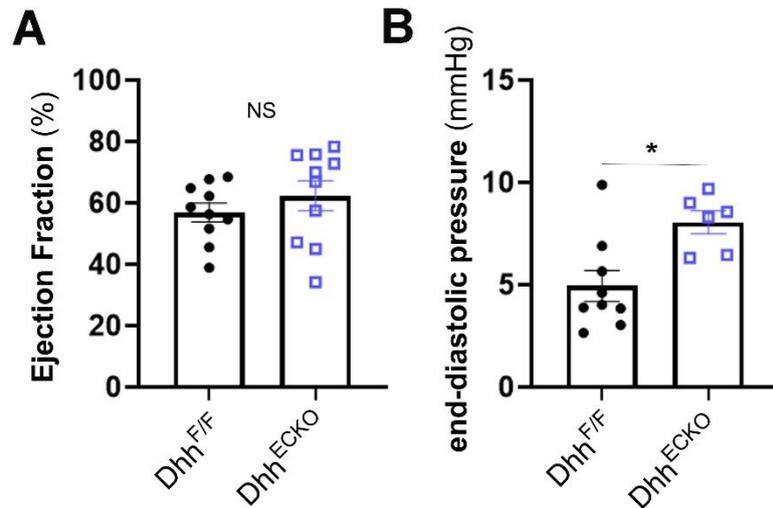


Figure 41. Une échocardiographie et une cathétérisation du VG ont été effectuées sur les souris Dhh^{ECKO} et leurs contrôles. Les souris Dhh^{ECKO} et leurs contrôles sacrifiés à un mois post-injection au tamoxifène (n=10 par groupe de souris). La FEVG est mesurée par échocardiographie (A). La pression télédiastolique a été quantifiée par un cathéter de pression (B). Analyses statistiques : Mann-Whitney. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; ns = non significatif

Notamment, ni la contractilité (dp/dt maximum) ni la relaxation cardiaque active (dp/dt minimum et Tau) ne sont différentes chez les souris Dhh^{ECKO} et les souris contrôles suggérant un défaut de remplissage passif du myocarde (Figure 42) sans défaut de la relaxation active du myocarde.

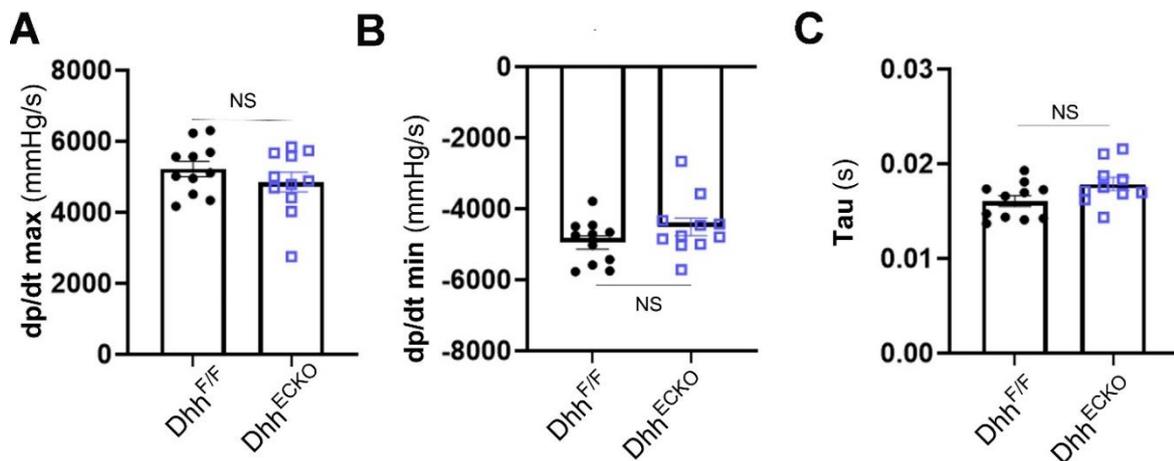


Figure 42. Une cathétérisation du VG ont été effectuées sur les souris Dhh^{ECKO} et leurs contrôles. Les souris Dhh^{ECKO} et leurs contrôles ont été sacrifiés à un mois post-injection au tamoxifène (n=10 par groupe de souris). Le dp/dt max (A), dp/dt min (B) et Tau (C) ont été enregistrés par un cathéter de pression. Analyses statistiques : Mann-Whitney. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; ns = non significatif

Nous avons confirmé l'existence d'une insuffisance cardiaque chez les souris Dhh^{ECKO} en les soumettant à un test d'effort. En effet, les souris Dhh^{ECKO} courent moins longtemps et parcourent une distance plus courte que des souris contrôles sur un tapis de course indiquant qu'elles ont une moins bonne résistance à l'effort physique (Figure 43 A, B).

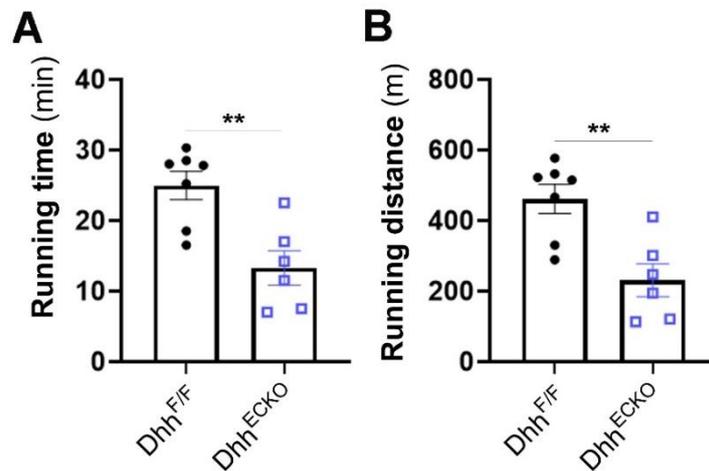


Figure 43. Les souris Dhh^{ECKO} et leurs contrôles ont passé un test de fatigue sur tapis de course à un mois post-injection au tamoxifène. Le temps de course (A) et la distance parcourue (B) ont été enregistrés. Analyses statistiques : Mann-Whitney. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; ns = non significatif

En conclusion, nos résultats démontrent qu'une maladie des petits vaisseaux cardiaques est suffisante pour induire une dysfonction diastolique et une intolérance à l'effort.

4.2.1.3 Mécanismes ?

Il faut noter que l'augmentation de la pression télédiastolique observée chez les souris Dhh^{ECKO} , n'est pas associée à une hypertrophie cardiaque, en effet, ni le ratio « poids du cœur/longueur du tibia », ni l'épaisseur des parois cardiaques, ni la taille des cardiomyocytes ne sont modifiées chez les souris Dhh^{ECKO} (Figure 44 A-E).

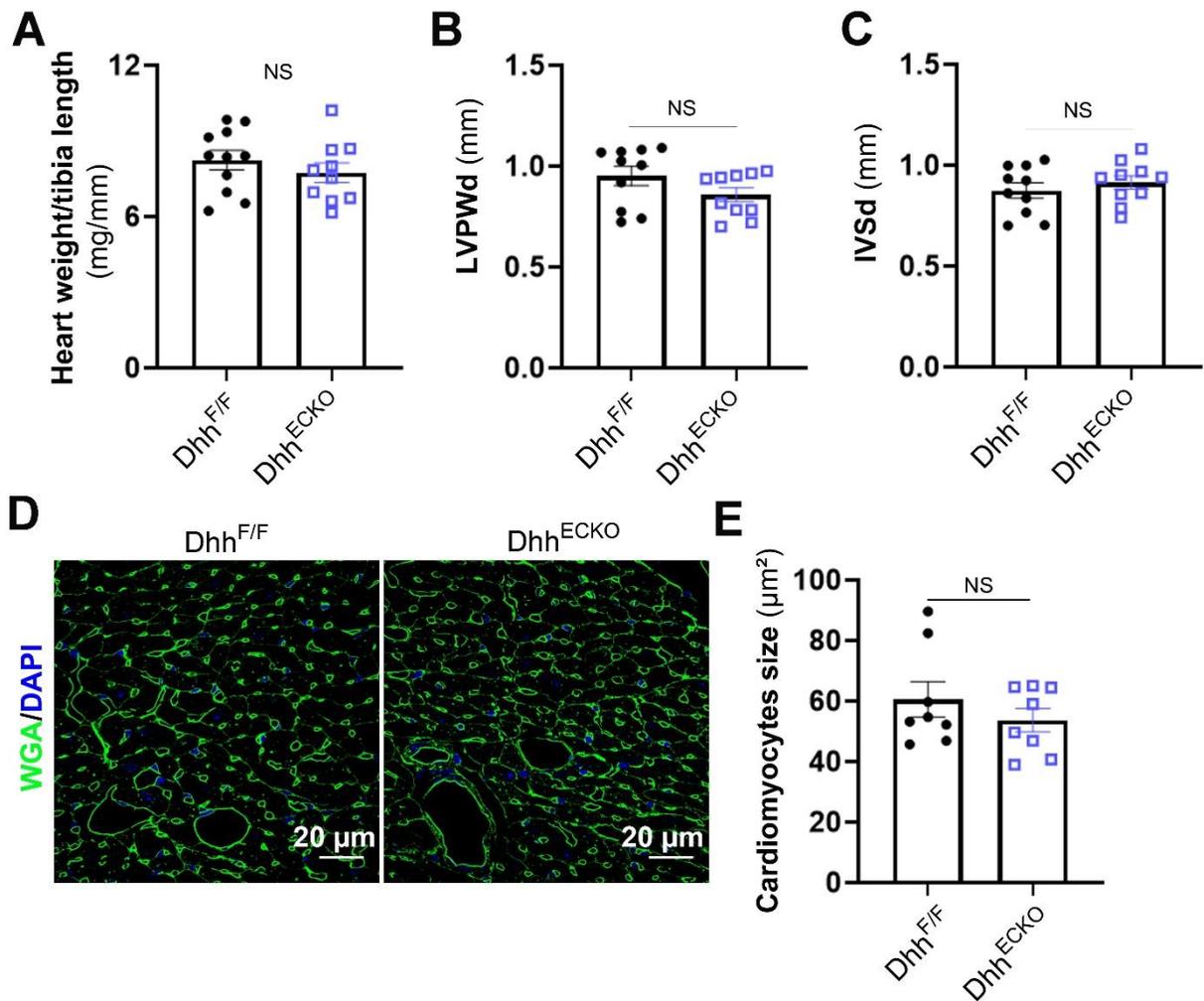


Figure 44. Les souris Dhh^{ECKO} et leurs contrôles ont été sacrifiées à un mois post-injection au tamoxifène. L'hypertrophie cardiaque a été mesurée par le ratio poids du cœur sur longueur du tibia (A). L'épaisseur de la paroi postérieure de VG (B) et du septum interventriculaire (C) a été mesurée par échocardiographie. Les coupes de cœur de 7 µm ont été immunomarquées avec du WGA FITC (D). La surface d'aire moyenne des cardiomyocytes a été quantifiée (E). Analyses statistiques : Mann-Whitney. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; ns = non significatif

Afin d'identifier les mécanismes impliqués dans le développement de la dysfonction diastolique chez les souris Dhh^{ECKO}, nous avons réalisé un séquençage aléatoire du transcriptome du cœur total de souris Dhh^{ECKO} et leurs contrôles à un mois post-injection au tamoxifène. Cette analyse transcriptomique a identifié 34 gènes dont l'expression est significativement augmentée dans le cœur des souris Dhh^{ECKO} et 3 gènes dont l'expression est significativement diminuée. Parmi les gènes augmentés, 12 sont impliqués dans la régulation des plaquettes sanguines, notamment leur formation (*Clec1b/Mpl*) (Figure 45 A), leur activation (*Alox12/Gp1ba/Gp5/Itga2b/Itgb3/Trem1*) et leur agrégation (*Alox12/Gp1ba/Itga2b/Itgb3*) (Figure 45 B) et 5 sont des facteurs de transcription associés au cycle circadien.

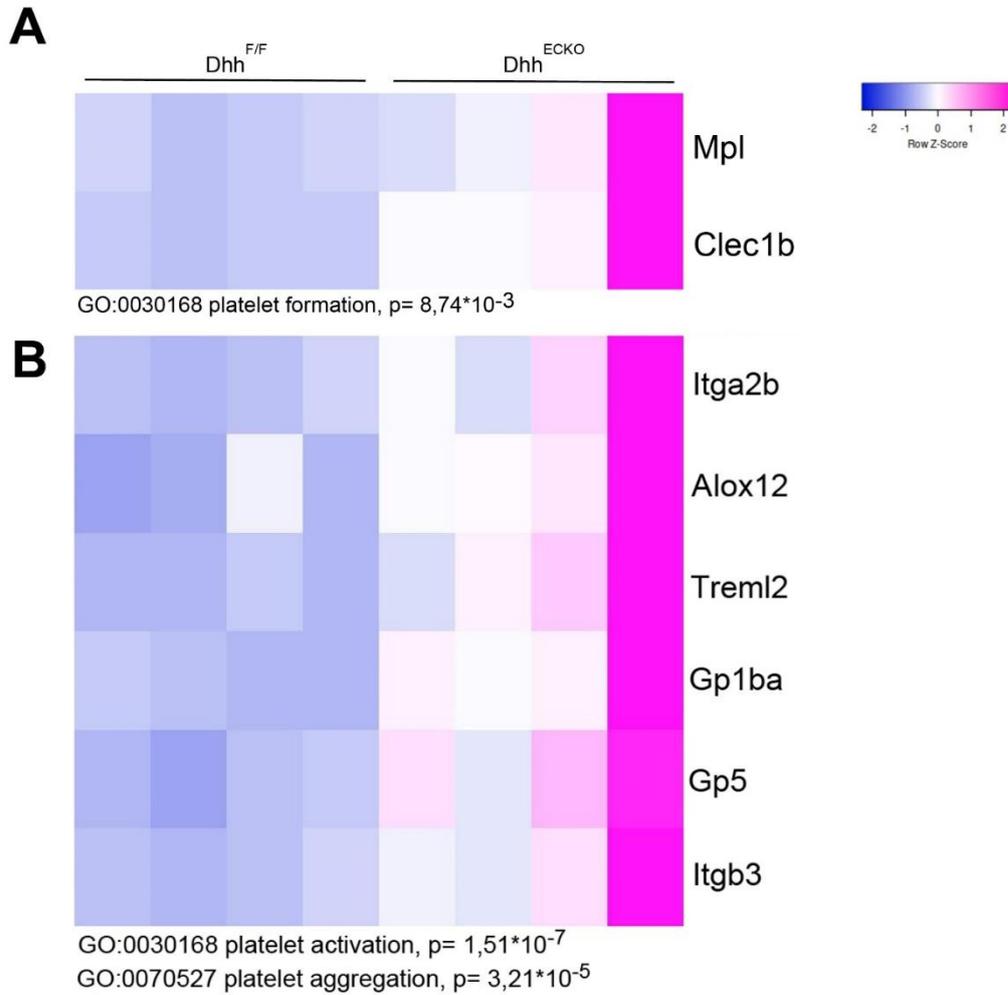


Figure 45. Le séquençage aléatoire du transcriptome du cœur total de souris Dhh^{ECKO} et leurs contrôles à un mois post-injection au tamoxifène a révélé que le processus « formation plaquettaire » est une des processus biologiques augmenté significativement chez les souris Dhh^{ECKO} (n=4 souris par groupe) (A). Le séquençage aléatoire du transcriptome du cœur total de souris Dhh^{ECKO} et leurs contrôles à un mois post-injection au tamoxifène a révélé que le processus « activation plaquettaire » et « agrégation plaquettaire » sont des processus biologiques augmentés significativement chez les souris Dhh^{ECKO} (n=4 souris par groupe) (B).

Finalement cette analyse a mis en évidence une augmentation significative de l'expression de Tcap, que nous avons vérifié par qPCR, dans le cœur des Dhh^{ECKO} (Figure 46). Ce gène exprime la petite protéine téléthonine qui régule l'assemblage du sarcomère et assure sa stabilité en association avec la Titine (Gregorio et al., 1998; Valle et al., 1997).

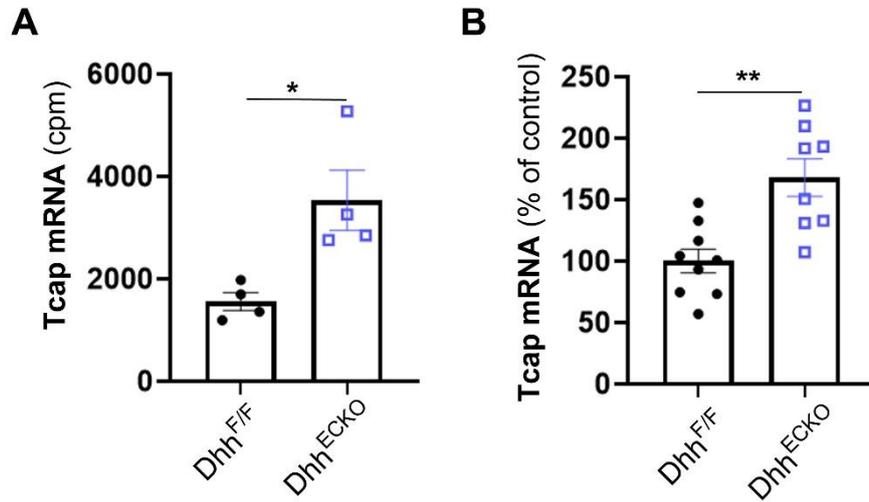


Figure 46. Le séquençage aléatoire du transcriptome du cœur total de souris Dhh^{ECKO} et leurs contrôles à un mois post-injection au tamoxifène a révélé une augmentation de l'expression de Tcap (A). Le niveau d'expression d'ARNm de Tcap-1 (B), a été mesuré par PCR quantitative sur le cœur total de souris Dhh^{ECKO} et leurs contrôles un mois après injection au tamoxifène. Analyses statistiques : Mann-Whitney. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; ns = non significatif

Nous avons alors fait l'hypothèse que les cellules endothéliales Dhh^{ECKO} présentent un phénotype pro-thrombotique et avons quantifié la quantité de facteur de Von Willebrand exposée à la surface des cellules endothéliales de l'aorte des souris Dhh^{ECKO} et des souris contrôles. Nos résultats montrent que la quantité de facteur de Von Willebrand exposée à la surface des cellules endothéliales est en effet significativement augmentée chez les souris Dhh^{ECKO} ce qui pourrait favoriser la formation de thrombi dans les capillaires cardiaques et diminuer la perfusion du myocarde (Figure 47 A, B).

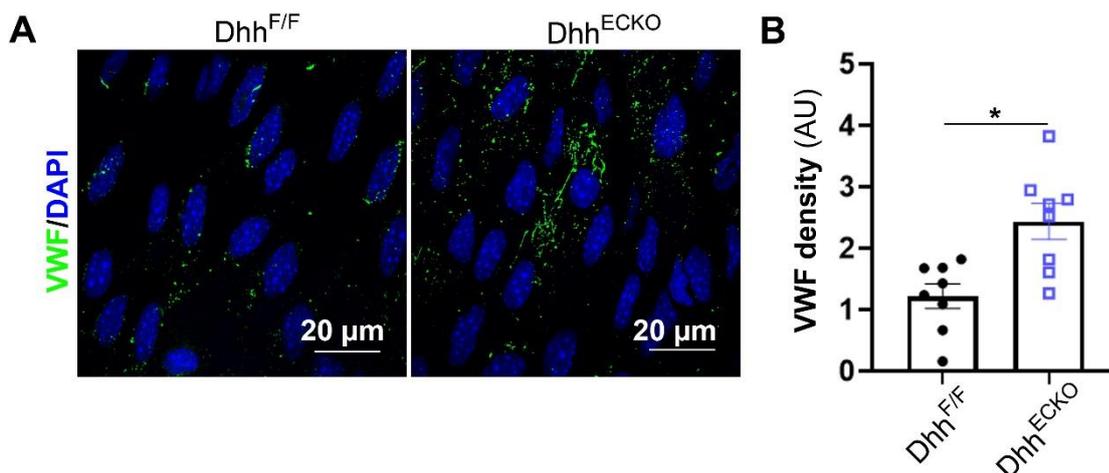


Figure 47. Les souris Dhh^{ECKO} et leurs contrôles ont été sacrifiées à un mois post-injection au tamoxifène. Les aortes en face ont été immunomarquées avec un anticorps anti-Facteur de Von Willebrand (A). La densité de vésicules de Facteur de Von Willebrand a été quantifiée (B) (n=8 souris par groupe. Analyses statistiques : Mann-Whitney. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; ns = non significatif

Par ailleurs, l'augmentation de l'expression de Tcap et l'augmentation de la fibrose pourrait contribuer à l'augmentation de la rigidité du myocarde.

4.2.1.4 Conclusion

Nos résultats démontrent qu'une dysfonction endothéliale peut induire une altération de la fonction diastolique cardiaque, confirmant le paradigme actuel et nos résultats obtenus chez les souris $Lepr^{db/db}$. Dans le modèle Dhh^{ECKO} , la maladie des microvaisseaux, principalement caractérisée par une perméabilité vasculaire augmentée et un phénotype pro-thrombotique (Figure 48), induit une dysfonction diastolique sans hypertrophie cardiaque. Nous avons par ailleurs démontré que les souris Dhh^{ECKO} présentent une augmentation de la fibrose interstitielle et de l'expression de Tcap, qui pourraient jouer dans l'altération de la relaxation passive du VG et donc sa rigidité.

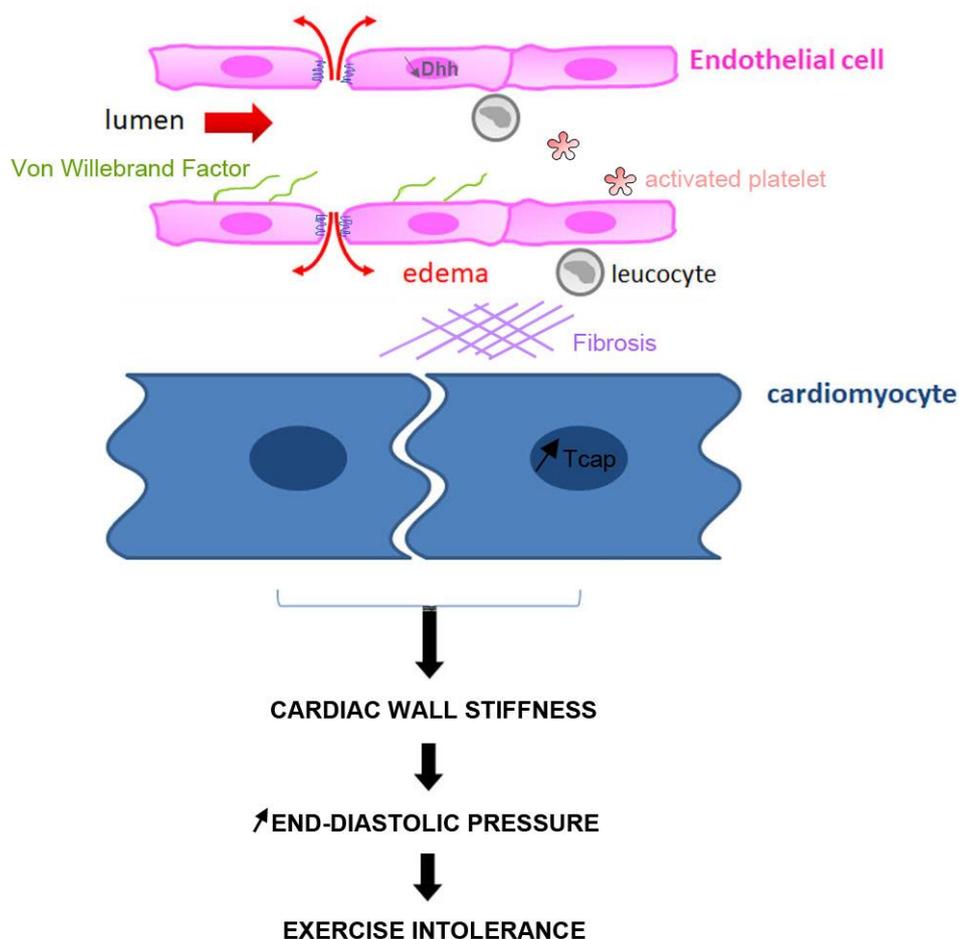


Figure 48. Schéma récapitulatif des résultats obtenus.

4.3 Les mécanismes impliqués dans le maintien de l'intégrité vasculaire dépendant de DHH

4.3.1 Rationnel et résultats obtenus

Comme cité précédemment (partie 1.4.2.3), la signalisation HH est essentielle au maintien de l'intégrité vasculaire et le ligand DHH joue un rôle crucial dans ce phénomène. Cependant, les mécanismes impliqués dans la régulation de l'intégrité des jonctions intercellulaires endothéliales et de la quiescence des cellules endothéliales par DHH restent encore inconnus. Une meilleure caractérisation de la signalisation et des médiateurs des effets de DHH dans la cellule endothéliale permettrait d'envisager des stratégies pour moduler cette voie. Dans ce dernier chapitre, nous avons voulu comprendre par quels mécanismes DHH agit sur la cellule endothéliale.

Plusieurs études suggèrent que la voie HH canonique n'est pas fonctionnelle dans les cellules endothéliales. Nous avons donc fait l'hypothèse que DHH agirait via l'activation d'une voie de signalisation non canonique et avons choisi de rechercher parmi les interactants possibles de PTCH1, ceux qui pourrait réguler la perméabilité et l'activation de l'endothélium. Dans la base de données, BioGrid, 205 interactants de la protéine PTCH1 humaine ont été identifiés. Parmi ces protéines candidates, nous avons choisi de tester le rôle de ADAM17. En effet, ADAM17 est connue pour son implication dans le clivage de différentes jonctions endothéliales et son rôle a notamment été étudié dans l'anévrisme de l'aorte ascendante (Shen Mengcheng et al., 2018).

4.3.1.1 ADAM17 est un partenaire du récepteur Ptch1 et Dhh favorise sa dégradation

Dans l'objectif de vérifier l'interaction entre le récepteur PTCH1 et ADAM17, nous avons effectué une co-immunoprécipitation. Dans ce but, des cellules HeLa ont été co-transfectées par des vecteurs d'expression de *PTCH1* et d'*ADAM17* et nous avons confirmé qu'*ADAM17* se lie bien à *PTCH1* (Figure 49 A).

Notre équipe a démontré que DHH induit une relocalisation peri-nucléaire de PTCH1 (Hollier et al.), c'est pourquoi nous avons tenté de déterminer si ADAM17 était également relocalisé en présence de DHH. Des cellules HeLa ont été co-transfectées par des vecteurs d'expression de *PTCH1* et d'*ADAM17*, en absence de *DHH*, ADAM17 et PTCH1 sont localisés dans le cytoplasme des cellules et ne sont pas colocalisés. L'expression de *DHH* dans les cellules induit une colocalisation peri-nucléaire d'ADAM17 et PTCH1 (Figure 49 B). Ce résultat confirme que l'interaction entre PTCH1 et ADAM17 est médiée par DHH.

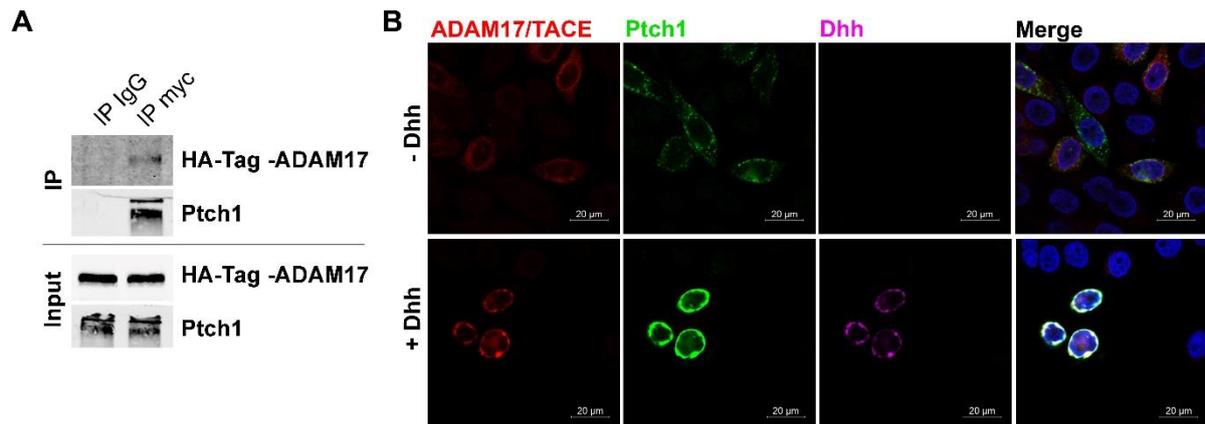


Figure 49. Des cellules HeLa ont été co-transfectées par des vecteurs d'expression de *PTCH1* et d'*ADAM17*. L'interaction entre PTCH1 et ADAM17 a été mesurée par une co-immunoprécipitation (A). La localisation cellulaire d'ADAM17, de PTCH1 et de DHH a été mesurée par immunomarquage (B).

D'après nos résultats, nous avons émis l'hypothèse que DHH régule l'intégrité vasculaire via la dégradation d'ADAM17. Nous avons étudié les niveaux d'expression d'*ADAM17* dans des HeLa co-transfectées par des vecteurs d'expression de *PTCH1*, d'*ADAM17* et *DHH*. Nous avons alors démontré une diminution de l'expression protéique d'ADAM17 en présence de DHH (Figure 50 A). Ce résultat a été confirmé dans des cellules endothéliales (Figure 50 B, C).

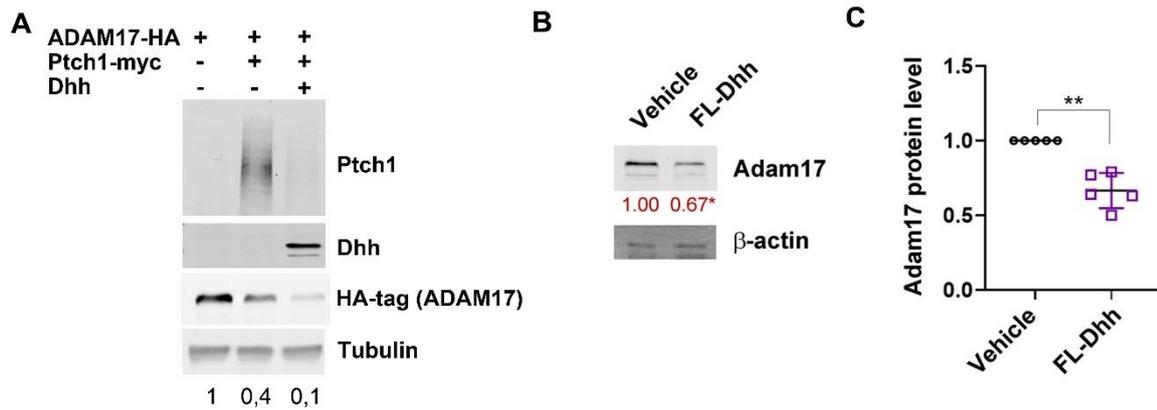


Figure 50. Des cellules HeLa ont été co-transfectées par des vecteurs d'expression d'ADAM17, de *PTCH1* et de *DHH*. Les quantités de protéines ont été analysées par Western-Blot (B). Des cellules HUVECs ont été traitées par du milieu conditionné FL-Dhh ou du vehicle. Les quantités de protéines ont été analysées par Western-Blot. Analyses statistiques : Mann-Whitney. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; ns = non significatif

4.3.1.2 *Dhh* régule le maintien de l'intégrité vasculaire via ADAM17

Nous avons ensuite testé si ADAM17 était impliqué dans la régulation de l'intégrité endothéliale dépendante de DHH. Nous avons notamment fait l'hypothèse que l'augmentation de la perméabilité endothéliale et l'altération des jonctions CDH5 observées en absence de *DHH* pourraient être dues à une augmentation de la quantité de protéine ADAM17. Pour tester cette hypothèse, des HUVECs ont été transfectées par un siRNA contrôle ou *DHH*, en présence ou non d'un siRNA ADAM17. Comme attendu, l'augmentation d'épaisseur des jonctions CDH5 en absence de *DHH* est inversée en absence d'ADAM17 (Figure 51 A-B) ainsi que la perméabilité endothéliale (Figure 51 C), suggérant que DHH maintient l'intégrité des jonctions CDH5 en régulant la quantité protéique d'ADAM17.

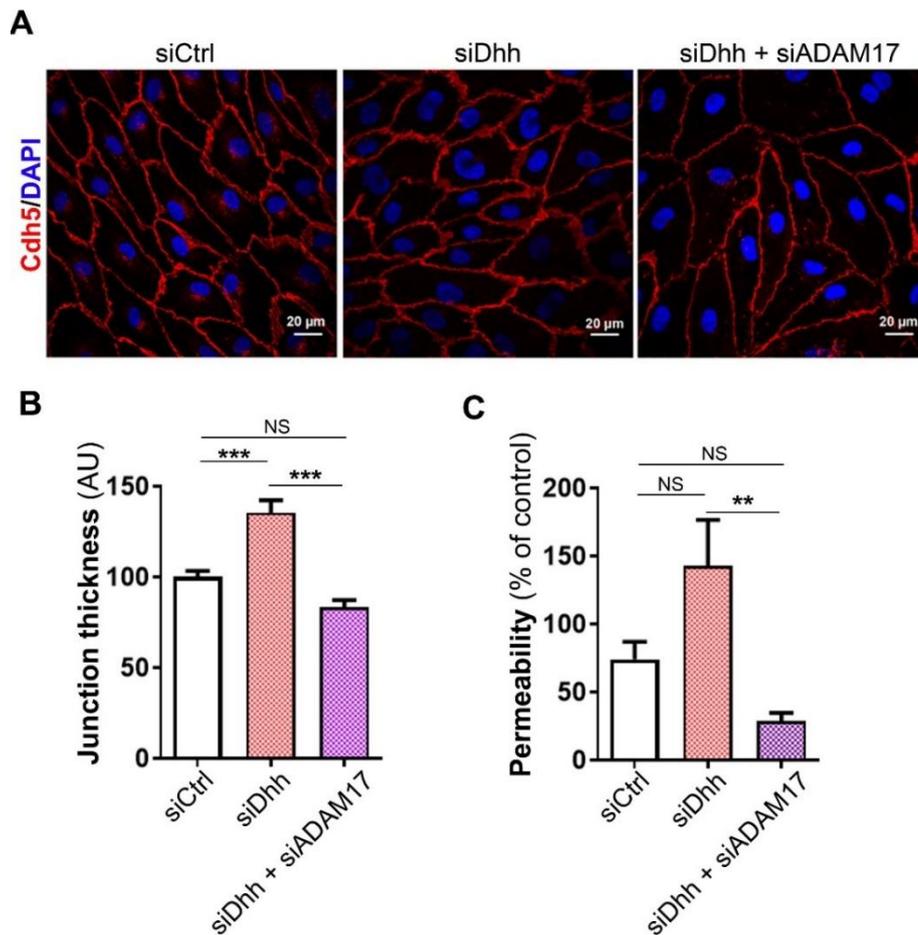


Figure 51. Des HUVECs ont été transfectées avec un siRNA véhicule, *DHH* ou *ADAM17*. La localisation de CDH5 a été évaluée par immunomarquage (en rouge) (A) et quantifiée telle que l'épaisseur moyenne de jonction sur le logiciel ImageJ (B) L'expérience a été répétée quatre fois. La perméabilité au FITC-dextran 70 kDa de monocouche de cellules endothéliales a été mesurée par Transwell. L'expérience a été répétée quatre fois, chaque expérience comprend des triplicatas. Analyses statistiques : One-way anova. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; ns = non significatif

4.3.1.3 Conclusion

Nos résultats ont permis d'éclaircir les mécanismes intracellulaires impliqués dans le maintien de l'intégrité vasculaire par DHH. Notamment nous avons mis en évidence *in vitro* que DHH semble assurer la fonction de barrière de l'endothélium en régulant la dégradation de la protéine ADAM17, connue pour cliver les jonctions endothéliales.

4.4 Perspectives

4.4.1 Mastocytes et ICFEp

Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement de l'ICFEp restent peu connus, pourtant le rôle de l'inflammation et de la dysfonction endothéliale, induites par les comorbidités associées, sont de nouvelles cibles d'étude expérimentale pour cette maladie. L'inflammation systémique présente chez les patients (Collier et al., 2011; Westermann et al., 2011) pourrait affecter l'endothélium et l'activer dans le développement de l'ICFEp, cependant les mécanismes impliqués restent à élucider.

Notre étude conforte l'hypothèse microvasculaire de l'ICFEp, en particulier dans le contexte du diabète de type 2 et de l'obésité. Notre modèle physiopathologique, c'est à dire les souris femelles $Lepr^{db/db}$ qui récapitule les marqueurs de l'ICFEp présents chez l'homme, nous a permis de mieux définir les caractéristiques de la dysfonction endothéliale présente au cours du développement de l'ICFEp.

De façon intéressante, nous avons démontré que l'activation des mastocytes est déterminante dans la mise en place de la dysfonction endothéliale dans ce modèle. Les mastocytes sont des cellules inflammatoires résidentes majoritairement étudiées dans l'allergie et la réponse aux IgE. Néanmoins, leur implication dans différentes maladies cardiovasculaires (Kritikou et al., 2016) et plus particulièrement dans le développement de la dysfonction diastolique (Wang et al., 2016b) a déjà été suggérée, et notre modèle confirme ce dernier rôle. De plus, nous avons pu établir qu'une augmentation des taux circulants d'IgE était associée à une augmentation de l'activation des mastocytes. Comme décrit dans l'introduction, la voie IgE/FcεR1 est la voie d'activation des mastocytes la plus fréquente dans les allergies. Cette voie pourrait aussi être le mécanisme sous-jacent à l'activation des mastocytes dans le cœur des souris $Lepr^{db/db}$.

De plus, si le cromoglycate de sodium intervient directement sur les mastocytes, nous avons mis en évidence que l'histamine libérée par les mastocytes était la molécule initiatrice de la perméabilité vasculaire accrue et du développement d'une dysfonction télédiastolique chez les souris $Lepr^{db/db}$ grâce à l'utilisation de la cétirizine, un anti-histaminique commun.

Des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer les mécanismes inter-cellulaires impliqués dans le cross-talk entre les mastocytes et les cellules endothéliales, et d'avoir une meilleure compréhension des cibles thérapeutiques envisageables.

Il reste toutefois à vérifier l'implication des mastocytes chez les patients atteint d'ICFEp. En effet, il serait alors intéressant de mesurer les taux d'IgE et de tryptase circulants chez les

patients. Une augmentation des taux d'IgE et de tryptase sérique chez les patients atteints d'ICFep conforterait notre hypothèse quant au rôle de l'activation des mastocytes dans la mise en place de la maladie des petits vaisseaux et de la dysfonction diastolique.

4.4.1 Dysfonction endothéliale et ICFep

Alors que la dysfonction endothéliale est proposée comme étant un acteur de premier plan dans le développement de l'ICFep, jusqu'à présent, peu d'études ont tenté de démontrer son rôle.

Il a été néanmoins rapporté dans différents modèles notamment d'hypertension qu'une diminution de l'activité de la NOSe pourrait être responsable des dysfonctions endothéliale et diastolique (Adams et al., 2015; Schmederer et al., 2018; Zhang et al., 2019). De plus, une publication récente a établi que des rats surexprimant le récepteur β_3 -adrénergique spécifiquement dans les cellules endothéliales présentent une dysfonction diastolique démontrant que la dysfonction endothéliale est suffisante pour induire une dysfonction diastolique. Dans ce modèle, la dysfonction endothéliale est caractérisée principalement par une altération de l'activité des NOS (Dhot et al.).

Notre étude confirme qu'une dysfonction endothéliale en absence d'autres facteurs de risque cardiovasculaires est suffisante pour affecter la fonction cardiaque. Cependant, notre modèle ne présente pas d'altération de la voie du \bullet NO (Figure 38). Cette dysfonction endothéliale est principalement caractérisée par une perméabilité vasculaire accrue due à une altération de l'intégrité des jonctions et un phénotype pro-thrombotique, mettant en évidence l'importance de ces paramètres dans le développement d'une dysfonction diastolique.

En effet, une perméabilité vasculaire accrue pourrait conduire au développement d'œdèmes cardiaques et ainsi augmenter la rigidité du myocarde (Miyamoto et al., 1998; Weng et al., 1992). La formation d'œdème dépend à la fois de la perméabilité des vaisseaux sanguins mais aussi de la fonctionnalité des vaisseaux lymphatiques (Brakenhielm et al., 2020). Il serait alors nécessaire d'évaluer la densité et la perméabilité du réseau lymphatique cardiaque et de confirmer la présence d'œdèmes grâce à la technique de microgravimétrie sur cœur total, chez des souris Dhh^{ECKO} et leurs contrôles.

Une altération de la fonction des plaquettes pourrait amener à la formation de thrombi et entraîner un défaut de perfusion chez les souris Dhh^{ECKO} . En effet, les patients ICFep présentent une altération de l'oxygénation du myocarde (van Empel et al., 2014) qui pourrait

être due à cette hypoperfusion. Pour confirmer cette hypothèse, il serait alors intéressant de mesurer la perfusion myocardique par IRM chez les souris Dhh^{ECKO} et leurs contrôles et/ou de quantifier les niveaux d'expression de la protéine HIF-1 α qui est associée à l'hypoxie.

D'autre part, dans le séquençage d'ARN, plusieurs gènes associés au cycle circadien dont *Per2* sont surexprimés chez les souris Dhh^{ECKO} . HIF-1 α pourrait être le lien connectant l'hypoxie avec le cycle circadien, notamment par sa régulation de *Per2* (Wu et al., 2017).

De façon intéressante, il a été montré que *Per2* régule le gène *Tcap* qui est également surexprimé dans le cœur des souris Dhh^{ECKO} (Figure 52). L'hypoxie, via *Per2*, pourrait donc être le lien entre la dysfonction endothéliale et la rigidité des cardiomyocytes. Il reste encore à déterminer si la surexpression de *Tcap* chez les souris Dhh^{ECKO} est en effet associée avec une augmentation de la rigidité des cardiomyocytes et ainsi des parois cardiaques.

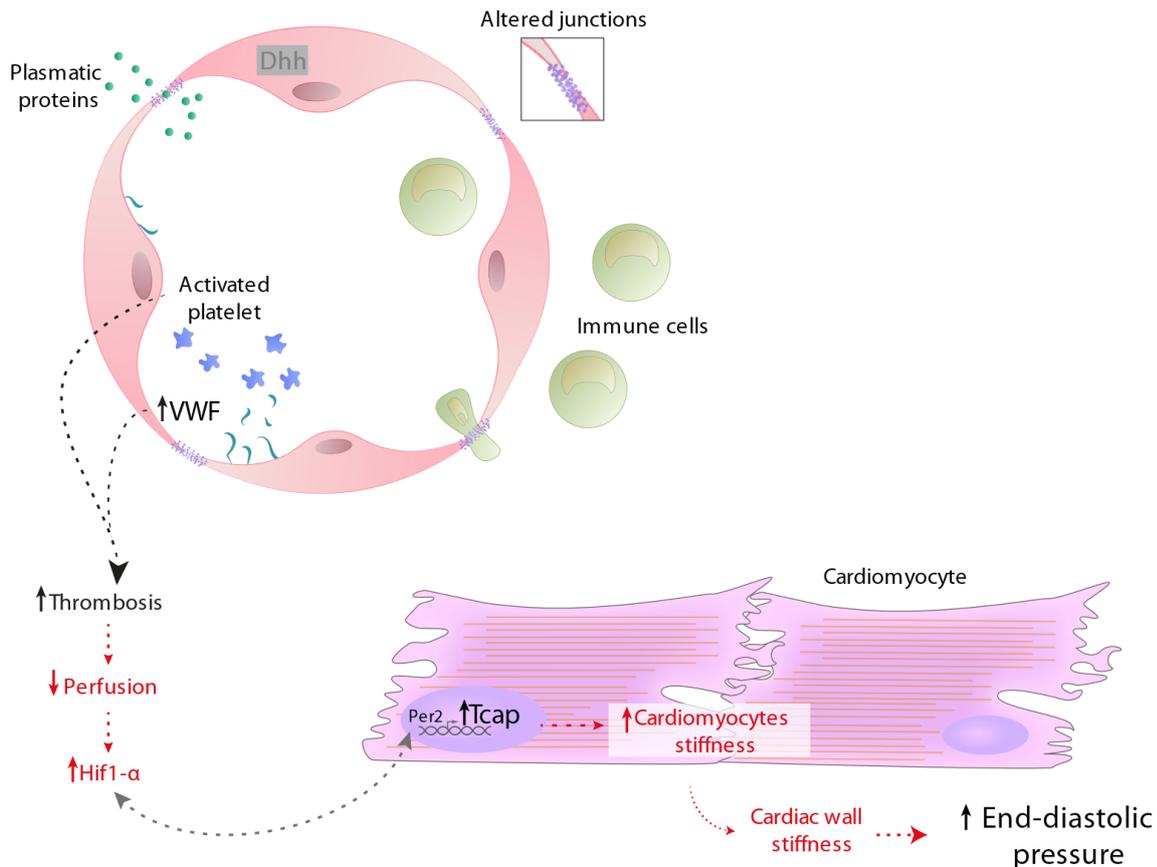


Figure 52. Schéma récapitulatif du projet Dysfonction endothéliale et ICfEp et de ses perspectives. En noir les résultats obtenus, en rouge les pistes poursuivies.

4.4.2 Hypertrophie cardiaque et ICfEp

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).

En accord avec cela, le traitement au cromoglycate de sodium chez les souris *Lepr^{db/db}* améliore la fonction endothéliale et diastolique sans diminuer l'hypertrophie cardiaque. Ce résultat tend à démontrer que l'hypertrophie cardiaque surviendrait en réponse aux comorbidités associées (Chirinos et al., 2019), mais ne serait pas directement impliquée

dans l'élévation des pressions télédiastoliques. Chez les souris Dhh^{ECKO} , l'élévation des pressions télédiastoliques n'est pas associée à une hypertrophie cardiaque (Figure 40), ce qui appuie les résultats trouvés chez les $Lepr^{db/db}$.

Ces deux résultats semblent alors démontrer que la dysfonction diastolique n'est pas reliée à la présence ou à la sévérité de l'hypertrophie.

4.4.3 Signalisation Hh et maintien cellulaire

Jusqu'à présent, les mécanismes cellulaires et moléculaires employés par la voie de signalisation HH au sein de la cellule endothéliale ne sont toujours pas complètement élucidés. Alors qu'une meilleure compréhension des processus moléculaires pourrait être bénéfiques et contribuer au développement de molécules ciblant la voie Hh afin de traiter des maladies où l'intégrité vasculaire est compromise, notamment les microangiopathies diabétiques et les maladies cérébrovasculaires, telle que la sclérose en plaque et l'encéphalopathie induite par le VIH.

Cependant, les mécanismes de la voie de signalisation Hh dans la cellule endothéliale restent incompris pour diverses raisons : (1) le manque d'anticorps fiables, spécifiques et assez sensibles pour détecter les différents acteurs de la signalisation, (2) le manque d'étude utilisant des souris délétées spécifiquement dans certains tissus. Aujourd'hui, des anticorps anti-SHH reconnaissent également IHH et DHH. C'est pourquoi des effets vasculaires induit par les ligands HH ont été principalement attribués à SHH, alors qu'il n'en est peut-être pas responsable (Alvarez et al., 2011; Hollier et al.).

De plus, la voie canonique n'est pas activée dans les cellules endothéliales et il n'existe pas à ce jour de marqueurs d'activité spécifique des voies non canoniques dans ces cellules. Les ligands HH sont proposés comme induisant des effets dépendants de SMO et d'autres indépendants de Smo (Chinchilla et al., 2010; Hollier et al., 2020).

Dans ce travail, nous avons choisi d'identifier les partenaires de PTCH1 et nos résultats montrent qu'ADAM17 pourrait être un médiateur de l'effet de DHH dans les cellules endothéliales. Cependant, ces résultats restent à être vérifiés *in vivo*, sachant que les mécanismes impliqués dans la dégradation d'ADAM17 par DHH ou encore les cibles d'ADAM17 dans nos modèles restent à être identifiés.

Finalement, il faudrait envisager de vérifier si cette nouvelle voie DHH/PTCH1/ADAM17 est dépendante ou indépendante de SMO, afin de déterminer de quelle manière elle pourrait être activée thérapeutiquement.

5. Bibliographie

Abe, Y., Oda-Sato, E., Tobiume, K., Kawauchi, K., Taya, Y., Okamoto, K., Oren, M., and Tanaka, N. (2008). Hedgehog signaling overrides p53-mediated tumor suppression by activating Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 4838–4843.

ABEL, E.D., LITWIN, S.E., and SWEENEY, G. (2008). Cardiac Remodeling in Obesity. *Physiol Rev* *88*, 389–419.

Adams, D.H., and Shaw, S. (1994). Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet* *343*, 831–836.

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.

Afsar, B., Afsar, R.E., Dagele, T., Kaya, E., Erus, S., Ortiz, A., Covic, A., and Kanbay, M. (2018). Capillary rarefaction from the kidney point of view. *Clin Kidney J* *11*, 295–301.

Agouni, A., Mostefai, H.A., Porro, C., Carusio, N., Favre, J., Richard, V., Henrion, D., Martínez, M.C., and Andriantsitohaina, R. (2007). Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release. *FASEB J.* *21*, 2735–2741.

Ahmed, R.P.H., Haider, K.H., Shujia, J., Afzal, M.R., and Ashraf, M. (2010). Sonic Hedgehog Gene Delivery to the Rodent Heart Promotes Angiogenesis via iNOS/Netrin-1/PKC Pathway. *PLoS One* *5*.

Ahmed, S.H., Clark, L.L., Pennington, W.R., Webb, C.S., Bonnema, D.D., Leonardi, A.H., McClure, C.D., Spinale, F.G., and Zile, M.R. (2006). Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases: relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease. *Circulation* *113*, 2089–2096.

Aird, W.C. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ. Res.* *100*, 158–173.

Alex, L., Russo, I., Holoborodko, V., and Frangogiannis, N.G. (2018a). 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.

Alex, L., Russo, I., Holoborodko, V., and Frangogiannis, N.G. (2018b). 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.

Alex, L., Russo, I., Holoborodko, V., and Frangogiannis, N.G. (2018c). 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.

- Alter, P., Watz, H., Kahnert, K., Pfeifer, M., Randerath, W.J., Andreas, S., Waschki, B., Kleibrink, B.E., Welte, T., Bals, R., et al. (2018). Airway obstruction and lung hyperinflation in COPD are linked to an impaired left ventricular diastolic filling. *Respiratory Medicine* *137*, 14–22.
- Alvarez, J.I., Dodelet-Devillers, A., Kebir, H., Ifergan, I., Fabre, P.J., Terouz, S., Sabbagh, M., Wosik, K., Bourbonnière, L., Bernard, M., et al. (2011). The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science* *334*, 1727–1731.
- Amour, A., Slocombe, P.M., Webster, A., Butler, M., Knight, C.G., Smith, B.J., Stephens, P.E., Shelley, C., Hutton, M., Knäuper, V., et al. (1998). TNF- α converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Letters* *435*, 39–44.
- An, G., Wang, H., Tang, R., Yago, T., McDaniel, J.M., McGee, S., Huo, Y., and Xia, L. (2008). P-selectin glycoprotein ligand-1 is highly expressed on Ly-6Chi monocytes and a major determinant for Ly-6Chi monocyte recruitment to sites of atherosclerosis in mice. *Circulation* *117*, 3227–3237.
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
- Armulik, A., Genové, G., and Betsholtz, C. (2011). Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Developmental Cell* *21*, 193–215.
- Armulik Annika, Abramsson Alexandra, and Betsholtz Christer (2005). Endothelial/Pericyte Interactions. *Circulation Research* *97*, 512–523.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. (1999). Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science* *284*, 770–776.
- Asai, J., Takenaka, H., Kusano, K.F., Ii, M., Luedemann, C., Curry, C., Eaton, E., Iwakura, A., Tsutsumi, Y., Hamada, H., et al. (2006). Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling. *Circulation* *113*, 2413–2424.
- Ather, S., Chan, W., Bozkurt, B., Aguilar, D., Ramasubbu, K., Zachariah, A.A., Wehrens, X.H., and Deswal, A. (2012). Impact of Non-Cardiac 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.
- Ayers, K.L., and Théron, P.P. (2010). Evaluating Smoothed as a G-protein-coupled receptor for Hedgehog signalling. *Trends Cell Biol.* *20*, 287–298.
- Azzi, S., Treps, L., Leclair, H.M., Ngo, H.-M., Harford-Wright, E., and Gavard, J. (2015). Desert Hedgehog/Patch2 Axis Contributes to Vascular Permeability and Angiogenesis in Glioblastoma. *Front Pharmacol* *6*, 281.
- Bai, C.B., Stephen, D., and Joyner, A.L. (2004). All Mouse Ventral Spinal Cord Patterning by Hedgehog Is Gli Dependent and Involves an Activator Function of Gli3. *Developmental Cell* *6*, 103–115.

- Bailey, J.M., Swanson, B.J., Hamada, T., Eggers, J.P., Singh, P.K., Caffery, T., Ouellette, M.M., and Hollingsworth, M.A. (2008). Sonic hedgehog promotes desmoplasia in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* *14*, 5995–6004.
- Baker, K.M., Booz, G.W., and Dostal, D.E. (1992). Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol* *54*, 227–241.
- Balakumar, P., Singh, A.P., Ganti, S.S., Krishan, P., Ramasamy, S., and Singh, M. (2008). Resident cardiac mast cells: are they the major culprit in the pathogenesis of cardiac hypertrophy? *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* *102*, 5–9.
- Baluk, P., Fuxe, J., Hashizume, H., Romano, T., Lashnits, E., Butz, S., Vestweber, D., Corada, M., Molendini, C., Dejana, E., et al. (2007). Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels. *J. Exp. Med.* *204*, 2349–2362.
- Barnes, E.A., Kong, M., Ollendorff, V., and Donoghue, D.J. (2001). Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. *EMBO J* *20*, 2214–2223.
- Bazzoni, G., and Dejana, E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol. Rev.* *84*, 869–901.
- Beaven, M.A. (2009). Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now. *European Journal of Immunology* *39*, 11–25.
- Belgacem, Y.H., and Borodinsky, L.N. (2011). Sonic hedgehog signaling is decoded by calcium spike activity in the developing spinal cord. *PNAS* *108*, 4482–4487.
- Benameur, T., Soleti, R., Porro, C., Andriantsitohaina, R., and Martínez, M.C. (2010). Microparticles carrying Sonic hedgehog favor neovascularization through the activation of nitric oxide pathway in mice. *PLoS One* *5*, e12688.
- Benditt, E.P., and Arase, M. (1959). AN ENZYME IN MAST CELLS WITH PROPERTIES LIKE CHYMOTRYPSIN. *J Exp Med* *110*, 451–460.
- Bentley, A.M., Jacobson, M.R., Cumberworth, V., Barkans, J.R., Moqbel, R., Schwartz, L.B., Irani, A.M., Kay, A.B., and Durham, S.R. (1992). Immunohistology of the nasal mucosa in seasonal allergic rhinitis: increases in activated eosinophils and epithelial mast cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* *89*, 877–883.
- Berman, D.M., Karhadkar, S.S., Hallahan, A.R., Pritchard, J.I., Eberhart, C.G., Watkins, D.N., Chen, J.K., Cooper, M.K., Taipale, J., Olson, J.M., et al. (2002). Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* *297*, 1559–1561.
- Berman, D.M., Karhadkar, S.S., Maitra, A., Montes De Oca, R., Gerstenblith, M.R., Briggs, K., Parker, A.R., Shimada, Y., Eshleman, J.R., Watkins, D.N., et al. (2003). Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* *425*, 846–851.
- Bhattacharya, K., Farwell, K., Huang, M., Kempuraj, D., Donelan, J., Papaliadis, D., Vasiadi, M., and Theoharides, T.C. (2007). Mast cell deficient W/W^v mice have lower serum IL-6 and less cardiac tissue necrosis than their normal littermates following myocardial ischemia-reperfusion. *Int J Immunopathol Pharmacol* *20*, 69–74.

- Bidet, M., Joubert, O., Lacombe, B., Ciantar, M., Nehmé, R., Mollat, P., Brétilon, L., Faure, H., Bittman, R., Ruat, M., et al. (2011). The Hedgehog Receptor Patched Is Involved in Cholesterol Transport. *PLoS One* 6.
- Bitgood, M.J., and McMahon, A.P. (1995). Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 172, 126–138.
- Bitgood, M.J., Shen, L., and McMahon, A.P. (1996). Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol* 6, 298–304.
- Black, R.A. (2002). Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 1–5.
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., et al. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385, 729–733.
- Boesiger, J., Tsai, M., Maurer, M., Yamaguchi, M., Brown, L.F., Claffey, K.P., Dvorak, H.F., and Galli, S.J. (1998). Mast Cells Can Secrete Vascular Permeability Factor/ Vascular Endothelial Cell Growth Factor and Exhibit Enhanced Release after Immunoglobulin E-dependent Upregulation of Fcε Receptor I Expression. *J Exp Med* 188, 1135–1145.
- Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120.
- Borbély, A., Falcao-Pires, I., van Heerebeek, L., Hamdani, N., Edes, I., Gavina, C., Leite-Moreira, A.F., Bronzwaer, J.G.F., Papp, Z., van der Velden, J., et al. (2009). Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. *Circ. Res.* 104, 780–786.
- Borlaug, B.A., and Kass, D.A. (2011). Invasive Hemodynamic Assessment in Heart Failure. *Cardiology Clinics* 29, 269–280.
- Bradding, P., and Arthur, G. (2016). Mast cells in asthma--state of the art. *Clin. Exp. Allergy* 46, 194–263.
- Bradding, P., Okayama, Y., Howarth, P.H., Church, M.K., and Holgate, S.T. (1995). Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *The Journal of Immunology* 155, 297–307.
- Brakenhielm, E., González, A., and Díez, J. (2020). Role of Cardiac Lymphatics in Myocardial Edema and Fibrosis: JACC Review Topic of the Week. *Journal of the American College of Cardiology* 76, 735–744.
- Buglino, J.A., and Resh, M.D. (2010). Identification of Conserved Regions and Residues within Hedgehog Acyltransferase Critical for Palmitoylation of Sonic Hedgehog. *PLOS ONE* 5, e11195.
- Bugno, M., Witek, B., Bereta, J., Bereta, M., Edwards, D.R., and Kordula, T. (1999). Reprogramming of TIMP-1 and TIMP-3 expression profiles in brain microvascular endothelial cells and astrocytes in response to proinflammatory cytokines. *FEBS Letters* 448, 9–14.

- Buonamici, S., Williams, J., Morrissey, M., Wang, A., Guo, R., Vattay, A., Hsiao, K., Yuan, J., Green, J., Ospina, B., et al. (2010). Interfering with resistance to smoothed antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. *Sci Transl Med* 2, 51ra70.
- Burke, M.A., Katz, D.H., Beussink, L., Selvaraj, S., Gupta, D.K., Fox, J., Chakrabarti, S., Sauer, A.J., Rich, J.D., Freed, B.H., et al. (2014). Prognostic importance of pathophysiologic markers in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *Circ Heart Fail* 7, 288–299.
- Burlew, B.S., and Weber, K.T. (2002). Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction. *Herz* 27, 92–98.
- Butterfield, J.H., Weiler, D., Peterson, E.A., Gleich, G.J., and Leiferman, K.M. (1990). Sequestration of eosinophil major basic protein in human mast cells. *Lab. Invest.* 62, 77–86.
- Buttitta, L., Mo, R., Hui, C.-C., and Fan, C.-M. (2003). Interplays of Gli2 and Gli3 and their requirement in mediating Shh-dependent sclerotome induction. *Development* 130, 6233–6243.
- Byrd, N., Becker, S., Maye, P., Narasimhaiah, R., St-Jacques, B., Zhang, X., McMahon, J., McMahon, A., and Gabel, L. (2002). Hedgehog is required for murine yolk sac angiogenesis. *Development* 129, 361–372.
- Bzowska, M., Jura, N., Lassak, A., Black, R.A., and Bereta, J. (2004). Tumour necrosis factor-alpha stimulates expression of TNF-alpha converting enzyme in endothelial cells. *Eur. J. Biochem.* 271, 2808–2820.
- Calderone, A., Thaik, C.M., Takahashi, N., Chang, D.L., and Colucci, W.S. (1998). Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J Clin Invest* 101, 812–818.
- 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.
- Canault, M., Tellier, E., Bonardo, B., Mas, E., Aumailley, M., Juhan-Vague, I., Nalbone, G., and Peiretti, F. (2006a). FHL2 interacts with both ADAM-17 and the cytoskeleton and regulates ADAM-17 localization and activity. *J. Cell. Physiol.* 208, 363–372.
- Canault, M., Peiretti, F., Kopp, F., Bonardo, B., Bonzi, M.-F., Coudeyre, J.-C., Alessi, M.-C., Juhan-Vague, I., and Nalbone, G. (2006b). The TNF alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) is expressed in the atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice: possible contribution to elevated plasma levels of soluble TNF alpha receptors. *Atherosclerosis* 187, 82–91.
- Cao, X., Geradts, J., Dewhirst, M.W., and Lo, H.-W. (2012). Upregulation of VEGF-A and CD24 gene expression by the tGLI1 transcription factor contributes to the aggressive behavior of breast cancer cells. *Oncogene* 31, 104–115.
- Capone, C., Dabertrand, F., Baron-Menguy, C., Chalaris, A., Ghezali, L., Domenga-Denier, V., Schmidt, S., Huneau, C., Rose-John, S., Nelson, M.T., et al. (2016). Mechanistic insights

into a TIMP3-sensitive pathway constitutively engaged in the regulation of cerebral hemodynamics. *Elife* 5.

Caradu, C., Couffinhal, T., Chapouly, C., Guimbal, S., Hollier, P.-L., Ducasse, E., Bura-Rivière, A., Dubois, M., Gadeau, A.-P., and Renault, M.-A. (2018a). Restoring Endothelial Function by Targeting Desert Hedgehog Downstream of Klf2 Improves Critical Limb Ischemia in Adults. *Circ. Res.* 123, 1053–1065.

Caradu, C., Guy, A., James, C., Reynaud, A., Gadeau, A.-P., and Renault, M.-A. (2018b). Endogenous Sonic Hedgehog limits inflammation and angiogenesis in the ischaemic skeletal muscle of mice. *Cardiovasc. Res.* 114, 759–770.

Carpenter, D., Stone, D.M., Brush, J., Ryan, A., Armanini, M., Frantz, G., Rosenthal, A., and Sauvage, F.J. de (1998). Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *PNAS* 95, 13630–13634.

Cerretti, D.P., Poindexter, K., Castner, B.J., Means, G., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Black, R.A., and Nelson, N. (1999). Characterization of the cDNA and gene for mouse tumour necrosis factor alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) and its location to mouse chromosome 12 and human chromosome 2p25. *Cytokine* 11, 541–551.

Chapouly, C., Yao, Q., Vandierdonck, S., Larrieu-Lahargue, F., Mariani, J.N., Gadeau, A.-P., and Renault, M.-A. (2016). Impaired Hedgehog signalling-induced endothelial dysfunction is sufficient to induce neuropathy: implication in diabetes. *Cardiovasc. Res.* 109, 217–227.

Charbonneau, M., Harper, K., Grondin, F., Pelmus, M., McDonald, P.P., and Dubois, C.M. (2007). Hypoxia-inducible factor mediates hypoxic and tumor necrosis factor alpha-induced increases in tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17 expression by synovial cells. *J. Biol. Chem.* 282, 33714–33724.

Chechneva, O.V., Mayrhofer, F., Daugherty, D.J., Krishnamurthy, R.G., Bannerman, P., Pleasure, D.E., and Deng, W. (2014). A Smoothened receptor agonist is neuroprotective and promotes regeneration after ischemic brain injury. *Cell Death Dis* 5, e1481.

Chen, H.-J., Wang, C.-M., Wang, T.-W., Liaw, G.-J., Hsu, T.-H., Lin, T.-H., and Yu, J.-Y. (2011a). The Hippo pathway controls polar cell fate through Notch signaling during *Drosophila* oogenesis. *Developmental Biology* 357, 370–379.

Chen, J.K., Taipale, J., Cooper, M.K., and Beachy, P.A. (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev.* 16, 2743–2748.

Chen, S.-C., Huang, M., He, Q.-W., Zhang, Y., Opoku, E.N., Yang, H., Jin, H.-J., Xia, Y.-P., and Hu, B. (2017). Administration of sonic hedgehog protein induces angiogenesis and has therapeutic effects after stroke in rats. *Neuroscience* 352, 285–295.

Chen, W., Tang, T., Eastham-Anderson, J., Dunlap, D., Alicke, B., Nannini, M., Gould, S., Yauch, R., Modrusan, Z., DuPree, K.J., et al. (2011b). Canonical hedgehog signaling augments tumor angiogenesis by induction of VEGF-A in stromal perivascular cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 9589–9594.

- Chinchilla, P., Xiao, L., Kazanietz, M.G., and Riobo, N.A. (2010). Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways. *Cell Cycle* 9, 570–579.
- Chirinos, J.A., Bhattacharya, P., Kumar, A., Proto, E., Konda, P., Segers, P., Akers, S.R., Townsend, R.R., and Zamani, P. (2019). Impact of Diabetes Mellitus on Ventricular Structure, Arterial Stiffness, and Pulsatile Hemodynamics in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Heart Assoc* 8, e011457.
- Chowdhury, M.A., Moukarbel, G.V., Gupta, R., Frank, S.M., Anderson, A.M., Liu, L.C., and Khouri, S.J. (2019). Endothelin 1 Is Associated with Heart Failure Hospitalization and Long-Term Mortality in Patients with Heart Failure with Preserved Ejection Fraction and Pulmonary Hypertension. *CRD* 143, 124–133.
- Chuang, P.T., and McMahon, A.P. (1999). Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* 397, 617–621.
- Ciuffetti, G., Schillaci, G., Innocente, S., Lombardini, R., Pasqualini, L., Notaristefano, S., and Mannarino, E. (2003). Capillary rarefaction and abnormal cardiovascular reactivity in hypertension. *Journal of Hypertension* 21, 2297–2303.
- Cohn, J.N. (1995). Plasma norepinephrine and mortality. *Clin Cardiol* 18, 19-12.
- 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.
- Collins, R.G., Velji, R., Guevara, N.V., Hicks, M.J., Chan, L., and Beaudet, A.L. (2000). P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med* 191, 189–194.
- Combs, J.W. (1966). Maturation of rat mast cells. An electron microscope study. *J. Cell Biol.* 31, 563–575.
- Corada, M., Mariotti, M., Thurston, G., Smith, K., Kunkel, R., Brockhaus, M., Lampugnani, M.G., Martin-Padura, I., Stoppacciaro, A., Ruco, L., et al. (1999). Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 9815–9820.
- Cui, D., Chen, X., Yin, J., Wang, W., Lou, M., and Gu, S. (2012). Aberrant activation of Hedgehog/Gli1 pathway on angiogenesis in gliomas. *Neurol India* 60, 589–596.
- Cuijpers, I., Simmonds, S.J., van Bilsen, M., Czarnowska, E., González Miqueo, A., Heymans, S., Kuhn, A.R., Mulder, P., Ratajska, A., Jones, E.A.V., et al. (2020). Microvascular and lymphatic dysfunction in HFpEF and its associated comorbidities. *Basic Res Cardiol* 115, 39.
- Dahlin, J.S., Ekoff, M., Grootens, J., Löf, L., Amini, R.-M., Hagberg, H., Ungerstedt, J.S., Olsson-Strömberg, U., and Nilsson, G. (2017). KIT signaling is dispensable for human mast cell progenitor development. *Blood* 130, 1785–1794.

D'Amario, D., Migliaro, S., Borovac, J.A., Restivo, A., Vergallo, R., Galli, M., Leone, A.M., Montone, R.A., Niccoli, G., Aspromonte, N., et al. (2019). Microvascular Dysfunction in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Front Physiol* *10*, 1347.

De Keulenaer, G.W., and Brutsaert, D.L. (2011). Systolic and diastolic heart failure are overlapping phenotypes within the heart failure spectrum. *Circulation* *123*, 1996–2004; discussion 2005.

DeBerge, M.P., Ely, K.H., Wright, P.F., Thorp, E.B., and Enelow, R.I. (2015). Shedding of TNF receptor 2 by effector CD8⁺ T cells by ADAM17 is important for regulating TNF- α availability during influenza infection. *J Leukoc Biol* *98*, 423–434.

Dei Cas, A., Khan, S.S., Butler, J., Mentz, R.J., Bonow, R.O., Avogaro, A., Tschoepe, D., Doehner, W., Greene, S.J., Senni, M., et al. (2015). Impact of Diabetes on Epidemiology, Treatment, and Outcomes of Patients With Heart Failure. *JACC: Heart Failure* *3*, 136–145.

Del Sal, G., Ruaro, M.E., Philipson, L., and Schneider, C. (1992). The growth arrest-specific gene, *gas1*, is involved in growth suppression. *Cell* *70*, 595–607.

Dhot, J., Ferron, M., Prat, V., Persello, A., Roul, D., Stévant, D., Guijarro, D., Piriou, N., Aillerie, V., Erraud, A., et al. Overexpression of endothelial β 3-adrenergic receptor induces diastolic dysfunction in rats. *ESC Heart Failure* *n/a*.

Dierks, C., Grbic, J., Zirlik, K., Beigi, R., Englund, N.P., Guo, G.-R., Veelken, H., Engelhardt, M., Mertelsmann, R., Kelleher, J.F., et al. (2007). Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nat. Med.* *13*, 944–951.

Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* *29*, 15–21.

5. Dolgin M, Committee NYHAC. Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels [Internet]. 9th ed. / editor, Martin Dolgin. Boston : Little, Brown; 1994

Dong, Z.M., Chapman, S.M., Brown, A.A., Frenette, P.S., Hynes, R.O., and Wagner, D.D. (1998). The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest* *102*, 145–152.

Düsterhöft, S., Höbel, K., Oldefest, M., Lokau, J., Waetzig, G.H., Chalaris, A., Garbers, C., Scheller, J., Rose-John, S., Lorenzen, I., et al. (2014). A disintegrin and metalloprotease 17 dynamic interaction sequence, the sweet tooth for the human interleukin 6 receptor. *J. Biol. Chem.* *289*, 16336–16348.

Düsterhöft, S., Michalek, M., Kordowski, F., Oldefest, M., Sommer, A., Röseler, J., Reiss, K., Grötzinger, J., and Lorenzen, I. (2015). Extracellular Juxtamembrane Segment of ADAM17 Interacts with Membranes and Is Essential for Its Shedding Activity. *Biochemistry* *54*, 5791–5801.

Dyer, M.A., Farrington, S.M., Mohn, D., Munday, J.R., and Baron, M.H. (2001). Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo. *Development* *128*, 1717–1730.

Echouffo-Tcheugui, J.B., Xu, H., DeVore, A.D., Schulte, P.J., Butler, J., Yancy, C.W., Bhatt, D.L., Hernandez, A.F., Heidenreich, P.A., and Fonarow, G.C. (2016). Temporal trends and factors associated with diabetes mellitus among patients hospitalized with heart failure: Findings from Get With The Guidelines–Heart Failure registry. *American Heart Journal* 182, 9–20.

Edwards, D.R., Leco, K.J., Beaudry, P.P., Atadja, P.W., Veillette, C., and Riabowol, K.T. (1996). Differential effects of transforming growth factor-beta 1 on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in young and old human fibroblasts. *Exp. Gerontol.* 31, 207–223.

Elieh Ali Komi, D., Wöhrle, S., and Bielory, L. (2019). Mast Cell Biology at Molecular Level: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol.*

Elishmereni, M., Alenius, H.T., Bradding, P., Mizrahi, S., Shikotra, A., Minai-Fleminger, Y., Mankuta, D., Eliashar, R., Zabucchi, G., and Levi-Schaffer, F. (2011). Physical interactions between mast cells and eosinophils: a novel mechanism enhancing eosinophil survival in vitro. *Allergy* 66, 376–385.

van Empel, V.P.M., Mariani, J., Borlaug, B.A., and Kaye, D.M. (2014). Impaired myocardial oxygen availability contributes to abnormal exercise hemodynamics in heart failure with preserved ejection fraction. *J Am Heart Assoc* 3, e001293.

Enerbäck, L. (1966a). Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I. Effects of fixation. *Acta Pathol Microbiol Scand* 66, 289–302.

Enerbäck, L. (1966b). Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 2. Dye-binding and metachromatic properties. *Acta Pathol Microbiol Scand* 66, 303–312.

Faber James E., Zhang Hua, Lassance-Soares Roberta M., Prabhakar Pranay, Najafi Amir H., Burnett Mary Susan, and Epstein Stephen E. (2011). Aging Causes Collateral Rarefaction and Increased Severity of Ischemic Injury in Multiple Tissues. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31, 1748–1756.

Falati, S., Liu, Q., Gross, P., Merrill-Skoloff, G., Chou, J., Vandendries, E., Celi, A., Croce, K., Furie, B.C., and Furie, B. (2003). Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med* 197, 1585–1598.

Fan, L., Pepicelli, C.V., Dibble, C.C., Catbagan, W., Zarycki, J.L., Laciak, R., Gipp, J., Shaw, A., Lamm, M.L.G., Munoz, A., et al. (2004). Hedgehog signaling promotes prostate xenograft tumor growth. *Endocrinology* 145, 3961–3970.

Farasat, S.M., Bolger, D.T., Shetty, V., Menachery, E.P., Gerstenblith, G., Kasper, E.K., and Najjar, S.S. (2010). Effect of Beta-Blocker Therapy on Rehospitalization Rates in Women Versus Men With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. *American Journal of Cardiology* 105, 229–234.

Federici, M., Hribal, M.L., Menghini, R., Kanno, H., Marchetti, V., Porzio, O., Sunnarborg, S.W., Rizza, S., Serino, M., Cunsolo, V., et al. (2005). Timp3 deficiency in insulin receptor–haploinsufficient mice promotes diabetes and vascular inflammation via increased TNF- α . *J Clin Invest* 115, 3494–3505.

- 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. (2016a). Myocardial Microvascular Inflammatory Endothelial Activation in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *JACC: Heart Failure* 4, 312–324.
- Franssen, C., Chen, S., Unger, A., Korkmaz, H.I., De Keulenaer, G.W., Tschöpe, C., Leite-Moreira, A.F., Musters, R., Niessen, H.W., Linke, W.A., et al. (2016b). Myocardial Microvascular Inflammatory Endothelial Activation in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Jacc* 4, 312–324.
- Friend, D.S., Ghildyal, N., Austen, K.F., Gurish, M.F., Matsumoto, R., and Stevens, R.L. (1996). Mast cells that reside at different locations in the jejunum of mice infected with *Trichinella spiralis* exhibit sequential changes in their granule ultrastructure and chymase phenotype. *J. Cell Biol.* 135, 279–290.
- Fujita, A., and Kurachi, Y. (2000). SAP family proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 1–6.
- Fukuta, H., and Little, W.C. (2007). Contribution of systolic and diastolic abnormalities to heart failure with a normal and a reduced ejection fraction. *Prog Cardiovasc Dis* 49, 229–240.
- 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.
- Furuichi, K., Rivera, J., and Isersky, C. (1985). The receptor for immunoglobulin E on rat basophilic leukemia cells: effect of ligand binding on receptor expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 1522–1525.
- Gaengel Konstantin, Genové Guillem, Armulik Annika, and Betsholtz Christer (2009). Endothelial-Mural Cell Signaling in Vascular Development and Angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29, 630–638.
- Galli, S.J., Kalesnikoff, J., Grimaldeston, M.A., Piliponsky, A.M., Williams, C.M.M., and Tsai, M. (2005). Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 23, 749–786.
- Garcia-Faroldi, G., Melo, F.R., Rönnberg, E., Grujic, M., and Pejler, G. (2013). Active Caspase-3 Is Stored within Secretory Compartments of Viable Mast Cells. *The Journal of Immunology* 191, 1445–1452.
- Garton, K.J., Gough, P.J., Blobel, C.P., Murphy, G., Greaves, D.R., Dempsey, P.J., and Raines, E.W. (2001). Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J. Biol. Chem.* 276, 37993–38001.
- Garton, K.J., Gough, P.J., Philalay, J., Wille, P.T., Blobel, C.P., Whitehead, R.H., Dempsey, P.J., and Raines, E.W. (2003). Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17). *J. Biol. Chem.* 278, 37459–37464.
- Geng, L., Cuneo, K.C., Cooper, M.K., Wang, H., Sekhar, K., Fu, A., and Hallahan, D.E. (2007). Hedgehog signaling in the murine melanoma microenvironment. *Angiogenesis* 10, 259–267.

Gerdes, A.M., and Capasso, J.M. (1995). Structural remodeling and mechanical dysfunction of cardiac myocytes in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 27, 849–856.

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. *Circulation: Heart Failure* 10, e003806.

González, A., López, B., Querejeta, R., Zubillaga, E., Echeverría, T., and Díez, J. (2010). Filling pressures and collagen metabolism in hypertensive patients with heart failure and normal ejection fraction. *Hypertension* 55, 1418–1424.

Gonzalez-Quesada Carlos, Cavalera Michele, Biernacka Anna, Kong Ping, Lee Dong-Wook, Saxena Amit, Frunza Olga, Dobaczewski Marcin, Shinde Arti, and Frangogiannis Nikolaos G. (2013). Thrombospondin-1 Induction in the Diabetic Myocardium Stabilizes the Cardiac Matrix in Addition to Promoting Vascular Rarefaction Through Angiopoietin-2 Upregulation. *Circulation Research* 113, 1331–1344.

Gordon, J.R., and Galli, S.J. (1990). Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- α /cachectin. *Nature* 346, 274–276.

Gregorio, C.C., Trombitás, K., Centner, T., Kolmerer, B., Stier, G., Kunke, K., Suzuki, K., Obermayr, F., Herrmann, B., Granzier, H., et al. (1998). The NH2 terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity. *J Cell Biol* 143, 1013–1027.

Grützner, A., Garcia-Manyes, S., Kötter, S., Badilla, C.L., Fernandez, J.M., and Linke, W.A. (2009). Modulation of Titin-Based Stiffness by Disulfide Bonding in the Cardiac Titin N2-B Unique Sequence. *Biophys J* 97, 825–834.

Gupta, R., Mackie, A.R., Misener, S., Liu, L., Losordo, D.W., and Kishore, R. (2018). Endothelial smoothed-dependent hedgehog signaling is not required for sonic hedgehog induced angiogenesis or ischemic tissue repair. *Lab. Invest.* 98, 682–691.

Gurish, M.F., Pear, W.S., Stevens, R.L., Scott, M.L., Sokol, K., Ghildyal, N., Webster, M.J., Hu, X., Austen, K.F., and Baltimore, D. (1995). Tissue-regulated differentiation and maturation of a v-abl-immortalized mast cell-committed progenitor. *Immunity* 3, 175–186.

Hahn, H., Wicking, C., Zaphiropoulous, P.G., Gailani, M.R., Shanley, S., Chidambaram, A., Vorechovsky, I., Holmberg, E., Uden, A.B., Gillies, S., et al. (1996). Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 85, 841–851.

Hakim, C.H., Jackson, W.F., and Segal, S.S. (2008). Connexin isoform expression in smooth muscle cells and endothelial cells of hamster cheek pouch arterioles and retractor feed arteries. *Microcirculation* 15, 503–514.

Hall, K.C., and Blobel, C.P. (2012). Interleukin-1 Stimulates ADAM17 through a Mechanism Independent of its Cytoplasmic Domain or Phosphorylation at Threonine 735. *PLOS ONE* 7, e31600.

- Hallikas, O., Palin, K., Sinjushina, N., Rautiainen, R., Partanen, J., Ukkonen, E., and Taipale, J. (2006). Genome-wide prediction of mammalian enhancers based on analysis of transcription-factor binding affinity. *Cell* *124*, 47–59.
- Hamdani, N., Franssen, C., Lourenço, A., Falcão-Pires, I., Fontoura, D., Leite, S., Plettig, L., López, B., Ottenheijm, C.A., Becher, P.M., et al. (2013). Myocardial titin hypophosphorylation importantly contributes to heart failure with preserved ejection fraction in a rat metabolic risk model. *Circ Heart Fail* *6*, 1239–1249.
- Hammel, I., Lagunoff, D., and Galli, S.J. (2010). Regulation of secretory granule size by the precise generation and fusion of unit granules. *J. Cell. Mol. Med.* *14*, 1904–1916.
- Hammond, K.L., and Whitfield, T.T. (2009). Expression of zebrafish *hip*: response to Hedgehog signalling, comparison with *ptc1* expression, and possible role in otic patterning. *Gene Expr. Patterns* *9*, 391–396.
- Hanif, W., Alex, L., Su, Y., Shinde, A.V., Russo, I., Li, N., and Frangogiannis, N.G. (2017). Left atrial remodeling, hypertrophy, and fibrosis in mouse models of heart failure. *Cardiovasc Pathol* *30*, 27–37.
- He, Q.-W., Xia, Y.-P., Chen, S.-C., Wang, Y., Huang, M., Huang, Y., Li, J.-Y., Li, Y.-N., Gao, Y., Mao, L., et al. (2013). Astrocyte-derived sonic hedgehog contributes to angiogenesis in brain microvascular endothelial cells via RhoA/ROCK pathway after oxygen-glucose deprivation. *Mol. Neurobiol.* *47*, 976–987.
- 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.
- Hermans, M., Lennep, J.R. van, van Daele, P., and Bot, I. (2019). Mast Cells in Cardiovascular Disease: From Bench to Bedside. *Int J Mol Sci* *20*.
- Hirohata, S., Seldin, M.F., and Apte, S.S. (1998). Chromosomal assignment of two ADAM genes, TACE (ADAM17) and MLTNB (ADAM19), to human chromosomes 2 and 5, respectively, and of *Mltnb* to mouse chromosome 11. *Genomics* *54*, 178–179.
- Hoh, J.H., Sosinsky, G.E., Revel, J.P., and Hansma, P.K. (1993). Structure of the extracellular surface of the gap junction by atomic force microscopy. *Biophys. J.* *65*, 149–163.
- Hollier, P.-L., Guimbal, S., Mora, P., Diop, A., Cornuault, L., Couffinhal, T., Gadeau, A.-P., Renault, M.-A., and Chapouly, C. (2020). Genetic disruption of the Blood Brain Barrier leads to protective barrier formation at the Glia Limitans. *BioRxiv* 2020.03.13.990762.
- 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.
- Hsieh, F.H., Sharma, P., Gibbons, A., Goggans, T., Erzurum, S.C., and Haque, S.J. (2005). Human airway epithelial cell determinants of survival and functional phenotype for primary human mast cells. *PNAS* *102*, 14380–14385.

- Huang, P., Nedelcu, D., Watanabe, M., Jao, C., Kim, Y., Liu, J., and Salic, A. (2016). Cellular cholesterol directly activates Smoothed in Hedgehog signaling. *Cell* *166*, 1176–1187.e14.
- Huang, Z.G., Jin, Q., Fan, M., Cong, X.L., Han, S.F., Gao, H., and Shan, Y. (2013). Myocardial remodeling in diabetic cardiomyopathy associated with cardiac mast cell activation. *PLoS ONE* *8*, e60827.
- Huangfu, D., and Anderson, K.V. (2006). Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates. *Development* *133*, 3–14.
- Hulsmans, M., Sager, H.B., Roh, J.D., Valero-Muñoz, M., Houstis, N.E., Iwamoto, Y., Sun, Y., Wilson, R.M., Wojtkiewicz, G., Tricot, B., et al. (2018). Cardiac macrophages promote diastolic dysfunction. *J Exp Med* *215*, 423–440.
- Hundley, T.R., Gilfillan, A.M., Tkaczyk, C., Andrade, M.V., Metcalfe, D.D., and Beaven, M.A. (2004). Kit and FcεRI mediate unique and convergent signals for release of inflammatory mediators from human mast cells. *Blood* *104*, 2410–2417.
- Incardona, J.P., Gaffield, W., Kapur, R.P., and Roelink, H. (1998). The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development* *125*, 3553–3562.
- Indhirajanti, S., van Daele, P.L.A., Bos, S., Mulder, M.T., Bot, I., and Roeters van Lennep, J.E. (2018). Systemic mastocytosis associates with cardiovascular events despite lower plasma lipid levels. *Atherosclerosis* *268*, 152–156.
- Irani, A.A., Schechter, N.M., Craig, S.S., DeBlois, G., and Schwartz, L.B. (1986). Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *83*, 4464–4468.
- Ishizuka, T., Chayama, K., Takeda, K., Hamelmann, E., Terada, N., Keller, G.M., Johnson, G.L., and Gelfand, E.W. (1999). Mitogen-activated protein kinase activation through FcεRI and stem cell factor receptor is differentially regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and calcineurin in mouse bone marrow-derived mast cells. *J. Immunol.* *162*, 2087–2094.
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., and Tsukita, S. (1999a). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J. Cell Biol.* *147*, 1351–1363.
- Itoh, M., Morita, K., and Tsukita, S. (1999b). Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J. Biol. Chem.* *274*, 5981–5986.
- Ji, Z., Mei, F.C., Xie, J., and Cheng, X. (2007). Oncogenic KRAS Activates Hedgehog Signaling Pathway in Pancreatic Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* *282*, 14048–14055.
- Jiang, J., and Struhl, G. (1998). Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature* *391*, 493–496.

Jin, D., Takai, S., Yamada, M., Sakaguchi, M., Kamoshita, K., Ishida, K., Sukenaga, Y., and Miyazaki, M. (2003). Impact of chymase inhibitor on cardiac function and survival after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 60, 413–420.

Jin, Y., Barnett, A., Zhang, Y., Yu, X., and Luo, Y. (2017). Poststroke Sonic Hedgehog Agonist Treatment Improves Functional Recovery by Enhancing Neurogenesis and Angiogenesis. *Stroke* 48, 1636–1645.

Jin Suk-Won and Patterson Cam (2009). The Opening Act. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29, 623–629.

Johnson, T.L., and Nerem, R.M. (2007). Endothelial connexin 37, connexin 40, and connexin 43 respond uniquely to substrate and shear stress. *Endothelium* 14, 215–226.

Johnson, R.W., Nguyen, M.P., Padalecki, S.S., Grubbs, B.G., Merkel, A.R., Oyajobi, B.O., Matrisian, L.M., Mundy, G.R., and Sterling, J.A. (2011). TGF-beta promotion of Gli2-induced expression of parathyroid hormone-related protein, an important osteolytic factor in bone metastasis, is independent of canonical Hedgehog signaling. *Cancer Res.* 71, 822–831.

Kagawa, H., Shino, Y., Kobayashi, D., Demizu, S., Shimada, M., Ariga, H., and Kawahara, H. (2011). A novel signaling pathway mediated by the nuclear targeting of C-terminal fragments of mammalian Patched 1. *PLoS ONE* 6, e18638.

Kanda, S., Mochizuki, Y., Suematsu, T., Miyata, Y., Nomata, K., and Kanetake, H. (2003). Sonic hedgehog induces capillary morphogenesis by endothelial cells through phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 278, 8244–8249.

Kanemitsu, H., Takai, S., Tsuneyoshi, H., Nishina, T., Yoshikawa, K., Miyazaki, M., Ikeda, T., and Komeda, M. (2006). Chymase Inhibition Prevents Cardiac Fibrosis and Dysfunction after Myocardial Infarction in Rats. *Hypertens Res* 29, 57–64.

Kanwar, M., Walter, C., Clarke, M., and Patarroyo-Aponte, M. (2016). Targeting heart failure with preserved ejection fraction: current status and future prospects. *Vasc Health Risk Manag* 12, 129–141.

Karhadkar, S.S., Bova, G.S., Abdallah, N., Dhara, S., Gardner, D., Maitra, A., Isaacs, J.T., Berman, D.M., and Beachy, P.A. (2004). Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* 431, 707–712.

Kasner, M., Westermann, D., Lopez, B., Gaub, R., Escher, F., Kühl, U., Schultheiss, H.-P., and Tschöpe, C. (2011). Diastolic Tissue Doppler Indexes Correlate With the Degree of Collagen Expression and Cross-Linking in Heart Failure and Normal Ejection Fraction. *Journal of the American College of Cardiology* 57, 977–985.

Kasper, M., Schnidar, H., Neill, G.W., Hanneder, M., Klingler, S., Blaas, L., Schmid, C., Hauser-Kronberger, C., Regl, G., Philpott, M.P., et al. (2006). Selective modulation of Hedgehog/GLI target gene expression by epidermal growth factor signaling in human keratinocytes. *Mol. Cell. Biol.* 26, 6283–6298.

104. Kato S, Saito N, Kirigaya H, Gyotoku D, Iinuma N, Kusakawa Y, et al. Impairment of Coronary Flow Reserve Evaluated by Phase Contrast Cine-Magnetic Resonance Imaging in

Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Heart Assoc* . 23 févr 2016 ;5(2).

Keeler, R.F., and Binns, W. (1968). Teratogenic compounds of *Veratrum californicum* (Durand). V. Comparison of cyclopien effects of steroidal alkaloids from the plant and structurally related compounds from other sources. *Teratology* 1, 5–10.

Khatibzadeh, S., Farzadfar, F., Oliver, J., Ezzati, M., and Moran, A. (2013). Worldwide risk factors for heart failure: A systematic review and pooled analysis. *International Journal of Cardiology* 168, 1186–1194.

Kinugawa, T., Ogino, K., Osaki, S., Kato, M., Igawa, O., Hisatome, I., Fujita, M., and Shigemasa, C. (2002). Prognostic significance of exercise plasma noradrenaline levels for cardiac death in patients with mild heart failure. *Circ J* 66, 261–266.

Kinzler, K.W., Bigner, S.H., Bigner, D.D., Trent, J.M., Law, M.L., O'Brien, S.J., Wong, A.J., and Vogelstein, B. (1987). Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science* 236, 70–73.

Kishimoto, S., Kajikawa, M., Maruhashi, T., Iwamoto, Y., Matsumoto, T., Iwamoto, A., Oda, N., Matsui, S., Hidaka, T., Kihara, Y., et al. (2017). Endothelial dysfunction and abnormal vascular structure are simultaneously present in patients with heart failure with preserved ejection fraction. *International Journal of Cardiology* 231, 181–187.

Koike, J., Sagara, N., Kirikoshi, H., Takagi, A., Miwa, T., Hirai, M., and Katoh, M. (2000). Molecular cloning and genomic structure of the betaTRCP2 gene on chromosome 5q35.1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 103–109.

Kokkonen, J.O., Vartiainen, M., and Kovanen, P.T. (1986). Low density lipoprotein degradation by secretory granules of rat mast cells. Sequential degradation of apolipoprotein B by granule chymase and carboxypeptidase A. *J. Biol. Chem.* 261, 16067–16072.

Kolyada, A.Y., Riley, K.N., and Herman, I.M. (2003). Rho GTPase signaling modulates cell shape and contractile phenotype in an isoactin-specific manner. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C1116–1121.

Koo, I.C., Ohol, Y.M., Wu, P., Morisaki, J.H., Cox, J.S., and Brown, E.J. (2008). Role for lysosomal enzyme beta-hexosaminidase in the control of mycobacteria infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 710–715.

Korc, M. (2007). Pancreatic cancer-associated stroma production. *Am. J. Surg.* 194, S84–86.

Korkmaz, M.E., Oto, A., Saraçlar, Y., Oram, E., Oram, A., Ugurlu, S., Karamehmetoglu, A., and Karaagaoglu, E. (1991). Levels of IgE in the serum of patients with coronary arterial disease. *Int. J. Cardiol.* 31, 199–204.

Kovanen, P.T., Mänttari, M., Palosuo, T., Manninen, V., and Aho, K. (1998). Prediction of myocardial infarction in dyslipidemic men by elevated levels of immunoglobulin classes A, E, and G, but not M. *Arch. Intern. Med.* 158, 1434–1439.

- Krattinger, N., Capponi, A., Mazzolai, L., Aubert, J.-F., Caille, D., Nicod, P., Waeber, G., Meda, P., and Haefliger, J.-A. (2007). Connexin40 regulates renin production and blood pressure. *Kidney Int.* 72, 814–822.
- Kritikou, E., Kuiper, J., Kovanen, P.T., and Bot, I. (2016). The impact of mast cells on cardiovascular diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 778, 103–115.
- Kubo, M., Nakamura, M., Tasaki, A., Yamanaka, N., Nakashima, H., Nomura, M., Kuroki, S., and Katano, M. (2004). Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer Res.* 64, 6071–6074.
- Kühn, H., and O'Donnell, V.B. (2006). Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases. *Prog. Lipid Res.* 45, 334–356.
- Kunder, C.A., St John, A.L., and Abraham, S.N. (2011). Mast cell modulation of the vascular and lymphatic endothelium. *Blood* 118, 5383–5393.
- Kuroda, H., Kurio, N., Shimo, T., Matsumoto, K., Masui, M., Takabatake, K., Okui, T., Ibaragi, S., Kunisada, Y., Obata, K., et al. (2017). Oral Squamous Cell Carcinoma-derived Sonic Hedgehog Promotes Angiogenesis. *Anticancer Res.* 37, 6731–6737.
- Kusano, K.F., Allendoerfer, K.L., Munger, W., Pola, R., Bosch-Marce, M., Kirchmair, R., Yoon, Y., Curry, C., Silver, M., Kearney, M., et al. (2004). Sonic hedgehog induces arteriogenesis in diabetic vasa nervorum and restores function in diabetic neuropathy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 2102–2107.
- Kusano, K.F., Pola, R., Murayama, T., Curry, C., Kawamoto, A., Iwakura, A., Shintani, S., Ii, M., Asai, J., Tkebuchava, T., et al. (2005). Sonic hedgehog myocardial gene therapy: tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling. *Nat. Med.* 11, 1197–1204.
- Kuster, G.M., Lancel, S., Zhang, J., Communal, C., Trucillo, M.P., Lim, C.C., Pfister, O., Weinberg, E.O., Cohen, R.A., Liao, R., et al. (2010). Redox-mediated reciprocal regulation of SERCA and Na⁺-Ca²⁺ exchanger contributes to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ depletion in cardiac myocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 1182–1187.
- 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 Noncardiac Dysfunction as Precursors of Heart Failure With Reduced and Preserved Ejection Fraction in the Community. *Circulation* 124, 24–30.
- Lam, C.S.P., Gamble, G.D., Ling, L.H., Sim, D., Leong, K.T.G., Yeo, P.S.D., Ong, H.Y., Jaufeerally, F., Ng, T.P., Cameron, V.A., et al. (2018). Mortality associated with heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction in a prospective international multi-ethnic cohort study. *Eur Heart J* 39, 1770–1780.
- 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.
- Lampugnani, M.G., Corada, M., Caveda, L., Breviario, F., Ayalon, O., Geiger, B., and Dejana, E. (1995). The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential

association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J. Cell Biol.* *129*, 203–217.

Lauth, M., Bergström, Å., Shimokawa, T., and Toftgård, R. (2007). Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 8455–8460.

Lavine, K.J., White, A.C., Park, C., Smith, C.S., Choi, K., Long, F., Hui, C., and Ornitz, D.M. (2006). Fibroblast growth factor signals regulate a wave of Hedgehog activation that is essential for coronary vascular development. *Genes Dev.* *20*, 1651–1666.

Lavine, K.J., Long, F., Choi, K., Smith, C., and Ornitz, D.M. (2008). Hedgehog signaling to distinct cell types differentially regulates coronary artery and vein development. *Development* *135*, 3161–3171.

Le, Q.T., Gomez, G., Zhao, W., Hu, J., Xia, H.-Z., Fukuoka, Y., Katunuma, N., and Schwartz, L.B. (2011). Processing of human protryptase in mast cells involves cathepsins L, B and C. *J Immunol* *187*, 1912–1918.

Le Gall, S.M., Bobé, P., Reiss, K., Horiuchi, K., Niu, X.-D., Lundell, D., Gibb, D.R., Conrad, D., Saftig, P., and Blobel, C.P. (2009). ADAMs 10 and 17 Represent Differentially Regulated Components of a General Shedding Machinery for Membrane Proteins Such as Transforming Growth Factor α , L-Selectin, and Tumor Necrosis Factor α . *MBoC* *20*, 1785–1794.

Leach, L., Clark, P., Lampugnani, M.G., Arroyo, A.G., Dejana, E., and Firth, J.A. (1993). Immunoelectron characterisation of the inter-endothelial junctions of human term placenta. *J. Cell. Sci.* *104* (Pt 4), 1073–1081.

Lewis, E.F., Moye, L.A., Rouleau, J.L., Sacks, F.M., Arnold, J.M.O., Warnica, J.W., Flaker, G.C., Braunwald, E., and Pfeffer, M.A. (2003). Predictors of late development of heart failure in stable survivors of myocardial infarction: The CARE study. *Journal of the American College of Cardiology* *42*, 1446–1453.

Li, Y., Lui, K.O., and Zhou, B. (2018). Reassessing endothelial-to-mesenchymal transition in cardiovascular diseases. *Nat Rev Cardiol* *15*, 445–456.

Liao, J.K. (2013). Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *J Clin Invest* *123*, 540–541.

Liao, X., Siu, M.K.Y., Au, C.W.H., Wong, E.S.Y., Chan, H.Y., Ip, P.P.C., Ngan, H.Y.S., and Cheung, A.N.Y. (2009). Aberrant activation of hedgehog signaling pathway in ovarian cancers: effect on prognosis, cell invasion and differentiation. *Carcinogenesis* *30*, 131–140.

Liao, Y., Day, K.H., Damon, D.N., and Duling, B.R. (2001). Endothelial cell-specific knockout of connexin 43 causes hypotension and bradycardia in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 9989–9994.

Lindstedt, K.A., Wang, Y., Shiota, N., Saarinen, J., Hyytiäinen, M., Kokkonen, J.O., Keski-Oja, J., and Kovanen, P.T. (2001). Activation of paracrine TGF- β 1 signaling upon stimulation and degranulation of rat serosal mast cells: a novel function for chymase. *The FASEB Journal* *15*, 1377–1388.

- Linke, W.A., and Hamdani, N. (2014). Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. *Circ Res* 114, 1052–1068.
- Liu, H., Fu, Y., and Wang, K. (2017). Asthma and risk of coronary heart disease: A meta-analysis of cohort studies. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 118, 689–695.
- Lyle, M.A., and Brozovich, F.V. (2018). HFpEF, a Disease of the Vasculature: A Closer Look at the Other Half. *Mayo Clin. Proc.* 93, 1305–1314.
- Marechaux, S., Samson, R., van Belle, E., Breyne, J., de Monte, J., Dedrie, C., Chebai, N., Menet, A., Banfi, C., Bouabdallaoui, N., et al. (2016). Vascular and Microvascular Endothelial Function in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Journal of Cardiac Failure* 22, 3–11.
- Marigo, V., Roberts, D.J., Lee, S.M., Tsukurov, O., Levi, T., Gastier, J.M., Epstein, D.J., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., and Seidman, C.E. (1995). Cloning, expression, and chromosomal location of SHH and IHH: two human homologues of the *Drosophila* segment polarity gene hedgehog. *Genomics* 28, 44–51.
- Marrachelli, V.G., Mastronardi, M.L., Sarr, M., Soleti, R., Leonetti, D., Martínez, M.C., and Andriantsitohaina, R. (2013). Sonic hedgehog carried by microparticles corrects angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in mice. *PLoS ONE* 8, e72861.
- Marti, C.N., Gheorghiade, M., Kalogeropoulos, A.P., Georgiopoulou, V.V., Quyyumi, A.A., and Butler, J. (2012). Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure. *J Am Coll Cardiol* 60, 1455–1469.
- Martinelli, D.C., and Fan, C.-M. (2007). The role of Gas1 in embryonic development and its implications for human disease. *Cell Cycle* 6, 2650–2655.
- 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. *New England Journal of Medicine* 359, 2456–2467.
- Matthews, V., Schuster, B., Schütze, S., Bussmeyer, I., Ludwig, A., Hundhausen, C., Sadowski, T., Saftig, P., Hartmann, D., Kallen, K.-J., et al. (2003). Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem* 278, 38829–38839.
- McDermott, A., Gustafsson, M., Elsam, T., Hui, C.-C., Emerson, C.P., and Borycki, A.-G. (2005). Gli2 and Gli3 have redundant and context-dependent function in skeletal muscle formation. *Development* 132, 345–357.
- McLellan, J.S., Zheng, X., Hauk, G., Ghirlando, R., Beachy, P.A., and Leahy, D.J. (2008). The mode of Hedgehog binding to Ihog homologues is not conserved across different phyla. *Nature* 455, 979–983.
- McMahan, R.S., Riehle, K.J., Fausto, N., and Campbell, J.S. (2013). A disintegrin and metalloproteinase 17 regulates TNF and TNFR1 levels in inflammation and liver regeneration in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305, G25-34.

4. McMurray JJV, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, et al. Angiotensin–Neprilysin Inhibition versus Enalapril in Heart Failure. *New England Journal of Medicine*. 11 sept 2014;371(11):993-1004.

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.

Milenkovic, L., Goodrich, L.V., Higgins, K.M., and Scott, M.P. (1999). Mouse patched1 controls body size determination and limb patterning. *Development* *126*, 4431–4440.

Milla, M.E., Gonzales, P.E., and Leonard, J.D. (2006). The TACE zymogen: re-examining the role of the cysteine switch. *Cell Biochem. Biophys.* *44*, 342–348.

Miyamoto, M., McClure, D.E., Schertel, E.R., Andrews, P.J., Jones, G.A., Pratt, J.W., Ross, P., and Myerowitz, P.D. (1998). Effects of hypoproteinemia-induced myocardial edema on left ventricular function. *Am J Physiol* *274*, H937-944.

Mizui, Y., Yamazaki, K., Sagane, K., and Tanaka, I. (1999). cDNA cloning of mouse tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE) and partial analysis of its promoter. *Gene* *233*, 67–74.

Mohajeri, M., Kovanen, P.T., Bianconi, V., Pirro, M., Cicero, A.F.G., and Sahebkar, A. (2019). Mast cell tryptase - Marker and maker of cardiovascular diseases. *Pharmacol. Ther.* *199*, 91–110.

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

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

Mohan, J.C., Sethi, K.K., Arora, R., and Khalilullah, M. (1992). Cross sectional echocardiographic left ventricular ejection fraction: method based variability. *Indian Heart J* *44*, 23–28.

Moss, M.L., Jin, S.L., Milla, M.E., Bickett, D.M., Burkhart, W., Carter, H.L., Chen, W.J., Clay, W.C., Didsbury, J.R., Hassler, D., et al. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* *385*, 733–736.

Motoyama, J., Liu, J., Mo, R., Ding, Q., Post, M., and Hui, C.C. (1998). Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus. *Nat. Genet.* *20*, 54–57.

- Murone, M., Rosenthal, A., and de Sauvage, F.J. (1999). Hedgehog signal transduction: from flies to vertebrates. *Exp. Cell Res.* 253, 25–33.
- Nagase, M., Nagase, T., Koshima, I., and Fujita, T. (2006). Critical time window of hedgehog-dependent angiogenesis in murine yolk sac. *Microvasc. Res.* 71, 85–90.
- Nakajima, T., Matsumoto, K., Suto, H., Tanaka, K., Ebisawa, M., Tomita, H., Yuki, K., Katsunuma, T., Akasawa, A., Hashida, R., et al. (2001). Gene expression screening of human mast cells and eosinophils using high-density oligonucleotide probe arrays: abundant expression of major basic protein in mast cells. *Blood* 98, 1127–1134.
- Nakamura, K., Sasajima, J., Mizukami, Y., Sugiyama, Y., Yamazaki, M., Fujii, R., Kawamoto, T., Koizumi, K., Sato, K., Fujiya, M., et al. (2010). Hedgehog promotes neovascularization in pancreatic cancers by regulating Ang-1 and IGF-1 expression in bone-marrow derived pro-angiogenic cells. *PLoS ONE* 5, e8824.
- Nedelcu, D., Liu, J., Xu, Y., Jao, C., and Salic, A. (2013). Oxysterol binding to the extracellular domain of Smoothed in Hedgehog signaling. *Nat Chem Biol* 9, 557–564.
- Nees, S., Weiss, D.R., Senftl, A., Knott, M., Förch, S., Schnurr, M., Weyrich, P., and Juchem, G. (2012). Isolation, bulk cultivation, and characterization of coronary microvascular pericytes: the second most frequent myocardial cell type in vitro. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 302, H69-84.
- Ngkelo, A., Richart, A., Kirk, J.A., Bonnin, P., Vilar, J., Lemitre, M., Marck, P., Branchereau, M., Le Gall, S., Renault, N., et al. (2016). Mast cells regulate myofilament calcium sensitization and heart function after myocardial infarction. *J. Exp. Med.* 213, 1353–1374.
- Nie, D.-M., Wu, Q.-L., Zheng, P., Chen, P., Zhang, R., Li, B.-B., Fang, J., Xia, L.-H., and Hong, M. (2016). Endothelial microparticles carrying hedgehog-interacting protein induce continuous endothelial damage in the pathogenesis of acute graft-versus-host disease. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 310, C821-835.
- Nieuwenhuis, E., Motoyama, J., Barnfield, P.C., Yoshikawa, Y., Zhang, X., Mo, R., Crackower, M.A., and Hui, C. (2006). Mice with a Targeted Mutation of Patched2 Are Viable but Develop Alopecia and Epidermal Hyperplasia. *Mol Cell Biol* 26, 6609–6622.
- Noireaud, J., and Andriantsitohaina, R. (2014). Recent insights in the paracrine modulation of cardiomyocyte contractility by cardiac endothelial cells. *Biomed Res Int* 2014, 923805.
- Nüsslein-Volhard, C., and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795–801.
- Oh, J.K. (2007). Echocardiography in heart failure: Beyond diagnosis. *Eur J Echocardiogr* 8, 4–14.
- Oka Toru, Akazawa Hiroshi, Naito Atsuhiko T., and Komuro Issei (2014). Angiogenesis and Cardiac Hypertrophy. *Circulation Research* 114, 565–571.
- Olszewski, M.B., Groot, A.J., Dastyh, J., and Knol, E.F. (2007). TNF trafficking to human mast cell granules: mature chain-dependent endocytosis. *J. Immunol.* 178, 5701–5709.

- Ozawa, K., Szallasi, Z., Kazanietz, M.G., Blumberg, P.M., Mischak, H., Mushinski, J.F., and Beaven, M.A. (1993). Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent isozymes of protein kinase C mediate exocytosis in antigen-stimulated rat basophilic RBL-2H3 cells. Reconstitution of secretory responses with Ca²⁺ and purified isozymes in washed permeabilized cells. *J. Biol. Chem.* 268, 1749–1756.
- Packer, M. (2011). Can brain natriuretic peptide be used to guide the management of patients with heart failure and a preserved ejection fraction? The wrong way to identify new treatments for a nonexistent disease. *Circ Heart Fail* 4, 538–540.
- Pan, Y., Bai, C.B., Joyner, A.L., and Wang, B. (2006). Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3365–3377.
- Pant, T., Dhanasekaran, A., Bai, X., Zhao, M., Thorp, E.B., Forbess, J.M., Bosnjak, Z.J., and Ge, Z.-D. (2019). Genome-wide differential expression profiling of lncRNAs and mRNAs associated with early diabetic cardiomyopathy. *Sci Rep* 9, 15345.
- Parmantier, E., Lynn, B., Lawson, D., Turmaine, M., Namini, S.S., Chakrabarti, L., McMahon, A.P., Jessen, K.R., and Mirsky, R. (1999). Schwann cell-derived Desert hedgehog controls the development of peripheral nerve sheaths. *Neuron* 23, 713–724.
- Patel, I.R., Attur, M.G., Patel, R.N., Stuchin, S.A., Abagyan, R.A., Abramson, S.B., and Amin, A.R. (1998). TNF-alpha convertase enzyme from human arthritis-affected cartilage: isolation of cDNA by differential display, expression of the active enzyme, and regulation of TNF-alpha. *J. Immunol.* 160, 4570–4579.
- Patella, V., Marinò, I., Lampärter, B., Arbustini, E., Adt, M., and Marone, G. (1995). Human heart mast cells. Isolation, purification, ultrastructure, and immunologic characterization. *J. Immunol.* 154, 2855–2865.
- Patella, V., de Crescenzo, G., Lamparter-Schummert, B., De Rosa, G., Adt, M., and Marone, G. (1997). Increased cardiac mast cell density and mediator release in patients with dilated cardiomyopathy. *Inflamm Res* 46 Suppl 1, S31-32.
- Pathi, S., Pagan-Westphal, S., Baker, D.P., Garber, E.A., Rayhorn, P., Bumcrot, D., Tabin, C.J., Blake Pepinsky, R., and Williams, K.P. (2001). Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog. *Mech Dev* 106, 107–117.
- Paulus, W.J., and Tschöpe, C. (2013). A Novel Paradigm for Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Journal of the American College of Cardiology* 62, 263–271.
- Paulus, W.J., and Tschöpe, C. (2013). 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.
- Peiretti, F., Deprez-Beauclair, P., Bonardo, B., Aubert, H., Juhan-Vague, I., and Nalbone, G. (2003). Identification of SAP97 as an intracellular binding partner of TACE. *Journal of Cell Science* 116, 1949–1957.
- Pejler, G., Abrink, M., Ringvall, M., and Wernersson, S. (2007). Mast cell proteases. *Adv. Immunol.* 95, 167–255.

- Pepinsky, R.B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D.P., Williams, K.P., Bixler, S.A., Ambrose, C.M., Garber, E.A., Miatkowski, K., et al. (1998). Identification of a Palmitic Acid-modified Form of Human Sonic hedgehog. *J. Biol. Chem.* *273*, 14037–14045.
- Peschon, J.J., Slack, J.L., Reddy, P., Stocking, K.L., Sunnarborg, S.W., Lee, D.C., Russell, W.E., Castner, B.J., Johnson, R.S., Fitzner, J.N., et al. (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* *282*, 1281–1284.
- Pfeffer, M.A., Shah, A.M., and Borlaug, B.A. (2019). Heart Failure With Preserved Ejection Fraction In Perspective. *Circ. Res.* *124*, 1598–1617.
- Pfeffer Marc A., Shah Amil M., and Borlaug Barry A. (2019). Heart Failure With Preserved Ejection Fraction In Perspective. *Circulation Research* *124*, 1598–1617.
- Phan, T.T., Abozguia, K., Nallur Shivu, G., 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.
- Pinto, A.R., Ilinykh, A., Ivey, M.J., Kuwabara, J.T., D’Antoni, M.L., Debuque, R., Chandran, A., Wang, L., Arora, K., Rosenthal, N.A., et al. (2016). Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res* *118*, 400–409.
- Pola, R., Ling, L.E., Silver, M., Corbley, M.J., Kearney, M., Blake Pepinsky, R., Shapiro, R., Taylor, F.R., Baker, D.P., Asahara, T., et al. (2001). The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat. Med.* *7*, 706–711.
- Polizio, A.H., Chinchilla, P., Chen, X., Kim, S., Manning, D.R., and Riobo, N.A. (2011). Heterotrimeric Gi proteins link Hedgehog signaling to activation of Rho small GTPases to promote fibroblast migration. *J. Biol. Chem.* *286*, 19589–19596.
- Ponikowski, P., Voors, A.A., Anker, S.D., Bueno, H., Cleland, J.G.F., Coats, A.J.S., Falk, V., González-Juanatey, J.R., Harjola, V.-P., Jankowska, E.A., et al. (2016). 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur. Heart J.* *37*, 2129–2200.
- Porter, J.A., Young, K.E., and Beachy, P.A. (1996). Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* *274*, 255–259.
- Price, M.A. (2006). CKI, there’s more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. *Genes Dev.* *20*, 399–410.
- Quarto, R., Kinet, J.P., and Metzger, H. (1985). Coordinate synthesis and degradation of the alpha-, beta- and gamma-subunits of the receptor for immunoglobulin E. *Mol. Immunol.* *22*, 1045–1051.
- Rakusan K, Sarkar K, Turek Z, and Wicker P (1990). Mast cells in the rat heart during normal growth and in cardiac hypertrophy. *Circulation Research* *66*, 511–516.

- Ramalho-Santos, M., Melton, D.A., and McMahon, A.P. (2000). Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development* 127, 2763–2772.
- Rascher, G., and Wolburg, H. (1997). The tight junctions of the leptomeningeal blood-cerebrospinal fluid barrier during development. *J Hirnforsch* 38, 525–540.
- Redfield, M., Borlaug, B., Lewis, G., Mohammed, S., Semigran, M., LeWinter, M., Deswal, A., Hernandez, A., Lee, K., and Braunwald, E. (2012). Phosphodiesterase-5 Inhibition in Diastolic Heart Failure: The RELAX Trial Rationale and Design. *Circ Heart Fail* 5, 653–659.
- Reese, T.S., and Karnovsky, M.J. (1967). Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* 34, 207–217.
- Renault, M.A., Roncalli, J., Tongers, J., Misener, S., Thorne, T., Jujo, K., Ito, A., Clarke, T., Fung, C., Millay, M., et al. (2009). The Hedgehog transcription factor Gli3 modulates angiogenesis. *Circ Res* 105, 818–826.
- Renault, M.-A., Roncalli, J., Tongers, J., Thorne, T., Klyachko, E., Misener, S., Volpert, O.V., Mehta, S., Burg, A., Luedemann, C., et al. (2010). Sonic hedgehog induces angiogenesis via Rho kinase-dependent signaling in endothelial cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 49, 490–498.
- Renault, M.-A., Chapouly, C., Yao, Q., Larrieu-Lahargue, F., Vandierdonck, S., Reynaud, A., Petit, M., Jaspard-Vinassa, B., Belloc, I., Traiffort, E., et al. (2013). Desert hedgehog promotes ischemia-induced angiogenesis by ensuring peripheral nerve survival. *Circ. Res.* 112, 762–770.
- Renault, M.-A., Couffignal, T., Guimbal Sarah, and Chapouly Candice Use of Mast cells stabilizer for the treatment of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction.
- Riley, J.F. (1953). Histamine in tissue mast cells. *Science* 118, 332.
- Riley, J.F., and West, G.B. (1953). The presence of histamine in tissue mast cells. *J Physiol* 120, 528–537.
- Riobo, N.A., and Manning, D.R. (2007). Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs. *Biochem. J.* 403, 369–379.
- Robbins, D.J., Fei, D.L., and Riobo, N.A. (2012). The Hedgehog signal transduction network. *Sci Signal* 5, re6.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140.
- Roncalli, J., Renault, M.A., Tongers, J., Misener, S., Thorne, T., Kamide, C., Jujo, K., Tanaka, T., Ii, M., Klyachko, E., et al. (2011). Sonic hedgehog-induced functional recovery after myocardial infarction is enhanced by AMD3100-mediated progenitor-cell mobilization. *J Am Coll Cardiol* 57, 2444–2452.

- Rozenbaum, Z., Topilsky, Y., Khoury, S., Pereg, D., and Laufer-Perl, M. (2019). Association of body mass index and diastolic function in metabolically healthy obese with preserved ejection fraction. *International Journal of Cardiology* 277, 147–152.
- Rudin, C.M., Hann, C.L., Laterra, J., Yauch, R.L., Callahan, C.A., Fu, L., Holcomb, T., Stinson, J., Gould, S.E., Coleman, B., et al. (2009). Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N. Engl. J. Med.* 361, 1173–1178.
- Saitoh, T., and Katoh, M. (2001). Expression profiles of betaTRCP1 and betaTRCP2, and mutation analysis of betaTRCP2 in gastric cancer. *Int. J. Oncol.* 18, 959–964.
- Sanchez, P., Hernández, A.M., Stecca, B., Kahler, A.J., DeGueme, A.M., Barrett, A., Beyna, M., Datta, M.W., Datta, S., and Ruiz i Altaba, A. (2004). Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 12561–12566.
- Sander, L.E., Frank, S.P.C., Bolat, S., Blank, U., Galli, T., Bigalke, H., Bischoff, S.C., and Lorentz, A. (2008). Vesicle associated membrane protein (VAMP)-7 and VAMP-8, but not VAMP-2 or VAMP-3, are required for activation-induced degranulation of mature human mast cells. *Eur. J. Immunol.* 38, 855–863.
- Saqib, U., Sarkar, S., Suk, K., Mohammad, O., Baig, M.S., and Savai, R. (2018). Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. *Oncotarget* 9, 17937–17950.
- Satoh, M., Nakamura, M., Saitoh, H., Satoh, H., Maesawa, C., Segawa, I., Tashiro, A., and Hiramori, K. (1999). Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme and tumor necrosis factor-alpha in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 99, 3260–3265.
- Satoh, M., Nakamura, M., Satoh, H., Saitoh, H., Segawa, I., and Hiramori, K. (2000). Expression of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme and tumor necrosis factor-alpha in human myocarditis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 36, 1288–1294.
- Schantl, J.A., Roza, M., Van Kerkhof, P., and Strous, G.J. (2004). The growth hormone receptor interacts with its sheddase, the tumour necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE). *Biochem J* 377, 379–384.
- Schechter, N.M., Irani, A.M., Sprows, J.L., Abernethy, J., Wintroub, B., and Schwartz, L.B. (1990). Identification of a cathepsin G-like proteinase in the MCTC type of human mast cell. *J Immunol* 145, 2652–2661.
- 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. (2019a). Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction. *Nature* 1.
- 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. (2019b). Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction. *Nature* 568, 351–356.
- Schlöndorff, J., Becherer, J.D., and Blobel, C.P. (2000). Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem. J.* 347 Pt 1, 131–138.

- 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* 273, 147–154.
- Schneeberger, E.E. (1982). Structure of intercellular junctions in different segments of the intrapulmonary vasculature. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 384, 54–63.
- Schwartz, L.B., and Austen, K.F. (1981). Acid hydrolases and other enzymes of rat and human mast cell secretory granules. *Kroc Found Ser* 14, 103–121.
- Schwarz, J., Broder, C., Helmstetter, A., Schmidt, S., Yan, I., Müller, M., Schmidt-Arras, D., Becker-Pauly, C., Koch-Nolte, F., Mittrücker, H.-W., et al. (2013). Short-term TNF α shedding is independent of cytoplasmic phosphorylation or furin cleavage of ADAM17. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833, 3355–3367.
- Shah, S.J., and Gheorghiade, M. (2008). Heart failure with preserved ejection fraction: treat now by treating comorbidities. *JAMA* 300, 431–433.
- 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 preserved ejection fraction: a systematic review and meta-analysis. *J. Card. Fail.* 16, 260–267.
- Shah, S.J., Katz, D.H., Selvaraj, S., Burke, M.A., Yancy, C.W., Gheorghiade, M., Bonow, R.O., Huang, C.-C., and Deo, R.C. (2015). Phenomapping for Novel Classification of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Circulation* 131, 269–279.
- Sharma, K., and Kass, D.A. (2014). Heart failure with preserved ejection fraction: mechanisms, clinical features, and therapies. *Circ Res* 115, 79–96.
- Shear, F.E. (2019). Novel paradigms in the therapeutic management of heart failure with preserved ejection fraction: clinical perspectives. *Am J Cardiovasc Dis* 9, 91–108.
- Shen Mengcheng, Hu Mei, Fedak Paul W.M., Oudit Gavin Y., and Kassiri Zamaneh (2018). Cell-Specific Functions of ADAM17 Regulate the Progression of Thoracic Aortic Aneurysm. *Circulation Research* 123, 372–388.
- Shiota, N., Rysä, J., Kovanen, P.T., Ruskoaho, H., Kokkonen, J.O., and Lindstedt, K.A. (2003). A role for cardiac mast cells in the pathogenesis of hypertensive heart disease. *J. Hypertens.* 21, 1935–1944.
- Sicklick, J.K., Li, Y.-X., Jayaraman, A., Kannangai, R., Qi, Y., Vivekanandan, P., Ludlow, J.W., Owzar, K., Chen, W., Torbenson, M.S., et al. (2006). Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 27, 748–757.
- Silver, R.B., Reid, A.C., Mackins, C.J., Askwith, T., Schaefer, U., Herzlinger, D., and Levi, R. (2004). Mast cells: a unique source of renin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13607–13612.
- Simionescu, M., Simionescu, N., and Palade, G.E. (1975). Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. The microvasculature. *J. Cell Biol.* 67, 863–885.

- Simionescu, M., Simionescu, N., and Palade, G.E. (1976). Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. Arteries and veins. *J. Cell Biol.* *68*, 705–723.
- Singh, V.B., Singh, M.V., Piekna-Przybylska, D., Gorantla, S., Poluektova, L.Y., and Maggirwar, S.B. (2017). Sonic Hedgehog mimetic prevents leukocyte infiltration into the CNS during acute HIV infection. *Sci Rep* *7*, 9578.
- Smink, P.A., Lambers Heerspink, H.J., Gansevoort, R.T., de Jong, P.E., Hillege, H.L., Bakker, S.J.L., and de Zeeuw, D. (2012). Albuminuria, estimated GFR, traditional risk factors, and incident cardiovascular disease: the PREVEND (Prevention of Renal and Vascular Endstage Disease) study. *Am. J. Kidney Dis.* *60*, 804–811.
- Smith, C.S., Bottomley, P.A., Schulman, S.P., Gerstenblith, G., and Weiss, R.G. (2006). Altered creatine kinase adenosine triphosphate kinetics in failing hypertrophied human myocardium. *Circulation* *114*, 1151–1158.
- Sohaib, S.M.A., Finegold, J.A., Nijjer, S.S., Hossain, R., Linde, C., Levy, W.C., Sutton, R., Kanagaratnam, P., Francis, D.P., and Whinnett, Z.I. (2015). Opportunity to Increase Life Span in Narrow QRS Cardiac Resynchronization Therapy Recipients by Deactivating Ventricular Pacing: Evidence From Randomized Controlled Trials. *JACC: Heart Failure* *3*, 327–336.
- Soond, S.M., Everson, B., Riches, D.W.H., and Murphy, G. (2005). ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNF α -converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *Journal of Cell Science* *118*, 2371–2380.
- Stanton, B.Z., and Peng, L.F. (2010). Small-molecule modulators of the Sonic Hedgehog signaling pathway. *Mol Biosyst* *6*, 44–54.
- Stanton, B.Z., Peng, L.F., Maloof, N., Nakai, K., Wang, X., Duffner, J.L., Taveras, K.M., Hyman, J.M., Lee, S.W., Koehler, A.N., et al. (2009). A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signaling in human cells. *Nat. Chem. Biol.* *5*, 154–156.
- Stecca, B., Mas, C., Clement, V., Zbinden, M., Correa, R., Piguet, V., Beermann, F., and Altaba, A.R. (2007). Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *PNAS* *104*, 5895–5900.
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., and McMahon, A.P. (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* *13*, 2072–2086.
- Sucato, V., Evola, S., Novo, G., Sansone, A., Quagliana, A., Andolina, G., Assennato, P., and Novo, S. (2015). Angiographic Evaluation of Coronary Microvascular Dysfunction in Patients with Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. *Microcirculation* *22*, 528–533.
- Swirski, F.K., and Nahrendorf, M. (2018). Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* *18*, 733–744.
- Taipale, J., and Beachy, P.A. (2001). The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* *411*, 349–354.
- Tamura, K., Shan, W.S., Hendrickson, W.A., Colman, D.R., and Shapiro, L. (1998). Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. *Neuron* *20*, 1153–1163.

- Thayer, S.P., di Magliano, M.P., Heiser, P.W., Nielsen, C.M., Roberts, D.J., Lauwers, G.Y., Qi, Y.P., Gysin, S., Fernández-del Castillo, C., Yajnik, V., et al. (2003). Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* *425*, 851–856.
- Thiagarajan, R.R., Winn, R.K., and Harlan, J.M. (1997). The role of leukocyte and endothelial adhesion molecules in ischemia-reperfusion injury. *Thromb Haemost* *78*, 310–314.
- Thibert, C., Teillet, M.-A., Lapointe, F., Mazelin, L., Le Douarin, N.M., and Mehlen, P. (2003). Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science* *301*, 843–846.
- Tian, H., Callahan, C.A., DuPree, K.J., Darbonne, W.C., Ahn, C.P., Scales, S.J., and de Sauvage, F.J. (2009). Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 4254–4259.
- Tirziu, D., Giordano, F.J., and Simons, M. (2010). Cell communications in the heart. *Circulation* *122*, 928–937.
- Tiwari, N., Wang, C.-C., Brochetta, C., Ke, G., Vita, F., Qi, Z., Rivera, J., Soranzo, M.R., Zabucchi, G., Hong, W., et al. (2008). VAMP-8 segregates mast cell-preformed mediator exocytosis from cytokine trafficking pathways. *Blood* *111*, 3665–3674.
- Trazzi, S., Mitrugno, V.M., Valli, E., Fuchs, C., Rizzi, S., Guidi, S., Perini, G., Bartesaghi, R., and Ciani, E. (2011). APP-dependent up-regulation of Ptch1 underlies proliferation impairment of neural precursors in Down syndrome. *Hum Mol Genet* *20*, 1560–1573.
- Tremblay, M.R., Nesler, M., Weatherhead, R., and Castro, A.C. (2009). Recent patents for Hedgehog pathway inhibitors for the treatment of malignancy. *Expert Opin Ther Pat* *19*, 1039–1056.
- Tromp, J., Westenbrink, B.D., Ouwerkerk, W., van Veldhuisen, D.J., Samani, N.J., Ponikowski, P., Metra, M., Anker, S.D., Cleland, J.G., Dickstein, K., et al. (2018). Identifying Pathophysiological Mechanisms in Heart Failure With Reduced Versus Preserved Ejection Fraction. *J. Am. Coll. Cardiol.* *72*, 1081–1090.
- Tsai, M., Shih, L.S., Newlands, G.F., Takeishi, T., Langley, K.E., Zsebo, K.M., Miller, H.R., Geissler, E.N., and Galli, S.J. (1991a). The rat c-kit ligand, stem cell factor, induces the development of connective tissue-type and mucosal mast cells in vivo. Analysis by anatomical distribution, histochemistry, and protease phenotype. *J. Exp. Med.* *174*, 125–131.
- Tsai, M., Takeishi, T., Thompson, H., Langley, K.E., Zsebo, K.M., Metcalfe, D.D., Geissler, E.N., and Galli, S.J. (1991b). Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *88*, 6382–6386.
- Tschöpe, C., Bock, C.-T., Kasner, M., Noutsias, M., Westermann, D., Schwimbeck, P.-L., Pauschinger, M., Poller, W.-C., Kühn, U., Kandolf, R., et al. (2005). High prevalence of cardiac parvovirus B19 infection in patients with isolated left ventricular diastolic dysfunction. *Circulation* *111*, 879–886.
- Tsou, C.L., Haskell, C.A., and Charo, I.F. (2001). Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine. *J. Biol. Chem.* *276*, 44622–44626.

Tsutsui, H., Tsuchihashi-Makaya, M., and Kinugawa, S. (2010). Clinical characteristics and outcomes of heart failure with preserved ejection fraction: Lessons from epidemiological studies. *Journal of Cardiology* 55, 13–22.

Unal, D., Gelincik, A., Elitok, A., Demir, S., Olgac, M., Coskun, R., Kocaaga, M., Colakoglu, B., and Buyukozturk, S. (2017). Impact of high serum Immunoglobulin E levels on the risk of atherosclerosis in humans. *Asia Pac Allergy* 7, 74–81.

Uden, A.B., Holmberg, E., Lundh-Rozell, B., Stähle-Bäckdahl, M., Zaphiropoulos, P.G., Toftgård, R., and Vorechovsky, I. (1996). Mutations in the human homologue of *Drosophila* patched (PTCH) in basal cell carcinomas and the Gorlin syndrome: different in vivo mechanisms of PTCH inactivation. *Cancer Res.* 56, 4562–4565.

Valentini, R.P., Brookhiser, W.T., Park, J., Yang, T., Briggs, J., Dressler, G., and Holzman, L.B. (1997). Post-translational Processing and Renal Expression of Mouse Indian Hedgehog. *J. Biol. Chem.* 272, 8466–8473.

Valle, G., Faulkner, G., De Antoni, A., Pacchioni, B., Pallavicini, A., Pandolfo, D., Tiso, N., Toppo, S., Trevisan, S., and Lanfranchi, G. (1997). Telethonin, a novel sarcomeric protein of heart and skeletal muscle. *FEBS Lett* 415, 163–168.

van Heerebeek Loek, Borbély Attila, Niessen Hans W.M., Bronzwaer Jean G.F., van der Velden Jolanda, Stienen Ger J.M., Linke Wolfgang A., Laarman Gerrit J., and Paulus Walter J. (2006). Myocardial Structure and Function Differ in Systolic and Diastolic Heart Failure. *Circulation* 113, 1966–1973.

van der Velden, J. (2011). Diastolic myofilament dysfunction in the failing human heart. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 462, 155.

Vig, M., DeHaven, W.I., Bird, G.S., Billingsley, J.M., Wang, H., Rao, P.E., Hutchings, A.B., Jouvin, M.-H., Putney, J.W., and Kinet, J.-P. (2008). Defective mast cell effector functions in mice lacking the CRACM1 pore subunit of store-operated calcium release-activated calcium channels. *Nat. Immunol.* 9, 89–96.

Vignon, P. (2007). Évaluation des pressions de remplissage ventriculaire gauche par échocardiographie-doppler. *Réanimation* 16, 139–148.

Wagner, C., de Wit, C., Gerl, M., Kurtz, A., and Höcherl, K. (2007). Increased expression of cyclooxygenase 2 contributes to aberrant renin production in connexin 40-deficient kidneys. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R1781-1786.

Wagner Charlotte, de Wit Cor, Kurtz Lisa, Grünberger Christian, Kurtz Armin, and Schweda Frank (2007). Connexin40 Is Essential for the Pressure Control of Renin Synthesis and Secretion. *Circulation Research* 100, 556–563.

92. Waitkus MS, Harris DP, DiCorleto PE. Mechanisms of Endothelial Activation. In: Mackay IR, Rose NR, Diamond B, Davidson A, éditeurs. *Encyclopedia of Medical Immunology: Autoimmune Diseases*. New York, NY: Springer; 2014 p. 715-24.

Wang, H., da Silva, J., Alencar, A., Zapata-Sudo, G., Lin, M.R., Sun, X., Ahmad, S., Ferrario, C.M., and Groban, L. (2016a). Mast Cell Inhibition Attenuates Cardiac Remodeling and

- Diastolic Dysfunction in Middle-aged, Ovariectomized Fischer 344 × Brown Norway Rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 68, 49–57.
- Wang, H., da Silva, J., Alencar, A., Zapata-Sudo, G., Lin, M.R., Sun, X., Ahmad, S., Ferrario, C.M., and Groban, L. (2016b). Mast Cell Inhibition Attenuates Cardiac Remodeling and Diastolic Dysfunction in Middle-aged, Ovariectomized Fischer 344 × Brown Norway Rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 68, 49–57.
- Wang, Y., McMahon, A.P., and Allen, B.L. (2007). Shifting paradigms in Hedgehog signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 159–165.
- Wang, Y., Zhang, A.C., Ni, Z., Herrera, A., and Walcheck, B. (2010). ADAM17 activity and other mechanisms of soluble L-selectin production during death receptor-induced leukocyte apoptosis. *J Immunol* 184, 4447–4454.
- Wang, Y., Jin, S., Sonobe, Y., Cheng, Y., Horiuchi, H., Parajuli, B., Kawanokuchi, J., Mizuno, T., Takeuchi, H., and Suzumura, A. (2014). Interleukin-1 β induces blood-brain barrier disruption by downregulating Sonic hedgehog in astrocytes. *PLoS ONE* 9, e110024.
- Watkins, D.N., Berman, D.M., Burkholder, S.G., Wang, B., Beachy, P.A., and Baylin, S.B. (2003a). Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 422, 313–317.
- Watkins, D.N., Berman, D.M., and Baylin, S.B. (2003b). Hedgehog signaling: progenitor phenotype in small-cell lung cancer. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 2, 195–197.
- Wen, L.P., Fahrni, J.A., Matsui, S., and Rosen, G.D. (1996). Airway epithelial cells produce stem cell factor. *Biochim Biophys Acta* 1314, 183–186.
- Weng, Z.C., Nicolosi, A.C., Detwiler, P.W., Hsu, D.T., Schierman, S.W., Goldstein, A.H., and Spotnitz, H.M. (1992). Effects of crystalloid, blood, and University of Wisconsin perfusates on weight, water content, and left ventricular compliance in an edema-prone, isolated porcine heart model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 103, 504–513.
- Wernersson, S., and Pejler, G. (2014). Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 478–494.
- Weskamp, G., Mendelson, K., Swendeman, S., Le Gall, S., Ma, Y., Lyman, S., Hinoki, A., Eguchi, S., Guaiquil, V., Horiuchi, K., et al. (2010). Pathological neovascularization is reduced by inactivation of ADAM17 in endothelial cells, but not in pericytes. *Circ Res* 106, 932–940.
- 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.
- Wolters, P.J., Laig-Webster, M., and Caughey, G.H. (2000). Dipeptidyl peptidase I cleaves matrix-associated proteins and is expressed mainly by mast cells in normal dog airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22, 183–190.

- Wong, C., and Marwick, T.H. (2007). Obesity cardiomyopathy: pathogenesis and pathophysiology. *Nat Rev Cardiol* 4, 436–443.
- Wong, E., Maretzky, T., Peleg, Y., Blobel, C.P., and Sagi, I. (2015). The Functional Maturation of A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) 9, 10, and 17 Requires Processing at a Newly Identified Proprotein Convertase (PC) Cleavage Site. *J. Biol. Chem.* 290, 12135–12146.
- Wong, E., Cohen, T., Romi, E., Levin, M., Peleg, Y., Arad, U., Yaron, A., Milla, M.E., and Sagi, I. (2016). Harnessing the natural inhibitory domain to control TNF α Converting Enzyme (TACE) activity in vivo. *Sci Rep* 6, 1–12.
- Worley, J.R., Hughes, D.A., Dozio, N., Gavrilovic, J., and Sampson, M.J. (2007). Low density lipoprotein from patients with Type 2 diabetes increases expression of monocyte matrix metalloproteinase and ADAM metalloproteinase genes. *Cardiovasc Diabetol* 6, 21.
- Wu, Y., Tang, D., Liu, N., Xiong, W., Huang, H., Li, Y., Ma, Z., Zhao, H., Chen, P., Qi, X., et al. (2017). Reciprocal Regulation between the Circadian Clock and Hypoxia Signaling at the Genome Level in Mammals. *Cell Metabolism* 25, 73–85.
- Xing, W., Austen, K.F., Gurish, M.F., and Jones, T.G. (2011). Protease phenotype of constitutive connective tissue and of induced mucosal mast cells in mice is regulated by the tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 14210–14215.
- Xu, P., and Derynck, R. (2010). Direct Activation of TACE-Mediated Ectodomain Shedding by p38 MAP Kinase Regulates EGF Receptor-Dependent Cell Proliferation. *Molecular Cell* 37, 551–566.
- Xu, P., Liu, J., Sakaki-Yumoto, M., and Derynck, R. (2012). TACE Activation by MAPK-Mediated Regulation of Cell Surface Dimerization and TIMP3 Association. *Sci. Signal.* 5, ra34–ra34.
- Xu, Z., Wang, T., Guo, X., Li, Y., Hu, Y., Ma, C., and Wang, J. (2018a). The Relationship of Serum Antigen-Specific and Total Immunoglobulin E with Adult Cardiovascular Diseases. *Int. J. Med. Sci.* 15, 1098–1104.
- Xu, Z., Wang, T., Guo, X., Li, Y., Hu, Y., Ma, C., and Wang, J. (2018b). The Relationship of Serum Antigen-Specific and Total Immunoglobulin E with Adult Cardiovascular Diseases. *Int J Med Sci* 15, 1098–1104.
- Y, K., and M, K. (2005). Hedgehog signaling pathway and gastric cancer. *Cancer Biol Ther* 4, 1050–1054.
- Yang, H., Xiang, J., Wang, N., Zhao, Y., Hyman, J., Li, S., Jiang, J., Chen, J.K., Yang, Z., and Lin, S. (2009). Converse conformational control of smoothed activity by structurally related small molecules. *J. Biol. Chem.* 284, 20876–20884.
- Yang, Y., Li, Q., Deng, Z., Zhang, Z., Xu, J., Qian, G., and Wang, G. (2011). Protection from lipopolysaccharide-induced pulmonary microvascular endothelial cell injury by activation of hedgehog signaling pathway. *Mol. Biol. Rep.* 38, 3615–3622.

- Yauch, R.L., Gould, S.E., Scales, S.J., Tang, T., Tian, H., Ahn, C.P., Marshall, D., Fu, L., Januario, T., Kallop, D., et al. (2008). A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* 455, 406–410.
- Ying, X., Lee, K., Li, N., Corbett, D., Mendoza, L., and Frangogiannis, N.G. (2009). Characterization of the Inflammatory and Fibrotic Response in a Mouse Model of Cardiac Pressure Overload. *Histochem Cell Biol* 131, 471–481.
- Yoda, M., Kimura, T., Tohmonda, T., Morioka, H., Matsumoto, M., Okada, Y., Toyama, Y., and Horiuchi, K. (2013). Systemic Overexpression of TNF α -converting Enzyme Does Not Lead to Enhanced Shedding Activity In Vivo. *PLOS ONE* 8, e54412.
- Yoon, J.W., Kita, Y., Frank, D.J., Majewski, R.R., Konicek, B.A., Nobrega, M.A., Jacob, H., Walterhouse, D., and Iannaccone, P. (2002). Gene expression profiling leads to identification of GLI1-binding elements in target genes and a role for multiple downstream pathways in GLI1-induced cell transformation. *J. Biol. Chem.* 277, 5548–5555.
- 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.
- Zhang, Q., Thomas, S.M., Lui, V.W.Y., Xi, S., Siegfried, J.M., Fan, H., Smithgall, T.E., Mills, G.B., and Grandis, J.R. (2006). Phosphorylation of TNF-alpha converting enzyme by gastrin-releasing peptide induces amphiregulin release and EGF receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 6901–6906.
- Zhao, W., Zhao, T., Chen, Y., Ahokas, R.A., and Sun, Y. (2008). Oxidative stress mediates cardiac fibrosis by enhancing transforming growth factor-beta1 in hypertensive rats. *Mol. Cell. Biochem.* 317, 43–50.
- Zheng, Y., Schlondorff, J., and Blobel, C.P. (2002). Evidence for regulation of the tumor necrosis factor alpha-convertase (TACE) by protein-tyrosine phosphatase PTPH1. *J. Biol. Chem.* 277, 42463–42470.
- Zhu, H., Carpenter, R.L., Han, W., and Lo, H.-W. (2014). The GLI1 splice variant TGLI1 promotes glioblastoma angiogenesis and growth. *Cancer Lett.* 343, 51–61.
- Zile, M.R., Baicu, C.F., and Gaasch, W.H. (2004). Diastolic Heart Failure — Abnormalities in Active Relaxation and Passive Stiffness of the Left Ventricle. *New England Journal of Medicine* 350, 1953–1959.
- Zinman, B., Wanner, C., Lachin, J.M., Fitchett, D., Bluhmki, E., Hantel, S., Mattheus, M., Devins, T., Johansen, O.E., Woerle, H.J., et al. (2015). Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 373, 2117–2128.

Liste des publications, Présentations orales, posters et prix

Publications

Guimbal S., Cornuault L., Hollier P.L., Chapouly C., Bats M.L., Gadeau A.P., Couffinhal T. and Renault M.A (2020) "*Mast cells are the trigger of small vessel disease and diastolic dysfunction in diabetic obese mice*", (accepté, [ATVB](#))

Mora P.*, Hollier P.L.*, **Guimbal S.***, Diop A., Cornuault L., Couffinhal T., Gadeau A.P., Renault M.A. and Chapouly C. (2020) "*Genetic disruption of the Blood Brain Barrier leads to protective barrier formation at the Glia Limitans*" (accepté, [PLOS Biology](#)).

* These authors contributed equally to this work

Hollier P.L.*, Chapouly C.*, Diop A., **Guimbal S.**, Cornuault L., Gadeau A.P. and Renault M.A. (2020) "*Full-length dhh and N-terminal shh act as competitive antagonists to regulate angiogenesis and vascular permeability*", [Cardiovasc Res.](#) ; cvaa285.

Chapouly C., Hollier P.L., **Guimbal S.**, Cornuault L., Gadeau A.P. and Renault M.A. (2020) "*Desert Hedgehog-Driven Endothelium Integrity Is Enhanced by Gas1 (Growth Arrest-Specific 1) but Negatively Regulated by Cdon (Cell Adhesion Molecule-Related/Downregulated by Oncogenes)*", [ATVB](#) ; ATVBAHA120314441.

Guimbal S., Guérit D., Morel A., Blangy A. and Vives V. (2019) "*Dock5 is a new regulator of microtubule dynamic instability in osteoclasts*", [Bio. Cell](#) ;111(11):271-283

Chapouly C., **Guimbal S.**, Hollier P.L. and Renault M.A. (2019) "*Role of Hedgehog Signaling in Vasculature Development, Differentiation, and Maintenance*", [Int J Mol Sci](#) ;20(12)

Caradu C., Couffinhal T., Chapouly C., **Guimbal S.**, Hollier P.L., Ducasse E., Bura-Rivière A., Dubois M., Gadeau, A.P. and Renault M.A. (2018), "*Restoring Endothelial Function by Targeting Desert Hedgehog Downstream of Klf2 Improves Critical Limb Ischemia in Adults*" [Circ Res](#) ;123(9):1053-1065

Présentations, Posters et Prix

Guimbal S., Cornuault L., Hollier P.L., Chapouly C., Bats M.L., Gadeau A.P., Couffinhal T. and Renault M.A, "Mast cells participate in the development of diastolic dysfunction in diabetic obese mice", Printemps de la Cardiologie 2020, **Prix poster**.

Guimbal S., Cornuault L., Hollier P.L., Chapouly C., Bats M.L., Gadeau A.P., Couffinhal T. and Renault M.A, "Mast cells participate in the development of diastolic dysfunction in diabetic obese mice", Journée du Département de Sciences et Biologie Médicale 2019, Bordeaux, Présentation orale.

Guimbal S., Couffinhal T., Hollier P.L., Chapouly C., Caradu C., Gadeau A.P. and Renault M.A. (2019). "Leptin receptor deficient female mice as a mouse model of Heart Failure with preserved Ejection Fraction". Nouvelle Société Française d'Athérosclérose, Biarritz, Poster.

Guimbal S., Couffinhal T., Hollier P.L., Chapouly C., Caradu C., Gadeau A.P. and Renault M.A. (2019). "Leptin receptor deficient female mice as a mouse model of Heart Failure with preserved Ejection Fraction". Printemps de la Cardiologie 2019, Lille, Poster.

Guimbal S., Hollier P.L., Caradu C., Reynaud A., Gadeau A.P. and Renault M.A. "Desert Hedgehog promotes endothelium integrity through Smoothed dependent and independent pathways". Printemps de la Cardiologie 2018, Montpellier, Poster.

Résumé

LE RÔLE DE LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE

L'insuffisance cardiaque engendre un décès toutes les 7 minutes en France. Cependant, il n'existe aucun traitement pour l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (ICFep) qui représente aujourd'hui 50% des cas d'insuffisance cardiaque et dont la prévalence augmente constamment avec le vieillissement de la population. Mieux comprendre l'étiologie et la physiopathologie de cette maladie est primordial pour découvrir des thérapies efficaces pour la prise en charge de cette maladie. L'objectif de cette thèse est d'explorer le rôle de la maladie des petits vaisseaux dans la physiopathologie de l'ICFep. Plus précisément, nous nous sommes attachés (1) à mieux caractériser le phénotype des capillaires cardiaques chez des souris présentant une dysfonction diastolique, (2) à caractériser les conséquences d'une dysfonction endothéliale sur la structure et la fonction cardiaque et (3) à mieux appréhender les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'intégrité endothéliale par la voie de signalisation Hedgehog (Hh).

Nous avons démontré pour la première fois dans un modèle physiopathologique d'ICFep que les mastocytes sont des acteurs cruciaux du développement de la maladie des microvaisseaux et de la dysfonction diastolique. Nous avons également établi qu'une dysfonction endothéliale caractérisée principalement par une augmentation de la perméabilité vasculaire peut induire une dysfonction diastolique en absence de tout autre facteur de risque cardiovasculaire. En outre, nous avons démontré que le ligand Desert Hedgehog maintient l'intégrité vasculaire en régulant la dégradation de la métalloprotéase Adam17 dans les cellules endothéliales.

L'ensemble de ces résultats démontrent le rôle crucial de la dysfonction endothéliale dans la physiopathologie de l'ICFep, ainsi que le rôle majeur de Dhh et de la voie de signalisation Hh dans l'intégrité vasculaire notamment dans le cœur.

Mots-clefs : Cardiovasculaire, Insuffisance cardiaque, Dysfonction endothéliale, Signalisation Hedgehog

THE ROLE OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN THE PATHOPHYSIOLOGY OF HEART FAILURE

Heart failure causes one death every 7 minutes in France. Yet, there is no treatment for heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) which represents 50% of heart failure cases and of which prevalence increases constantly with the aging of the population. A better understanding of the etiology and pathophysiology of this disease is primordial to discover efficient therapeutics for its treatment. The objective of this thesis is to explore the role of microvessels disease in the pathophysiology of HFpEF. More precisely, we strive (1) to better characterize the cardiac capillaries phenotype in mice presenting a diastolic dysfunction, (2) to characterize the consequences of an endothelial dysfunction on the cardiac structure and function and (3) to better understand the molecular mechanisms implicated in the regulation of endothelial integrity by the Hedgehog (Hh) signaling pathway.

We demonstrated for the first time in pathophysiological model of HFpEF that mast cells are crucial players in the development of the microvessels disease and diastolic dysfunction. We also established that an endothelial dysfunction mainly characterized by an increased in vascular permeability can induce a diastolic dysfunction, without any cardiovascular risk factor. Furthermore, we showed that Desert Hedgehog ligand maintains vascular integrity by regulating the degradation of the metalloprotease Adam17 in endothelial cells.

Overall, these results show the crucial role of endothelial dysfunction in the pathophysiology of HFpEF, as well as the major role of Dhh and the Hh signaling pathway in the vascular integrity, notably in the heart.

Keywords : Cardiovascular, Heart failure, Endothelial dysfunction, Hedgehog Signalling,

INSERM U1034 – Biologie des maladies cardiovasculaires

1, avenue de Magellan, 33600 Pessac, France