



HAL
open science

Rôle de la dysfonction endothéliale dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

Alice Abelanet

► **To cite this version:**

Alice Abelanet. Rôle de la dysfonction endothéliale dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2021. Français. NNT : 2021BORD0032 . tel-03548230

HAL Id: tel-03548230

<https://theses.hal.science/tel-03548230>

Submitted on 30 Jan 2022

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

École doctorale : Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

**Rôle de la dysfonction endothéliale dans la
physiopathologie de l'insuffisance cardiaque à
fraction d'éjection préservée**

Par Alice ABÉLANET

Sous la direction du Dr Cécile DUPLÀA

Soutenue le 29 Janvier 2021.

Membres du jury :

Mme DERUMEAUX Geneviève Pr Université de Créteil.....Président du jury/rapporteur
Mme GALÉS Céline Dr Université de Toulouse.....Rapporteur
Mme MOREAU Violaine Dr Université de Bordeaux.....Examineur
M. GADEAU Alain Dr Université de Bordeaux.....Membre invité
Mme DUPLÀA Cécile Dr Université de Bordeaux.....Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie le Pr Thierry COUFFINHAL et surtout le Dr Cécile DUPLÀA de m'avoir fait confiance et permis de réaliser cette jolie thèse au sein de l'unité INSERM U1034.

Merci à tous les membres de l'Unité 1034 qui ont participé de près ou de loin à ce travail : Pierre-Louis, Sarah, Candice, Omar, Pascale, Philippe, Marie-Lise, Sylvie C, Carole, Alain, Christelle, Jérôme, Jérémie, Maxime, Jean-Paul, Étienne, Virginie V, Virginie D, Isabelle, Olivier, Chloé, Karin, Ophélie, Soizic, Laurianne, Florian.

Merci à Juliette et Valentin pour leurs résultats de dernière minute.

Merci à Sylvie J. de m'avoir si bien formée en début de thèse.

Merci à mes coloc' de bureau Sébastien et Pauline qui m'auront bien fait rire avec leurs « anecdotes ».

Merci à Marie-Ange pour sa disponibilité.

Merci à Béatrice et Annabelle de leur aide précieuse.

Merci à Emily, Helena et Nabil qui ont su enrichir cette thèse.

Un grand merci à Marion qui a fait un travail exceptionnel sur cette thèse et sans qui la partie histologie serait bien triste.

Merci à Emma d'avoir souffert avec moi pendant la mise en place de la cytométrie en flux.

Merci à Sylvain de m'avoir mis des bâtons dans les roues.

Merci à Cassandre et son mari qui m'ont permis d'aller à mon premier entretien au laboratoire en 2017.

Merci à Laura et Lucas pour les soirées jeux responsablement arrosées...

Merci aux copains qui m'ont soutenu de loin tout au long de cette thèse : Kelly, Aline, Baptiste, Jojow, Robin, Laetitia, Julia, Nathan, Manon. Merci aussi aux copains limougeauds.

Merci à Nari et Cisto pour plus de choses que je ne pourrais en écrire ici.

Merci à ma famille de leur soutien : Stanislas, Eriko, les chouchous, MT et François.

Merci à mes familles adoptives qui me soutiennent depuis tant d'années, les Marchandon, les Jalali et les El Aiba.

Un grand merci à ma maman pour ses corrections et son soutien infallible.

Enfin, merci à Mehdi pour tout.

A mon grand-père, qui serait heureux de savoir que j'ai enfin terminé mes études.

TABLES DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	2
RÉSUMÉ	8
TABLES DES FIGURES	10
LISTE DES ABRÉVIATIONS	14
INTRODUCTION	18
I. La fonction cardiaque	18
A. Généralité : structure cardiaque	18
1. Structure de la paroi.....	18
2. Cellules cardiaques	19
B. Rappel anatomo-physiologique :	21
1. Anatomie interne.....	21
2. L'appareil valvulaire.....	22
3. La vascularisation myocardique	23
4. Le cycle cardiaque	24
5. Le tissu nodal.....	26
6. Activité électrique cardiaque : le couplage excitation-contraction	27
C. Régulation du système cardiovasculaire	29
1. La régulation nerveuse.....	29
2. La régulation humorale.....	34
3. La régulation locale.....	35
II. Insuffisance cardiaque chronique	36
A. Généralités	36
1. Définition.....	36
2. Classification.....	37
B. L'Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée	39
1. Généralités.....	39
2. Facteurs de risques et comorbidités	42
3. Physiopathologie ICFEp : rigidité cardiaque	44
4. Traitements.....	49
III. Rôle de l'endothélium dans l'ICFEp	51
A. Mécanismes de dysfonction endothéliale	51

1. Inflammation	51
2. Stress oxydant.....	53
3. Voie NO.....	55
B. Interaction CE/CM	59
IV. Voie Wnt et maintien de l'intégrité endothéliale.....	62
A. Généralités sur la voie Wnt	63
1. La voie canonique.....	63
2. La voie non-canonique : la Polarité Cellulaire Planaire.....	66
B. Voies Wnt et endothélium	68
1. Perméabilité.....	69
2. Angiogenèse	76
3. Polarité.....	77
C. Ubiquitine ligases et dysfonction endothéliale	78
V. Projet de recherche.....	81
MATÉRIEL ET MÉTHODES	82
Lignées Murines et hébergement :	82
Modèle murin de surexpression de <i>Pdzn3</i> dans les cellules endothéliales	82
Tamoxifène.....	83
Procédures chirurgicales :	84
Mesures hémodynamiques ventriculaires gauche	84
Test de Miles.....	84
Analyses non-invasives :	85
Échocardiographie.....	85
Test de tolérance à l'effort.....	85
Mesures de paramètres physiologiques in vivo :	86
Glycémie.....	86
Poids du corps et du cœur	87
Gravimétrie	87
Numération de Formule Sanguine (NFS).....	87
Biologie moléculaire :	87
Isolement des cellules endothéliales	87
Cytométrie en flux.....	88
Analyse de l'expression génique par RT-PCR quantitative.....	89
Séquençage ARN	93

Analyse protéique par Western Blot.....	93
Histologie :	94
Prélèvement et préparation des tissus	94
Coupes en cryoconservation	94
Coupes en Paraffine.....	95
Anticorps utilisés.....	96
Colorations histologiques	97
Transparisation.....	98
Microscopie électronique :	100
Acquisition d'images et traitement :	102
Analyses statistiques :	102
RÉSULTATS	103
Modèle murin de surexpression constitutive de <i>Pdzn3</i> dans les cellules endothéliales	103
A. Analyse phénotypique	103
1. Expression du transgène.....	103
2. Paramètres morphologiques	104
3. Analyses transcriptomiques	104
4. Évaluation de l'hyperperméabilité <i>in vivo</i>	107
B. Analyses de la fonction cardiaque	108
1. Analyses hémodynamiques et échocardiographiques	108
2. Analyses de biomarqueurs cardiaques	110
3. Évaluations gravimétriques	111
4. Épreuve d'effort.....	111
C. Contexte inflammatoire	115
1. Mesure de la numération de la formule sanguine.....	115
2. Analyse de l'activation endothéliale.....	116
3. Analyse du contenu inflammatoire cardiaque	117
4. Évaluation de la matrice extracellulaire	123
D. Phénotypes cardiomyocytaires	125
1. Analyses morphologiques en histologie	125
2. Analyses transcriptomiques	127
E. Phénotype vasculaire	128
1. Caractérisation du réseau vasculaire.....	129
2. Évaluation de la perméabilité vasculaire	132

3.	Évaluation de l'œdème cardiaque	139
4.	Analyse morphologique du réseau lymphatique	140
F.	Analyse cardiaque chez des sujets jeunes	141
1.	Analyses hémodynamiques et échocardiographiques	141
2.	Évaluation de la perméabilité vasculaire	143
G.	Répercussions d'un régime Western	144
1.	Analyses physiologiques	145
2.	Analyses hémodynamiques et échocardiographiques	146
3.	Mesures de la numération de la formule sanguine	148
4.	Analyse du contenu inflammatoire cardiaque	148
5.	Évaluation de la fibrose	149
6.	Caractérisation du réseau vasculaire	150
7.	Évaluation de la perméabilité vasculaire	150
	Modèle murin <i>Lpr^{db/db}</i>	151
H.	Évaluation de la perméabilité vasculaire	152
	DISCUSSION	154
	BIBLIOGRAPHIE	163

RÉSUMÉ

Titre : Rôle de la dysfonction endothéliale dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

Résumé :

L'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (ICFEp) est une maladie chronique associée à une mortalité élevée. Les patients sont majoritairement des femmes âgées (>65 ans) hypertendues avec une prévalence élevée de comorbidités cardiovasculaires telles que l'obésité, le diabète de type 2, l'hypertension artérielle ou encore la fibrillation atriale. Le diagnostic de l'ICFEp est difficile à établir en raison d'un manque de critères spécifiques et il n'existe pas à ce jour de réel traitement ciblé permettant d'améliorer la qualité de vie, de réduire la mortalité ou la durée d'hospitalisation de ces patients. Malheureusement, les mécanismes moléculaires sous-jacents de cette maladie sont encore mal compris mais un nouveau paradigme a été proposé ces dernières années. Il suggère un rôle central de la dysfonction des cellules endothéliales cardiaques dans l'apparition de l'ICFEp. L'ubiquitine ligase E3 RING PDZRN3, est un médiateur de la voie Wnt non-canonique qui régule la morphogénèse vasculaire ainsi que l'intégrité des cellules endothéliales. Nos travaux ont eu pour objectif d'étudier les conséquences de l'activation de la signalisation endothéliale PDZRN3 sur la fonction cardiaque.

Nous avons généré des souris transgéniques avec une surexpression spécifique de PDZRN3 dans les cellules endothéliales et inducible en post-natal (souris iEC-Pdzrn3). A partir de 3 mois, les souris iEC-Pdzrn3 présentent des paramètres hémodynamiques d'ICFEp avec une élévation significative de la pression diastolique par rapport à leurs contrôles. À 8 mois, les souris iEC-Pdzrn3 ne présentent pas un phénotype cardiaque dit inflammatoire ni de signes de progression de fibrose. Cependant, en plus de signes de dysfonction diastolique, une perméabilité vasculaire accrue mise en évidence par une extravasation vasculaire d'albumine, de fibrinogène et d'immunoglobuline G associée à un œdème cardiaque ont été observés. De plus, la mise sous régime Western a exacerbé le phénotype inflammatoire et fibrotique des souris iEC-Pdzrn3 mais aussi de leurs contrôles sans aggraver le dysfonctionnement diastolique. Enfin, l'exploration cardiaque d'un modèle murin d'ICFEp basé sur les comorbidités obésité et diabète (souris $Lpr^{db/db}$) a révélé une perméabilité vasculaire comparable à celle observée chez les souris iEC-Pdzrn3.

Ces résultats mettent donc en évidence une relation de cause à effet entre le dysfonctionnement vasculaire et la physiopathologie de l'ICFEp.

Mots clés : Insuffisance cardiaque, Microcirculation, Mutants murins génétique gain de fonction, Signalisation Wnt, Perméabilité vasculaire

Title : Role of endothelial dysfunction in the pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction

Abstract :

Heart Failure with Preserved Ejection Fraction (HFpEF) is a chronic disease associated with high mortality which affects predominantly elderly (>65 years) hypertensive women with cardiovascular and non-cardiovascular comorbidities. Unfortunately, molecular mechanisms underlying this disease are poorly understood. A new, but yet untested paradigm, has recently emerged focusing on the crucial role of the vascular bed in the etiology of HFpEF. The E3 ubiquitin ligase, PDZRN3, a mediator of the non-canonical Wnt pathway, was reported to enhance vascular permeability. Our objective is the investigation of the long-term consequences of endothelial PDZRN3 signaling activation on induced-HFpEF pathology.

We have generated triple transgenic mutant mice with post-natal restrictive and inducible endothelial expression of *Pdzrn3* (iEC-*Pdzrn3* mice), as an exploratory in vivo tool. From 3 months, iEC-*Pdzrn3* mice displayed hemodynamic parameters of HFpEF with a significant strong elevation of the end-diastolic pressure compared with their littermates. At 8 months iEC-*Pdzrn3* mice did not exhibit a cardiac inflammatory phenotype or fibrosis progression. However, along with diastolic dysfunction, serious vascular leakage evidenced by albumin, fibrinogen, and immunoglobulin G vascular extravasation together with cardiac edema were observed. Western diet exacerbated inflammatory and fibrotic heart phenotype in both iEC-*Pdzrn3* and littermates mice without worsening diastolic dysfunction. Finally, heart exploration of the murine HFpEF model based on the obesity-diabetic comorbidities (*Lpr^{db/db}* mice) revealed vascular permeability comparable to iEC-*Pdzrn3* mice.

Our findings highlight a causal relationship between vascular dysfunction and HFpEF pathology.

Keywords : Heart failure, Microcirculation, Gain of function mouse mutants, Wnt signaling, Vascular permeability

Unité de recherche :

Inserm U1034, 1 avenue Magellan, 33600 Pessac

TABLES DES FIGURES

Figure 1. Anatomie cardiaque humaine : la paroi cardiaque.	19
Figure 2. Anatomie cardiaque humaine : face antérieure du cœur en coupe frontale.....	22
Figure 3. Anatomie cardiaque humaine : l'appareil valvulaire.	23
Figure 4. Anatomie cardiaque humaine : la vascularisation myocardique.....	24
Figure 5. Diagramme de Wiggers adapté de du livre « Medical Physiology », Elsevier, 2006.....	25
Figure 6. Anatomie cardiaque humaine : représentation schématique du tissu nodal de conduction myocardique.....	27
Figure 7. Schéma du couplage excitation-contraction du cardiomyocyte ventriculaire (adapté de Bers, 2002).....	28
Figure 8. Schéma de l'innervation du cœur par les système sympathique et parasympathique (adapté de Scridon et al., 2018).....	30
Figure 9. Schéma des voies de signalisation couplées aux récepteurs β 1 et β 2-adrénergiques (adapté de Pereira <i>et al.</i> , 2017; Rajagopal and Shenoy, 2018).	32
Figure 10. Schéma des voies de signalisation couplées aux récepteurs β 3-adrénergiques (adapté de Cannavo and Koch, 2017).	33
Figure 11. L'algorithme proposé par l' HFA-PEFF pour le diagnostic de l'ICFEp (adapté de Pieske <i>et al.</i> , 2019).	41
Figure 12. Le score HFA-PEFF (adapté de Pieske <i>et al.</i> , 2019).	42
Figure 13. Rôle de la titine dans la rigidité ventriculaire (adapté de Simmonds et al., 2020).	48
Figure 14. Formation d'espèces réactives de l'oxygène.....	54
Figure 15. Fonctionnement de la eNOS en condition physiologique (eNOS couplée) et lors d'un stress oxydant (eNOS découplée).....	57
Figure 16. Paradigme proposé pour expliquer la physiopathologie de l'ICFEp (adapté de Paulus and Tschöpe, 2013).	58
Figure 17. Les différentes méthodes de communication possibles entre cellules endothéliales et cardiomyocytes.	59
Figure 18. Communications paracrines entre cellules endothéliales et cardiomyocytes et leurs effets sur le système cardiovasculaire (Adapté de Segers et al., 2018 et Talman and Kivelä, 2018). .	62
Figure 19. Schéma classique de la voie Wnt/Fz canonique dite β -caténine-dépendante.	66
Figure 20. Schéma de la voie de signalisation non canonique Wnt/Fz dite PCP.	68
Figure 21. Schéma de jonctions inter-endothéliales impliquées dans la régulation paracellulaire.....	71
Figure 22. Représentation schématique d'organelles vésiculo-vacuolaires (VVO) dans une cellule endothéliale (adapté de Dvorak, 2015).....	74
Figure 23. Illustration de cavéoles endothéliales (adapté de Waschke <i>et al.</i> , 2006; Parton and Simons, 2007).	75
Figure 24. Le système ubiquitine protéasome (adapté de Meyer-Schwesinger, 2019).....	79

Figure 25. Représentation schématique des constructions génétiques des souris iEC-Pdzrn3	83
Figure 26. Calcul de l'aire interstitielle	101
Figure 27. Le gène rapporteur <i>LacZ</i> est exprimé spécifiquement dans les cellules endothéliales cardiaques.....	103
Figure 28. La surexpression de PDZRN3 dans l'endothélium n'entraîne pas de modification de poids du corps ou du cœur.....	104
Figure 29. Analyse en RTqPCR après isolement de cellules endothéliales cardiaques.....	106
Figure 30. La surexpression de PDZRN3 dans l'endothélium entraîne une induction de la perméabilité vasculaire de la peau dorsale des souris en condition VEGF.....	107
Figure 31. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium manifestent des signes de dysfonction diastolique avec une augmentation des pressions télédiastoliques et une fraction d'éjection préservée.....	109
Figure 32. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium ne présentent pas d'autres signes de dysfonction cardiaque après explorations par cathétérisme.....	109
Figure 33. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium ne présentent pas de signes de remodelage myocardique.....	110
Figure 34. L'analyse par RT-qPCR des oreillettes des souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium montrent une augmentation de l'expression de l' <i>ANP</i>	110
Figure 35. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium ne présentent pas de signes d'œdème pulmonaire ou cardiaque par analyse gravimétrique.....	111
Figure 36. Protocole de course sur tapis roulant.....	112
Figure 37. Définition de zones sur le tapis afin de déterminer les comportements de fatigue et d'épuisement des souris pendant l'exercice.....	113
Figure 38. Les souris iEC-Pdzrn3 affichent un temps de course sur tapis roulant réduit par rapport à leurs littermates.....	114
Figure 39. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium ne présentent pas de modification de la numération de la formule sanguine.....	116
Figure 40. La surexpression de <i>Pdzrn3</i> dans l'endothélium ne provoque pas d'augmentation d'expression de molécules d'adhésion.....	117
Figure 41. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium ne présentent pas d'augmentation d'infiltration de macrophages dans le parenchyme cardiaque.....	118
Figure 42. Stratégie de gating pour la cytométrie en flux du contenu inflammatoire cardiaque.....	119
Figure 43. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium ne présentent pas d'augmentation de l'infiltration de cellules inflammatoires dans le parenchyme cardiaque.....	120
Figure 44. Stratégie de gating pour la cytométrie en flux du type de macrophages cardiaque.....	122
Figure 45. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium ne présentent pas de déséquilibre des types de macrophages présents dans le parenchyme cardiaque.....	123
Figure 46. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium ne présentent pas d'augmentation de la fibrose périvasculaire ou de remodelage de la matrice extracellulaire.....	124

Figure 47. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium affichent une légère augmentation de la taille des cardiomyocytes.	125
Figure 48. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium ne présentent pas d'anomalie structurelle dans l'organisation et l'architecture des cardiomyocytes.	126
Figure 49. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium ne présentent de modifications de la taille des jonctions cardiomyocytaires structurelles.....	127
Figure 50. L'analyse par RT-qPCR de biopsies cardiaques des souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium ne montre pas de différence d'expression des marqueurs cardiomyocytaires étudiés.....	128
Figure 51. La surexpression de PDZRN3 dans l'endothélium n'entraîne pas de modification de vascularisation cardiaque.....	129
Figure 52. La surexpression de PDZRN3 dans l'endothélium n'entraîne pas de modification des paramètres architecturaux du réseau capillaire coronaire.	131
Figure 53. La surexpression de PDZRN3 dans l'endothélium n'entraîne pas de modification dans la localisation ou la surface de la VE-Cadhérine.	132
Figure 54. La surexpression de Pdzn3 dans l'endothélium entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire à l'albumine	133
Figure 55. La surexpression de Pdzn3 dans l'endothélium entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire aux IgG.....	134
Figure 56. La surexpression de Pdzn3 dans l'endothélium entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire au fibrinogène.....	134
Figure 57. Les souris qui surexpriment Pdzn3 dans l'endothélium présentent une fragilité des vaisseaux	135
Figure 58. La surexpression de Pdzn3 dans l'endothélium n'entraîne de perte péricytaire.	136
Figure 59. Les souris iEC-Pdzn3 ne présentent pas de différence vésiculaire au niveau de la paroi de leurs vaisseaux.	137
Figure 60. Les souris iEC-Pdzn3 présentent une diminution de l'expression de marqueurs de la MEC.	138
Figure 61. Les souris iEC-Pdzn3 présentent une augmentation de l'espace interstitiel.....	140
Figure 62 : Les souris iEC-Pdzn3 présentent un volume lymphatique comparable à celui des littermates.....	141
Figure 63 : Les souris iEC-Pdzn3 manifestent des signes de dysfonction diastolique dès l'âge de 3 mois.....	142
Figure 64 : Les souris iEC-Pdzn3 âgées de 3 mois ne présentent pas d'autres signes de dysfonction cardiaque après exploration par cathétérisme.	142
Figure 65 : Les souris iEC-Pdzn3 ne présentent pas de signes de remodelage myocardique à l'âge de 3 mois.....	143
Figure 66 : La surexpression de Pdzn3 dans l'endothélium entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire au fibrinogène dès 3 mois d'âge.	143

Figure 67. Le régime western ne provoque pas de diabète ni de modification de poids du corps ou du cœur chez les souris iEC-Pdzrn3 et leurs littermates.	145
Figure 68. Les souris iEC-Pdzrn3 nourries au régime western manifestent des signes de dysfonction diastolique comparées à leurs littermates soumises au même régime.....	146
Figure 69. Les souris iEC-Pdzrn3 nourries au régime western ne présentent pas d'autres signes de dysfonction cardiaque après explorations par cathétérisme comparées à leurs littermates soumises au même régime.	147
Figure 70. Les souris iEC-Pdzrn3 nourries au régime western ne présentent pas de signes de remodelage myocardique comparées à leurs littermates soumises au même régime.	147
Figure 71. Les souris iEC-Pdzrn3 nourries au régime western ne présentent pas de modification de la numération de la formule sanguine comparées à leurs littermates soumises au même régime.	148
Figure 72. Les souris iEC-Pdzrn3 nourries au régime western présentent une augmentation du nombre de macrophages dans le parenchyme cardiaque comparées à leurs littermates soumises au même régime.	149
Figure 73. Les souris iEC-Pdzrn3 nourries au régime western ne présentent pas d'augmentation de la fibrose périvasculaire ou de remodelage de la matrice extracellulaire comparées à leurs littermates soumises au même régime.	149
Figure 74. Les souris iEC-Pdzrn3 nourries au régime western ne présentent pas de modification de la vascularisation cardiaque comparées à leurs littermates soumises au même régime.	150
Figure 75. Les souris iEC-Pdzrn3 nourries au régime western présentent une augmentation de la perméabilité vasculaire au fibrinogène comparé à leurs littermates soumises au même régime.	151
Figure 76. Les souris Lepr ^{db/db} présentent une augmentation de la perméabilité vasculaire à l'albumine et aux IgG.....	153

Toutes les illustrations ont été réalisées grâce à **BioRender.com**.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC : Adénylate cyclase
ACC/AHA : *American College of Cardiology/American Heart Association*
Akt : Protéine kinase B
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
Ang II : Angiotensine II
Ang1 : Angiopoïétine-1
Angpt2 : Angiopoïétine 2
ANP : Atrial natriuretic peptide
APC : *Adenomatous Polypisus Coli*
ATP : Adénosine triphosphate
BH4 : Tétrahydrobioptérine
BHE : Barrière Hémato-Encéphalique
BIC : Bordeaux Imaging Center
BNP : *Brain Natriuretic Peptide* ou peptide natriurétique de type B
BPM : Battement par minutes
Ca²⁺ : Ion calcium
Cdh5 : Cadhérine 5
CamKII : Calmoduline kinase II
CAV : Cavéoline
Cav1.2 : Canaux calciques de type L
CD31 : PECAM
CE : Cellules endothéliales
CK1 α : Caséine kinase 1 α
CM : Cardiomyocytes
Col1a1 : Chaîne de collagène alpha 1 de type I
Col3a1 : Chaîne de collagène alpha 1 de type I
CPC : Cellules progénitrices cardiaques
CRP : *C-reactive protein* ou protéine C-réactive
Cu²⁺ : Ion cuivre
Cx43 : Connexine 43
DEP : Dishevelled, Egl-10, Pleckstrin Domain
DIC : Domaine inhibiteur de la β -caténine
DIX : *Dishevelled, aXin*
DUB : *Deubiquitinating enzyme* ou enzyme de dé-ubiquitination
Dvl : *Disheveled*
ERO : Espèces réactives de l'oxygène
ESC : *European Society of Cardiology* ou Société Européenne de Cardiologie
ET-1 : Endothéline-1
ET_A : Récepteurs à l'endothéline A
ET_B : Récepteurs à l'endothéline B
FC : Forces de cisaillement

FE : Fraction d'éjection
Fe²⁺ : Ion fer II
FPM : *Fragment Per Kilobase per Million*
Fz : Frizzled
GAP : Protéines activatrices des GTPase
GCs : Guanylate Cyclase soluble
GEF : Facteurs d'échange de nucléotides guanines
Gi : Protéines G inhibitrices
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
GR : Globule Rouge
GRK : Protéines kinase des récepteurs couplés aux protéines G
Gs : Protéine G stimulatrice
GSH : Glutathion
GSK3β : Glycogène synthase kinase 3 β
GTP : Guanosine triphosphate
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HAD : Hormone antidiurétique
HECT : *Homologus to the E6-AP Carboxyl Terminus*
HFA : *Heart Failure Association*
hPSC : Cellules souches pluripotentes humaines
HRP : Peroxydase de raifort
HTA : Hypertension artérielle
IC : Insuffisance cardiaque
ICAM-1 : *InterCellular Adhesion Molecule*
ICC : Insuffisance cardiaque chronique
ICFEi : Insuffisance cardiaque intermédiaire
ICFEp : Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée
ICFEr : Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite
IgG : Immunoglobuline G
IMC : Indice de masse corporelle
IP : Intra-péritonéale
IRM : Imagerie par résonance magnétique
JAM : *Junction Adhesion Molecules*
JNK : *c-Jun N-terminal kinase*
K⁺ : Potassium
LEC : *Lymphatic endothelial cells* ou cellules endothéliales lymphatiques
LEF : *Lymphoid Enhancer binding Factor*
LOX : Enzyme Lysyl-oxydase
LRP : *Low-density lipoprotein receptor-related protein*
MCV : Maladies cardiovasculaires
MEC : Matrice extracellulaire
Mef2C : *Myocyte Enhancer Factor 2C*
MeOH : Methanol
MFSD2a : *Major Facilitator Superfamily Domain-containing 2a*

MI : Infarctus du myocarde
min dP/dt : Vitesse de relaxation cardiaque
MMP : Métalloprotéinase matricielle
MTOC : Centres d'organisation des microtubules
MUPP1 : *Multi PDZ domain protein*
Na⁺ : Sodium
NCX : *Na⁺/Ca²⁺ exchanger* ou échangeur sodium/calcium
NFS : Numération de Formule Sanguine
NO : Monoxyde d'azote
NOS : Nitric oxide synthase
eNOS : Nitric oxide synthase endothéliale
iNOS : Nitric oxide synthase inductible
nNOS : Nitric oxide synthase neuronale
NOX : *NADPH OXydase* ou oxydase du NADPH
NRG1 : Neuréguline-1
NYHA : *New York Heart Association*
O₂ : Oxygène
O₂⁻ : Anion superoxyde
OH[•] : Radical hydroxyle
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ONOO⁻ : Anion peroxydite
PA : Potentiel d'action
Pals1 : Protéine associée à Lin sept
PATJ : Protéine de jonction associée à PALS-1
PCP : Polarité Cellulaire planaire
PDE : PhosphoDiEstérase
PDGFB : Facteur de croissance dérivé des plaquettes B
PDZ : *Post synaptic density, Drosophila disc large tumor suppressor, Zona occludens*
MAGUK : *Membrane Associated GUanylate Kinases*
PDZRN3 : *PDZ Domain containing ring finger 3*
PECAM : *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*
PI3K : *Phosphatidyl Inositol 3-Kinase*
PKA : Protéine kinase A
PKC : PhosphoKinase C
PKG : Protéine kinase GMPc dépendante
Pin : Phospholamban
PMCA : Pompe calcique de la membrane plasmique
PNA : Peptide natriurétique auriculaire
PVLAP : *Plasmalemma Vesicle Associated protein*
RBR : *RING-in-Between-RING*
RING : *Really Interesting New Gene*
ROCK : *Rho-associated kinase*
ROS : *Reactive Oxygen Species* ou espèces réactives de l'oxygène

RS : Reticulum sarcoplasmique
RyR2 : *Ryanodine Receptor type 2* ou récepteur à la Ryanodine de type 2
SERCA2a : Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase ou pompe calcique APTasique du reticulum sarcoplasmique
SNV : Système Nerveux Végétatif
SOD : Superoxyde Dismutases
SRAA : Système Rénine Angiotensine-Aldostérone
Tau : Constante de temps de la relaxation isovolumique
TCF : *T-Cell Factor*
TEM : *Transmission Electron Microscopy* ou microscope électronique à transmission
TGF-β : Transforming Growth Factor-beta ou facteur de croissance transformant-β
TIMPS : *Tissue Inhibitor of MetalloProteinases* ou inhibiteur tissulaire des metalloproteases
TJ : *Tight Junction* ou jonctions serrées
tTa : Tétracycline
UBC : *Ubiquitin-conjugating enzyme* ou enzyme de conjugaison d'ubiquitine
VCAM-1 : *Vascular cell adhesion molecule 1*
VECAD : *Vascular Endothelial Cadherin*
VEGF : Facteur de croissance endothélial vasculaire
VES : Volume sanguin systolique
VG : Ventricule gauche
VVO : *Vesiculo-vacuolar organelle* ou organelle vésiculo-vacuolaire
Wnt : *Wignless Int-1*
ZN²⁺ : Ion zinc
ZO1 : *Zona Occludens-1*

INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la cause principale de mortalité et de morbidité en Europe avec plus de 3,9 millions de décès par an selon l'European Cardiovascular Disease Statistics 2017 (CVD 2017). Depuis plus de 10 ans, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) organise une lutte contre les MCV à l'aide de campagnes de prévention. Celles-ci visent à réduire efficacement de nombreux facteurs de risque dont les principaux sont le tabagisme, la sédentarité, l'obésité, le diabète, la consommation d'alcool ou encore l'hypertension.

Une diminution de la mortalité cardiovasculaire a été observée dans les pays européens ces dernières années (Franzin-Garrec, 2013), probablement liée à la réduction de facteurs de risque clés comme la consommation de tabac et d'alcool ou le niveau de cholestérol sanguin moyen (CVD 2017). Néanmoins, une augmentation concomitante de la prévalence du surpoids/obésité et du diabète observée depuis des décennies (Khatibzadeh *et al.*, 2013) est à l'origine de doutes concernant la pérennité de cette réduction de mortalité.

I. La fonction cardiaque

A. Généralité : structure cardiaque

1. Structure de la paroi

La structure de la paroi cardiaque est composée de trois tuniques (**FIGURE 1**). Elles sont appelées l'endocarde, le myocarde et le péricarde (de la plus interne à la plus externe).

L'endocarde est une fine membrane endothéliale recouvrant la face interne des cavités cardiaques, des valves et des piliers et se prolonge par l'intima des gros vaisseaux. Son rôle principal est d'éviter la coagulation du sang au contact de la paroi cardiaque.

Le myocarde constitue le muscle cardiaque régulé par les systèmes sympathiques et parasympathiques. Il est plus ou moins épais en fonction des cavités : massif au niveau ventriculaire (en particulier celui de gauche) et mince au niveau auriculaire.

Enfin, le péricarde est une enveloppe à double paroi recouvrant la face externe du myocarde. Le péricarde fibreux constitue l'enveloppe la plus externe, elle est composée de tissu conjonctif permettant la réduction des frottements du cœur avec les structures adjacentes. Le péricarde séreux, plus interne, comporte deux feuillets : une lame pariétale qui tapisse la face interne du péricarde fibreux et une lame viscérale qui enveloppe le myocarde. Ces deux feuillets sont séparés par une cavité péricardique leur permettant des mouvements de glissement essentiels aux phases de contraction et de relaxation du cœur.

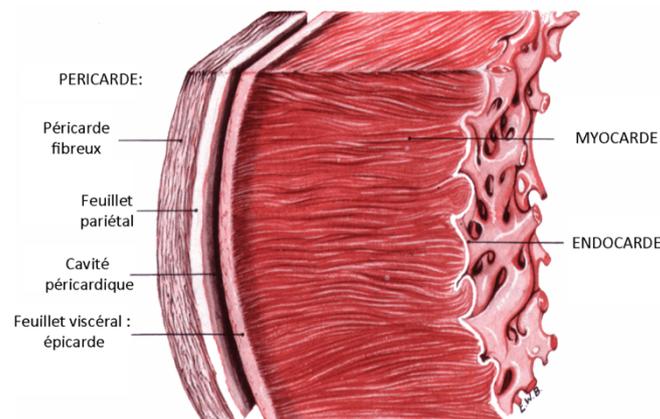


Figure 1. Anatomie cardiaque humaine : la paroi cardiaque.

2. Cellules cardiaques

Le cœur adulte est composé de nombreux types cellulaires dont les cardiomyocytes (CM), les cellules endothéliales et les fibroblastes. Paradoxalement, même si les cardiomyocytes occupent environ 70 à 85% du volume cardiaque, ils ne représentent pas le type cellulaire majoritaire (seulement 30-40% chez le mammifère) (Anversa *et al.*, 1980; Tang *et al.*, 2009; Zhou and Pu, 2016).

Les cardiomyocytes sont de grandes cellules musculaires qui constituent l'origine de la contractilité cardiaque. Ces cellules polarisées sont généralement mononuclées et leurs cytoplasmes organisés en sarcomère sont responsables de leur apparence

striée (Walker and Spinale, 1999). Les cardiomyocytes sont interconnectés par des jonctions spécialisées appelées disques intercalaires (Breemen, 1953). Parmi elles, les desmosomes assurent la cohésion et évitent le détachement des cellules des unes aux autres via les filaments intermédiaires (Green and Simpson, 2007). Les jonctions communicantes (gap junction) permettent, quant à elles, la communication intercellulaire mais également la diffusion de potentiels d'action (Mezzano, Pellman and Sheikh, 2014). Enfin, les jonctions adhérentes, qui interagissent avec les myofibrilles, permettent la transmission de la force contractile d'un myocyte à l'autre (Luo and Radice, 2003).

Les cellules non-myocytes, représentent une fraction de volume cardiaque relativement faible mais occupent néanmoins des fonctions essentielles au sein de l'homéostasie cardiaque.

Les cellules endothéliales (CE) sont de petites cellules aplaties avec un noyau fusiforme qui tapissent la face interne des vaisseaux sanguins et lymphatiques. A l'interface entre les éléments figurés du sang et la paroi vasculaire, elles régulent le trafic macromoléculaire et l'oxygénation du parenchyme cardiaque. Au sein des capillaires cardiaques, les cellules endothéliales sont interconnectées entre-elles par des complexes jonctionnels (comprenant des jonction adhérentes, serrées et communicantes) et sont entourées d'une membrane basale continue (Aird, 2007). Les cellules endothéliales ont originellement été décrites comme des régulateurs majeurs de la fluidité sanguine mais de plus en plus de données montrent aussi leur implication dans l'homéostasie du myocarde. Elles sont en effet capables de produire des facteurs vasoactifs, des substances pro- et anticoagulantes ainsi que des facteurs pro- et anti-inflammatoires capables de moduler la fonction cardiaque.

Des précisions supplémentaires seront apportées à cette brève description de la cellule endothéliale dans la partie traitant du rôle de l'endothélium dans l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

Les fibroblastes sont des cellules peu différenciées. Elles participent à la production des composant structuraux du cœur et renouvellent le collagène de la matrice extracellulaire (Snider *et al.*, 2009). Le rôle des fibroblastes dans la physiologie cardiaque reste néanmoins très peu connu car leur fonction a été fortement étudiée en condition pathologique. En effet, en réponse à une lésion, ces cellules participent

à la cicatrisation en produisant les composants de la matrice extracellulaire après avoir été stimulées par du TGF β (Lijnen, Petrov and Fagard, 2000). Ces cellules dites « activées » se transdifférencient de manière réversible en myofibroblastes, responsables du remodelage tissulaire (Sarrazy *et al.*, 2011). Les myofibroblastes sont facilement identifiables par leur morphologie caractéristique par rapport aux fibroblastes : elles possèdent des noyaux dentelés, une augmentation de la taille du cytoplasme, des faisceaux de microfilaments et un réticulum endoplasmique bien défini (Gabbiani, Ryan and Majne, 1971).

En condition physiologique, cette différenciation en myofibroblastes n'est pas irréversible et ces derniers peuvent se différencier en fibroblastes au repos (Kanisicak *et al.*, 2016). Cependant, dans des situations morbides, comme entre autre l'inflammation chronique, les myofibroblastes demeurent et continuent de produire de façon excessive de la matrice extracellulaire (Weber *et al.*, 2013). Ce processus de remodelage pathologique, appelé fibrose, perturbe l'homéostasie et le fonctionnement cardiaque.

B. Rappel anatomo-physiologique :

Le cœur est un organe musculaire assurant l'acheminement du sang à travers l'organisme par ses contractions rythmiques et coordonnées. La circulation sanguine est en série et unilatérale et permet le transport et l'échange de nombreuses substances biochimiques, notamment de nutriments, de dioxygène et d'hormones essentielles aux besoins des cellules de l'organisme. La circulation pulmonaire, ou petite circulation, permet le renouvellement des gaz du sang par les alvéoles pulmonaires. La circulation systémique, ou grande circulation, permet l'adressage du sang oxygéné du cœur aux organes périphériques.

1. Anatomie interne

Le cœur est un organe creux dont l'espace interne est fractionné en quatre cavités par des cloisons verticales et horizontales (**FIGURE 2**). Ces cavités sont les oreillettes (cavités supérieures) et les ventricules (cavités inférieures) qui

communiquent par les orifices auriculo-ventriculaires. Le septum interventriculaire sépare l'organe en deux pompes propulsives distinctes fonctionnant parallèlement : le cœur gauche et le cœur droit. Le cœur droit, qui assure la circulation pulmonaire, est composé d'une oreillette et d'un ventricule dits droit, reliés l'un à l'autre par l'orifice tricuspide. Le cœur gauche, qui assure la circulation systémique est quant à lui composé d'une oreillette et d'un ventricule gauches (VG), dont l'orifice mitral assure la communication. Il n'existe pas physiologiquement de communication directe entre les deux côtés du cœur.

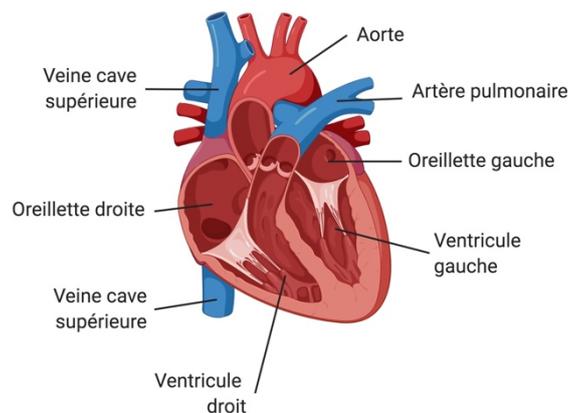


Figure 2. Anatomie cardiaque humaine : face antérieure du cœur en coupe frontale.

2. L'appareil valvulaire

Un système de valves cardiaques empêche le reflux sanguin en amont et favorise une circulation sanguine coordonnée pendant le cycle cardiaque. Les valves se situent à l'embouchure de chacune des quatre cavités cardiaques. Il existe la valve pulmonaire, la valve tricuspide, la valve aortique ainsi que la valve mitrale (**FIGURE 3**). Ce sont des structures de tissu conjonctif élastique, non musculaires, sans innervation ni irrigation sanguine. Elles sont ancrées au niveau du squelette fibreux et restent stationnaires aux mouvements dynamiques du myocarde. En position fermée, leur jointure est continente, empêchant le passage du sang dans le sens inverse de la circulation.

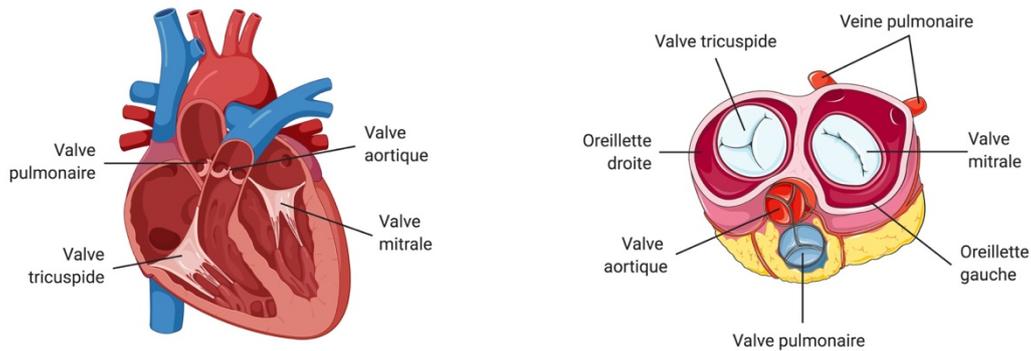


Figure 3. Anatomie cardiaque humaine : l'appareil valvulaire.

3. La vascularisation myocardique

La vascularisation des différents organes du corps humain est assurée par un réseau d'artères et de veines. Ces vaisseaux sanguins forment un circuit fermé qui commence et se termine au cœur. Le sang veineux arrive depuis les organes périphériques via la veine cave pour se déverser dans le cœur droit par le biais de l'oreillette puis du ventricule droit. Ce dernier éjecte le sang appauvri en oxygène vers les capillaires pulmonaires via l'artère pulmonaire où se feront les échanges gazeux. Après oxygénation, le sang se jette dans l'oreillette gauche par l'intermédiaire des veines pulmonaires. Il finit sa course dans le ventricule gauche, depuis lequel il est éjecté dans l'aorte et adressé aux organes périphériques.

Le cœur est lui-même alimenté en nutriment et en oxygène par des ramifications artérielles : l'artère coronaire droite alimente la partie droite du cœur. Elle se ramifie dans l'artère descendante postérieure, afin d'alimenter la partie inférieure du ventricule gauche et l'arrière du septum. L'artère coronaire principale gauche se ramifie en deux branches, une branche latérale (l'artère circonflexe) et une branche antérieure (l'artère interventriculaire antérieure). L'artère circonflexe fournit du sang à l'oreillette gauche et à la partie postérieure du ventriculaire gauche. L'artère descendante antérieure alimente la face antérieure et inférieure du ventricule gauche et l'avant du septum (FIGURE 4).

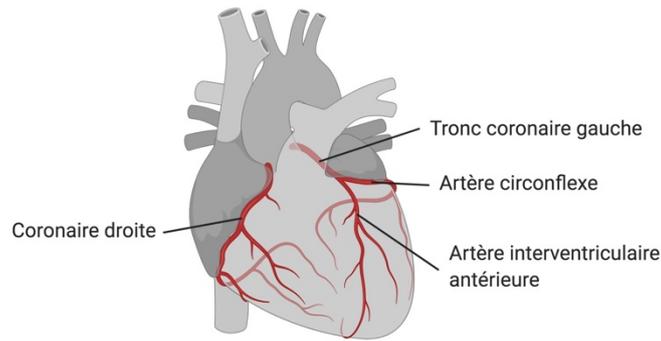


Figure 4. Anatomie cardiaque humaine : la vascularisation myocardique.

4. Le cycle cardiaque

La perfusion des tissus est assurée par la contraction et la relaxation autonome du cœur. Un cycle cardiaque est décomposé en cinq temps par l'alternance de phases de systole (phase de contraction/éjection) et des phases de diastole (phase de relaxation/remplissage rapide et lent) (FIGURE 5).

La première phase est la contraction iso-volumique. Pendant celle-ci, les ventricules mis en tension entraînent une compression sanguine aboutissant à l'augmentation des pressions intra-ventriculaires. Ces pressions dépasseront rapidement celles des oreillettes et déclenchera la fermeture des valves auriculo-ventriculaires empêchant ainsi tout reflux sanguin. A ce stade, la pression ventriculaire est inférieure à la pression artérielle, le sang reste donc confiné à l'intérieur du cœur.

La deuxième phase est l'éjection systolique. Elle commence au moment où la pression ventriculaire dépasse celle de l'aorte ou de l'artère pulmonaire. Ce différentiel déclenche l'ouverture des valves pulmonaires et aortiques et l'éjection du sang vers la petite et la grande circulation. Tant que la pression ventriculaire est supérieure à la pression artérielle, les ventricules se vident. Le volume d'éjection systolique (VES) correspond au volume de sang éjecté à chaque contraction et ne constitue qu'entre les deux-tiers et la moitié du volume télédiastolique total (volume sanguin en fin de diastole).

Par la suite, survient la phase de relaxation iso-volumétrique. Une fois le sang éjecté, la pression des ventricules décroît rapidement et devient inférieure à la pression des artères ce qui provoque la fermeture des valves aortiques et pulmonaires. Cette baisse de pression dépend de la capacité du ventricule à se relâcher : plus sa compliance est élevée, plus la pression diminue rapidement. Le sang est, pendant un court laps de temps, contraint à l'immobilité, du fait d'une pression ventriculaire trop importante pour permettre l'ouverture des valves auriculo-ventriculaires.

La quatrième phase correspond au remplissage ventriculaire rapide. Les oreillettes, en diastole pendant toute la durée de la systole ventriculaire, se remplissent de sang et la pression s'y élève progressivement. Lorsque la pression intraventriculaire devient inférieure à la pression auriculaire, les valves auriculo-ventriculaires s'ouvrent et provoquent l'écoulement rapide du sang des oreillettes vers les ventricules en état de relaxation complète.

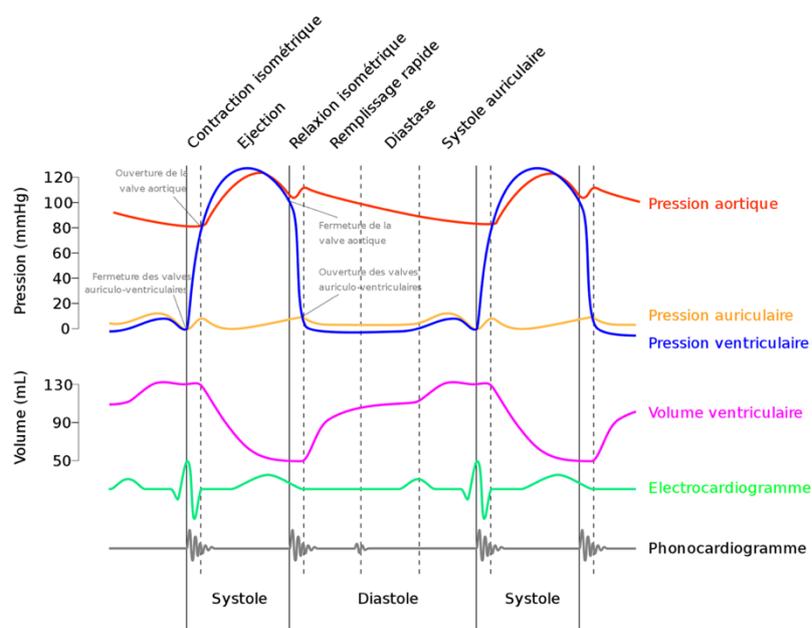


Figure 5. Diagramme de Wiggers adapté de du livre « Medical Physiology », Elsevier, 2006.

Schéma montrant les événements du cycle cardiaque avec le changement des pressions auriculaires, ventriculaires, aortiques, de l'électrocardiogramme.

Enfin, une dernière phase de remplissage ventriculaire tardif et de contraction auriculaire a lieu. L'égalisation des pressions des oreillettes et des ventricules ralentit la vitesse de l'afflux sanguin. La systole auriculaire (contraction auriculaire) permet de terminer le remplissage en entraînant un volume supplémentaire de sang de l'oreillette

vers le ventricule. Ce phénomène aboutit à une augmentation temporaire de la pression auriculo-ventriculaire. Le volume ventriculaire est alors maximal.

5. Le tissu nodal

Le cœur se contracte de manière autonome par le biais de cellules contractiles cardiaques (cardiomyocytes) et la production de potentiels d'actions orchestrés par le tissu nodal. Celui-ci déclenche une excitation électrique engendrant la contraction du myocarde. Il est constitué de deux nœuds dans la paroi de l'atrium droit : le nœud sinusal (ou de Keith et Flack) et le nœud atrioventriculaire (ou d'Ashchoff Twara) (FIGURE 6).

Le nœud sinusal est la structure la plus importante et le centre d'activation électrique principal du cœur. Constitué d'une petite masse de tissus spécialisée et hautement innervé par le système neurovégétatif, il est localisé au contact de la face latérale de l'oreillette droite à proximité de la veine cave supérieure. En fonction des besoins de l'organisme, il génère régulièrement un stimulus électrique provoquant une dépolarisation se propageant de myocyte en myocyte permettant la contraction atriale. La fréquence de dépolarisation du nœud sinusal s'impose à l'ensemble du tissu nodal et détermine la fréquence cardiaque.

La dépolarisation du nœud sinusal se propage et parvient au nœud atrioventriculaire, lui-même situé à la base de l'oreillette droite dans le septum atrioventriculaire. Le nœud atrioventriculaire est en contact direct avec le faisceau de His, un ensemble de myocytes spécialisés dans la conduction du signal de dépolarisation. Celui-ci se subdivise en deux branches, droite et gauche, afin de propager le signal dans l'ensemble des deux ventricules. Il déclenche ainsi la contraction myocardique et la vidange du sang des ventricules. Un battement cardiaque correspond à la contraction ventriculaire. Du fait du délai de propagation de l'onde de dépolarisation, les oreillettes se contractent avant les ventricules, ce qui permet le remplissage ventriculaire avant l'éjection systolique.

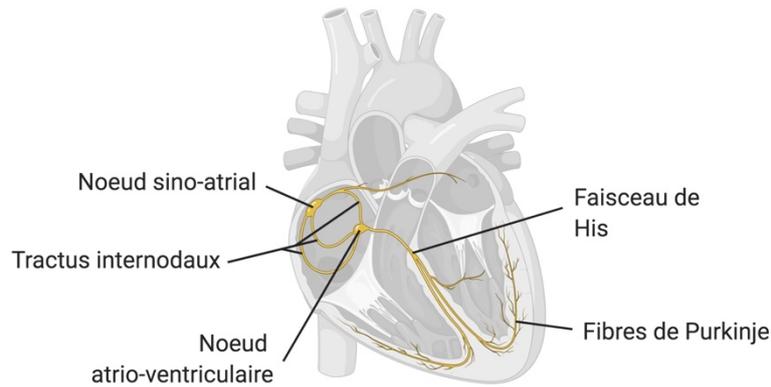


Figure 6. Anatomie cardiaque humaine : représentation schématique du tissu nodal de conduction myocardique.

6. Activité électrique cardiaque : le couplage excitation-contraction

Les impulsions électriques émises par le tissu nodal correspondent à des potentiels d'action (PA), c'est à dire par une augmentation rapide suivi d'une chute du potentiel membranaire. On appelle potentiel membranaire la différence de répartition des ions potassium (K^+), sodium (Na^+) et calcium (Ca^{2+}) de part et d'autre de la membrane cellulaire. Les myocytes contractiles assurent la contraction cardiaque après excitation électrique par un mécanisme appelé complexe de couplage excitation-contraction. Le Ca^{2+} est l'ion fondamental dans l'induction de ce complexe. Les cellules cardiaques sont excitables de par les nombreux canaux ioniques se trouvant dans leurs membranes plasmiques ainsi que par la présence d'un réticulum sarcoplasmique (RS), compartiment de réserve d'ions de calcium. Ces cellules sont aussi interconnectées les unes aux autres ce qui permet un passage rapide de l'information et une contraction synchrone.

Au repos, les concentrations du Ca^{2+} cytosoliques sont faibles. La dépolarisation des myocytes déclenche dans un premier temps une activation des canaux calciques de type L ($Cav1.2$) localisés au niveau des tubules transverses permettant l'entrée dans la cellule d'un flux d'ions Ca^{2+} . Cette augmentation de la concentration de Ca^{2+} induit alors un afflux local et massif de Ca^{2+} depuis le réticulum sarcoplasmique via le récepteur à la Ryanodine ($RyR2$). Le récepteur $RyR2$ est une protéine tétramérique localisée au niveau de la membrane du RS qui possède deux

sites de fixation au Ca^{2+} : l'une à haute affinité induit l'ouverture du canal et l'autre, à basse affinité induit la fermeture du canal. La diffusion de Ca^{2+} dans le cytosol permet leur fixation à la troponine et la myosine (myofilaments) provoquant le raccourcissement de ces derniers et donc la contraction (Bers, 2002). La relaxation survient à la suite de la réabsorption active du Ca^{2+} du cytosol vers la lumière de réticulum sarcoplasmique grâce à une pompe à calcium (SERCA2a) et par son renvoi vers le milieu extracellulaire grâce à la pompe à calcium plasmatique (PMCA) et l'échangeur sodium/calcium (NCX) (Bers, 2014) (FIGURE 7).

Après chaque activation, les cardiomyocytes entrent dans une période dite « réfractaire absolue » : aucun stimulus ne peut entraîner de nouvelle dépolarisation. Au fur et à mesure du temps, elle devient « relative », c'est-à-dire que des stimulus de plus en plus faibles peuvent déclencher une nouvelle dépolarisation.

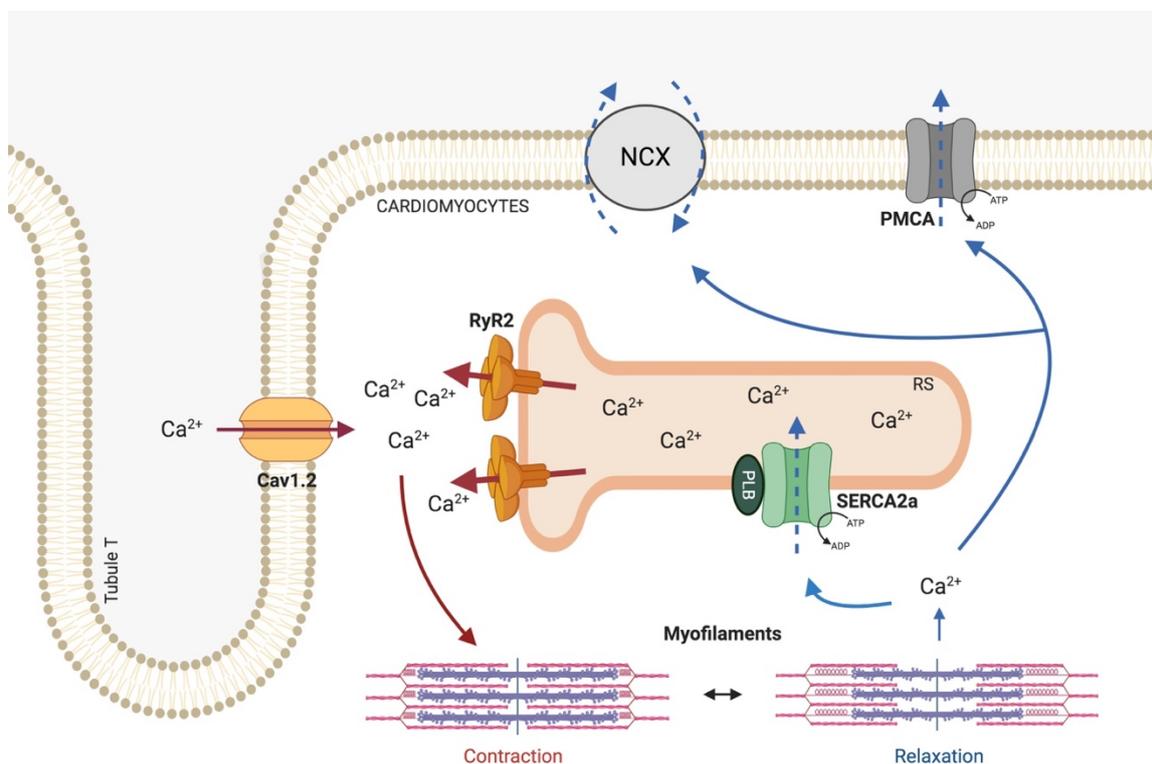


Figure 7. Schéma du couplage excitation-contraction du cardiomyocyte ventriculaire (adapté de Bers, 2002).

L'arrivée d'un potentiel d'action induit l'ouverture des canaux calciques permettant l'entrée des ions Ca^{2+} dans la cellule. Cette entrée déclenche la libération du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (RS) via les récepteurs à la Ryanodine de type 2 (RyR2). Les ions Ca^{2+} ainsi libérés se fixent sur les myofilaments déclenchant la contraction des cardiomyocytes. Le retour des ions calcium vers le RS et leur extrusion vers l'extérieur de la cellule sont assurés par les pompes SERCA2a, PMCA et l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

C. Régulation du système cardiovasculaire

Le cœur bat de façon régulière mais peut accélérer ou ralentir afin de répondre aux besoins de l'organisme et réguler le débit sanguin. Cette fréquence cardiaque est contrôlée par des systèmes permettant une adaptation rapide à des changements soudains (comme la baisse de la pression sanguine), d'autres agissent plus lentement et à long terme. Ces mécanismes de régulation peuvent être d'origine nerveuse, hormonale ou locale.

1. La régulation nerveuse

Le système nerveux végétatif (SNV) fonctionne de manière autonome, sans régulation consciente. Ces fonctions automatiques concernent les muscles lisses, la respiration et le système cardio-vasculaire. Il comporte deux divisions principales : les systèmes nerveux sympathiques et parasympathiques. Le bulbe rachidien du tronc cérébral constitue le centre cardiovasculaire, il permet un contrôle de la fréquence cardiaque (effet chronotrope), de la force de contraction des ventricules (effet inotrope) et du diamètre des vaisseaux sanguins (vasomotricité) (FIGURE 8).

Le système parasympathique permet la conservation et le rétablissement des réserves de substrats énergétiques, il est dit trophotrope. Ses fonctions dans le système cardiovasculaire sont contrôlées par le nerf vague qui innerve les cellules auriculaires et permet la réduction de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle. Il agit via une stimulation des récepteurs cholinergiques muscariniques au niveau des nœuds sino-atrial et auriculo-ventriculaire.

Le système sympathique prépare au contraire le corps aux situations d'urgences : il sert à mobiliser l'énergie en période de stress. Il est dit ergotrope. Ce système innerve les oreillettes et les ventricules cardiaques par le biais des nœuds sino-atrial et atrio-ventriculaire. Il agit sur ces derniers pour permettre entre autres l'augmentation de la fréquence cardiaque, de la force de contraction ainsi que la vitesse de relaxation myocardique. Il innerve aussi les vaisseaux et peut, par

l'activation des récepteurs β -adrénergiques, provoquer une augmentation de la vasoconstriction.

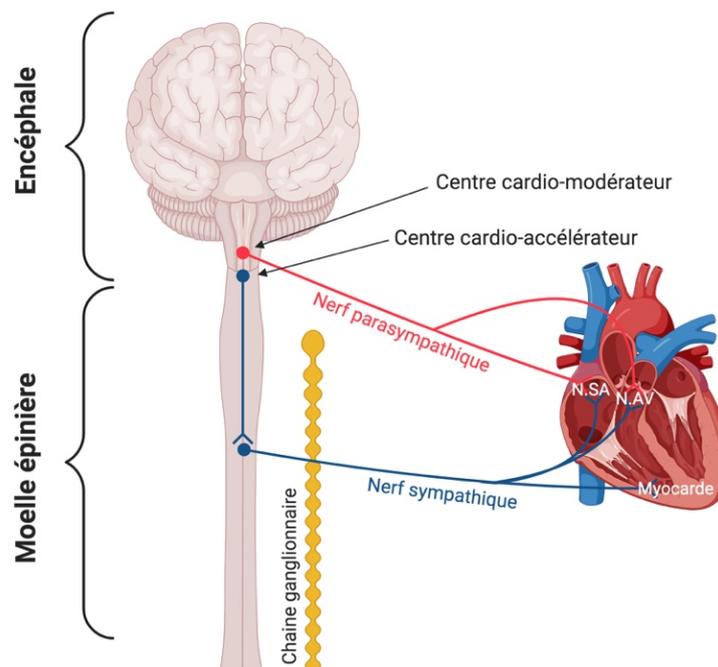


Figure 8. Schéma de l'innervation du cœur par les système sympathique et parasympathique (adapté de Scridon et al., 2018)

N.SA : nœud sino-atrial, N.AV : nœud atrio-ventriculaire.

Les cardiomyocytes sont des cellules cibles du système nerveux sympathique. Elles possèdent des récepteurs β -adrénergiques de type β_1 , β_2 et β_3 (Myagmar *et al.*, 2017). Les récepteurs β_1 -adrénergique, sont préférentiellement cardiaques et localisés sur toute la surface de la membrane plasmique du cardiomyocyte. Les récepteurs β_2 -adrénergique, sont prédominants au niveau vasculaire et bronchique mais tout de même exprimés au niveau des tubules T et des cavéoles, invaginations de la membrane plasmique des cardiomyocytes (Woo *et al.*, 2015). Ce sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à l'adenyl-cyclase (AC) par une protéine G stimulante (Gs). Les béta-AR sont activés par la fixation de catécholamines. Leur stimulation active l'AC qui entraîne la formation d'AMP cyclique (AMPc) à partir d'ATP. L'AMPc active alors à son tour la protéine kinase A (PKA), laquelle va phosphoryler des protéines majeures du cycle du calcium et des composants des myofilaments permettant des effets chronotropes, inotropes et lusitropes (effets de relaxation cardiaque) positifs. Par ailleurs, la PKA phosphoryle

plusieurs phosphodiésterases (PDE4B, PDE4D, PDE3) produisant ainsi un rétrocontrôle négatif sur la voie AC/AMPc/PKA évitant ainsi l'apparition d'effets délétères pour la fonction cardiaque.

Parallèlement à la voie classique qui implique l'activation des protéines Gs, les récepteurs β 2- peuvent être couplés aux protéines G inhibitrices (Gi). Ce couplage inhibe l'activité de la voie AC/AMPc/PKA et de ses effets.

De plus, les récepteurs β 2-AR couplés à une protéine Gi activent la voie PI3K/Akt impliquée dans les mécanismes anti-apoptotique mais aussi dans l'activation de la NOS synthase générant ainsi du monoxyde d'azote (NO). En effet la libération de NO peut être induite via les signalisations cAMP/PKA/Akt/eNOS (Ferro *et al.*, 1999) et phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt /eNOS (Calvert *et al.*, 2011). De façon physiologique le NO va entraîner (1) l'activation de la protéine kinase dépendante du Ca^{2+} /calmoduline (CamKII), dont les effets sur les régulateurs du cycle du calcium se rapprochent de ceux observés avec la PKA. (2) La production de GMPc (guanosine monophosphate cyclique) en activant la guanylate cyclase soluble (GCs) qui permettra des effets chronotropes, inotropes et lusitropes négatifs régulés par la protéine kinase GMPc dépendante (PKG). (3) L'activation des protéines kinase des récepteurs couplés aux protéines G (GRK). Ces kinases sont capables d'entraîner le découplage des récepteurs β -adrénergiques de leurs protéines G par la phosphorylation de ces derniers (Pereira *et al.*, 2017; Rajagopal and Shenoy, 2018) (FIGURE 9).

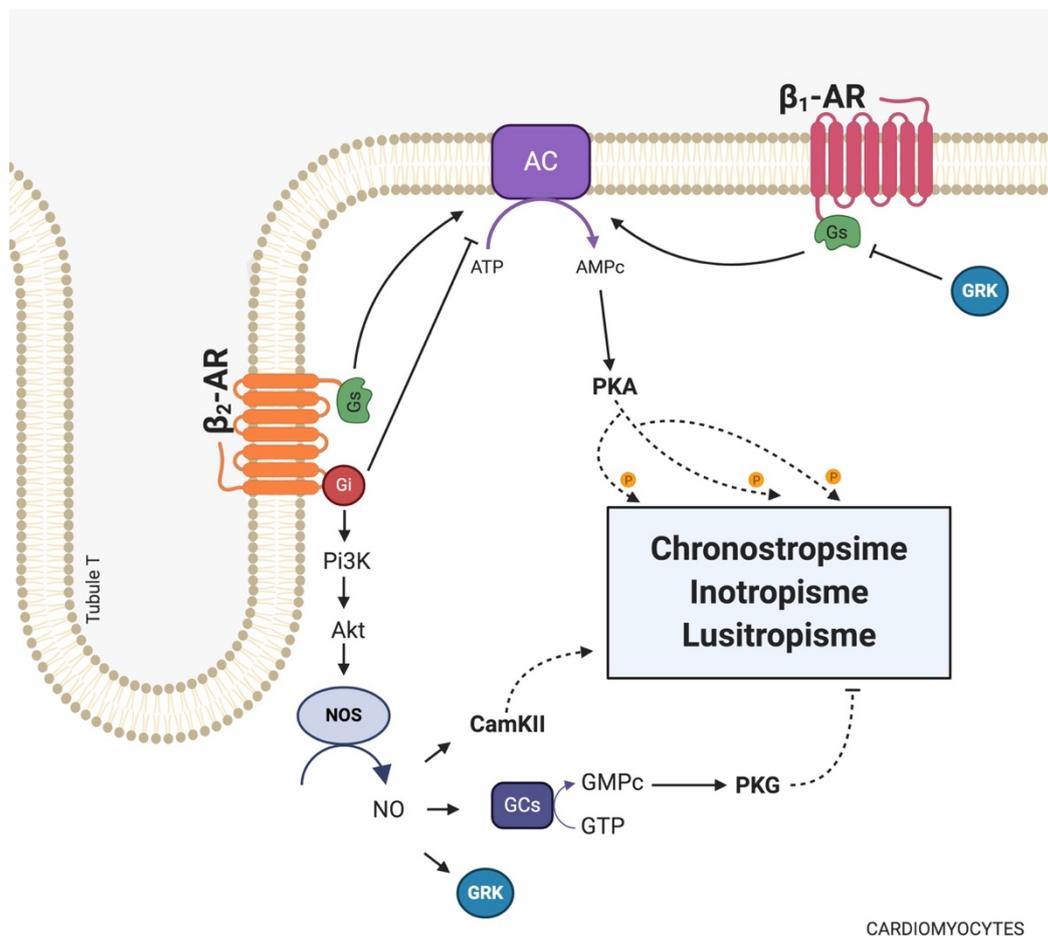


Figure 9. Schéma des voies de signalisation couplées aux récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques (adapté de Pereira *et al.*, 2017; Rajagopal and Shenoy, 2018).

AR : récepteur adrénergique, Gs : protéine G stimulatrice, Gi : protéine G inhibitrice, AC : adénylate cyclase, NO : monoxyde d'azote, AMPc : adénosine monophosphate cyclique, PKA : protéine kinase A, eNOS : synthase de monoxyde d'azote endothéliale, GCs : guanylate, GMPc : guanosine monophosphate cyclase soluble, GTP : guanosine triphosphate, PKG : protéine kinase G, GRK : kinase des récepteurs couplés aux protéines G.

Les récepteurs β_3 -adrénergiques ont été récemment identifiés et sont faiblement distribués au niveau cardiaque. Même si on retrouve globalement une homologie entre les régions transmembranaires des récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques avec les récepteurs β_3 -adrénergiques, des divergences significatives sont présentes dans la troisième boucle intracellulaire et dans le domaine C-terminal (Cannavo and Koch, 2017). En effet, La région C-terminal des récepteurs β_1 - et β_2 - adrénergiques est riche en résidu de sérine de thréonine et possède des sites phosphorylables par les GRK. La phosphorylation de ces sites entraîne un découplage du récepteur de sa protéine G, conduisant à l'inactivation du récepteur. De ce fait, les récepteurs β_3 -adrénergiques sont plus résistants au découplage car non sujets à la régulation des GRK (Skeberdis,

2004). Les récepteurs β_3 -adrénergiques n'ont pas été étudiés avec la même intensité que les β_1 - et β_2 - et de ce fait leurs rôle physiologique et physiopathologique reste à préciser.

Néanmoins, des études ont montré des effets inotropes négatifs accompagnés d'une vasodilatation (Dessy and Balligand, 2010). Comme pour les récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques, la signalisation via la protéine Gs augmente la génération d'AMPc et l'activation de la PKA. L'activation de la signalisation Gi entraîne l'activation, de la PKG ainsi que la phosphodiesterase (PDE2) qui réduit les niveaux de l'AMPc et affecte la contractilité cardiaque. L'activation de la voie de signalisation Gi des récepteurs β_3 -adrénergiques est capable de générer du NO via la NOS endothéliale (eNOS) et la NOS neuronal (nNOS) située sur le réticulum sarcoplasmique (SR) (Cannavo and Koch, 2017) (FIGURE 10).

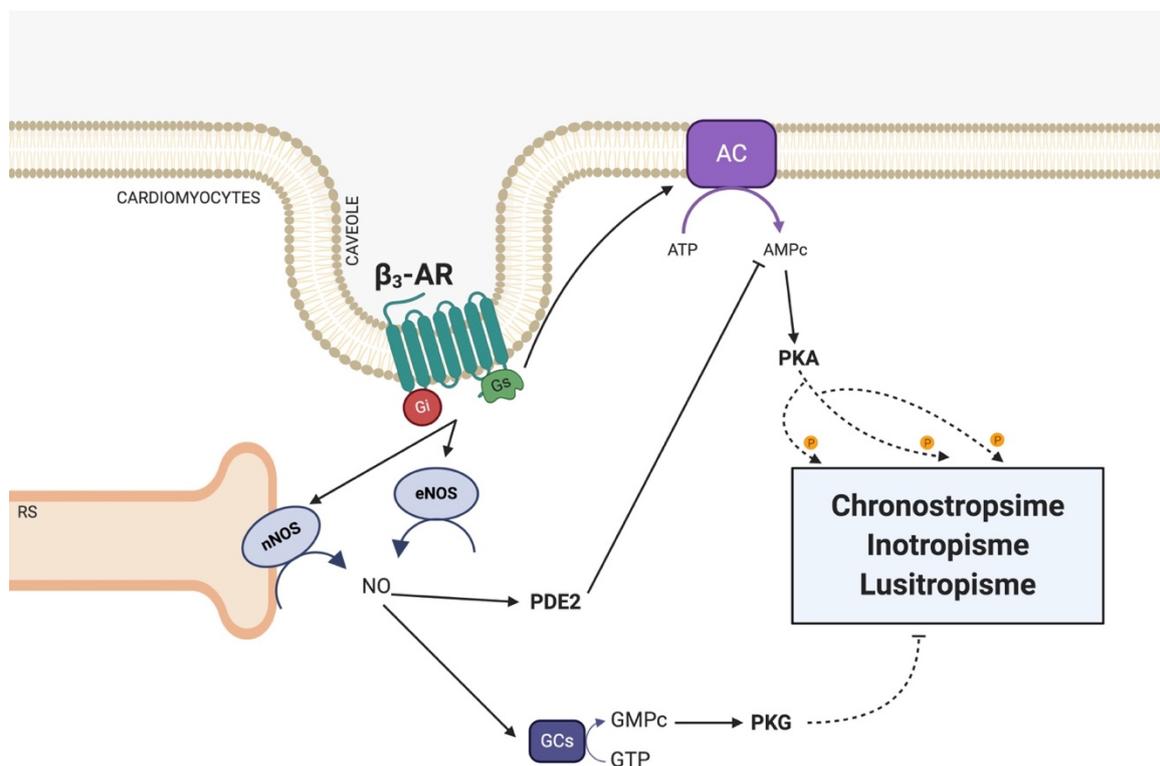


Figure 10. Schéma des voies de signalisation couplées aux récepteurs β_3 -adrénergiques (adapté de Cannavo and Koch, 2017).

AR : récepteur adrénergique, Gs : protéine G stimulatrice, Gi : protéine G inhibitrice, AC : adénylate cyclase, GMPC : guanosine monophosphate cyclique cyclase soluble, AMPc : adénosine monophosphate cyclique, PKA : protéine kinase A, Akt : protéine Akt, eNOS : synthase de monoxyde d'azote endothéliale, NO : monoxyde d'azote, GCs : guanylate, , GTP : guanosine triphosphate, PKG : protéine kinase G, .

2. La régulation humorale

Plusieurs hormones affectent de manière directe ou indirecte la fonction cardiaque et vasculaire.

L'adrénaline et la noradrénaline sont les neuromédiateurs du SNV sympathique. Ces catécholamines sont produites et libérées dans le sang en cas de stress ou d'effort physique intense. Elles favorisent la chronotropie et l'inotropie positive ainsi qu'une vasoconstriction périphérique.

L'endothéline est une hormone principalement sécrétée par les cellules endothéliales. Elle promeut la chronotropie et l'inotropie positive (Moravec *et al.*, 1989; Zolk and Böhm, 2000). Chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque, sa concentration plasmatique est multipliée par deux à trois (Agapitov and Haynes, 2002).

L'angiotensine II (Ang II) tend à élever la pression artérielle en déclenchant une vasoconstriction. Des études ont aussi montré qu'elle pouvait avoir un effet inotrope positif mais le mécanisme d'action reste encore à définir. Elle pourrait moduler la contractilité cardiaque en favorisant la réactivité des myofilaments au Ca^{2+} (Fujita and Endoh, 1999), en augmentant la concentration intracellulaire en Ca^{2+} (Ikenouchi *et al.*, 1994) ou encore en modulant la sécrétion d'endothéline (Cingolani Horacio E. *et al.*, 2006). Les mécanismes d'action semblent être différents selon les espèces et rendent la compréhension du fonctionnement de cette hormone sur le cœur compliquée (Vila Petroff and Mattiazzi, 2001).

L'hormone antidiurétique (HAD) ou arginine vasopressine est produite par l'hypothalamus. Sa fonction principale est son action antidiurétique : elle agit directement sur le rein et permet la réabsorption d'eau (Thorn, 1957). En cas de phénomène de stress comme l'hypovolémie, l'HAD va avoir un effet vasoconstricteur sur les vaisseaux périphériques et une vasodilatation au niveau des artères cérébrales et coronaires (organes fortement demandeurs en oxygène) (Holmes, Landry and Granton, 2004).

Le peptide natriurétique auriculaire (PNA), est une hormone produite suite à l'étirement des myocytes en réponse à la pression ainsi qu'à la charge volumique (Lang *et al.*, 1985; Ruskoaho, 1992). Il est sécrété en grande partie par les myocytes des oreillettes cardiaques. Le « brain natriuretic peptide » (BNP) est sécrété à la fois par les oreillettes et les ventricules (Minamino *et al.*, 1988) de manière mécanique à la suite de l'étirement des cardiomyocytes. La libération de ces peptides cardiaques permet une vasodilatation favorisant une baisse de la pression artérielle (Woods, 2004; McGrath, de Bold and de Bold, 2005).

3. La régulation locale

Des changements physiques dans l'environnement entraînent la modification des propriétés des vaisseaux. En effet, l'étirement mécanique du tissu ou bien la charge de pression favorise la sécrétion de substances locales (autocrines ou paracrines).

Les cellules endothéliales produisent et sécrètent de nombreux produits vasoactifs, c'est-à-dire capables d'effets vasomoteurs. De par leur contact direct avec les cardiomyocytes elles jouent également un rôle essentiel dans la régulation de l'activité cardiaque par leur action paracrine. Effectivement, chez l'homme un cardiomyocyte ne se trouve jamais à plus de 50 μM d'une cellule endothéliale (Brutsaert, 2003). La régulation de l'endothélium sur la contractilité cardiaque s'effectue par la sécrétion de différentes molécules, le monoxyde d'azote (NO) étant sans doute le facteur de relaxation le plus connu. L'impact du NO sur la fonction cardiaque sera détaillé ultérieurement.

Les fibroblastes jouent aussi un rôle important dans la détermination de la fonction mécanique et électrique cardiaque. En effet, Les fibroblastes et les CM sont fortement intercalés dans le myocarde et peuvent dialoguer directement par l'existence de jonctions communicantes composées de connexines. Les fibroblastes ne sont pas électriquement excitables mais leur membrane plasmique contenant de nombreux canaux fait de ces cellules de bons conducteurs électriques. Ainsi les fibroblastes permettent la transmission de signaux électriques dans différentes régions où les

myocytes sont normalement isolés les uns des autres (Souders, Bowers and Baudino, 2009). Les fibroblastes peuvent aussi sécréter de nombreuses chimiokines, cytokines, facteurs de croissance et autres facteurs solubles capables de moduler l'activité cardiaque (Zhang, Su and Mende, 2012).

II. Insuffisance cardiaque chronique

A. Généralités

1. Définition

Parmi les maladies cardio-vasculaires, l'insuffisance cardiaque (IC) est une des plus fréquentes et mortelles. En France, elle touche plus d'un million de personnes et 120 000 cas sont dépistés chaque année (Delahaye *et al.*, 1998; Franzin-Garrec, 2013). En une décennie, il a été observé une hausse de 30% du nombre de personnes souffrant d'IC (Franzin-Garrec, 2013). Du fait de leur maladie, de nombreux patients ont des difficultés à mener une vie normale et sont sujets à des complications qui mènent à des hospitalisations récurrentes dont la létalité est élevée (KOMAJDA *et al.*, 2013). L'insuffisance cardiaque est d'ailleurs la première cause d'hospitalisation des personnes âgées de plus de 65 ans et responsable de 23 000 décès par an (Logeart *et al.*, 2013). Cette pathologie a des conséquences désastreuses puisqu'on estime que la mortalité 3 à 5 ans suivant l'apparition de symptômes est d'environ 50% (Franzin-Garrec, 2013). On comprend facilement qu'elle constitue un problème de santé publique majeur et génère des dépenses extrêmement élevées chaque année.

L'IC est une affection grave et complexe. Elle peut être la conséquence d'une complication de certaines maladies cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde, mais peut aussi se développer à la suite d'une complication chirurgicale ou d'une infection. On parle alors d'IC aiguës car elles surviennent de manière brutale et transitoire et nécessitent une prise en charge urgente. D'apparition progressive, l'IC chronique (ICC) s'installe de manière irréversible en l'absence de traitement. Elle est la conséquence d'une perte de la fonction contractile du myocarde menant à la réduction du débit cardiaque. Des mécanismes compensatoires se mettent pourtant

rapidement en place : la fréquence cardiaque s'accélère afin d'augmenter le débit cardiaque. Malheureusement, cette amélioration devient préjudiciable à long terme puisqu'elle exerce une pression excessive sur le cœur et aura pour conséquence l'épaississement des parois et la dilatation des cavités : c'est l'hypertrophie cardiaque, un facteur aggravant de l'ICC.

Le diagnostic de l'ICC est posé devant des symptômes évocateurs d'IC : tachycardie, turgescence jugulaire, œdèmes périphériques, congestion pulmonaire et de symptômes peu spécifiques comme l'essoufflement au repos ou à l'effort, les difficultés respiratoires en position allongée, la toux, l'asthénie ou encore la difficulté à réaliser les actes de la vie quotidienne. L'échographie Doppler et le dosage des peptides natriurétiques (BNP ou NT-proBNP) constituent une preuve objective de la dysfonction structurelle ou fonctionnelle cardiaque au repos.

L'ICC comprend un large éventail de patients mais n'englobe que deux grands types d'atteintes cardiaque : une anomalie prédominante systolique ou bien diastolique. La discrimination de ces différents types de patients se base sur la mesure par échographie de la fraction d'éjection (FE) du ventricule gauche, qui reflète la fonction contractile du cœur. Dans ce contexte, la mesure de l'FE permet le diagnostic d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite (ICFER) lorsqu'elle est inférieure à 40%. Inversement, lorsque la fraction d'éjection est supérieure à 50% on parle d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (ICFEp). Depuis peu, on définit une insuffisance cardiaque intermédiaire lorsque la FE se situe entre 40 et 49% (ICFEi) (Ponikowski *et al.*, 2016). La distinction entre ces trois entités est essentielle car la prise en charge ainsi que le pronostic des patients atteints sont très différents. En effet, la plupart des essais cliniques publiés après les années 1990 ne montrent des résultats thérapeutiques bénéfiques que chez les patients atteints d'ICFER.

2. Classification

La classification fonctionnelle établie par la New York Heart Association (NYHA) est actuellement la classification de référence utilisée pour évaluer l'effet clinique de l'IC sur les patients. Elle classe l'IC en 4 stades suivant le degré de dyspnée dont souffrent les patients pendant l'activité physique. Elle permet ainsi aux médecins de

définir la gravité de la maladie, son évolution ainsi que l'admissibilité aux essais cliniques.

Classe 1 : pas de limitation de l'activité physique. Activité usuelle sans fatigue, dyspnée, palpitations ou douleurs angineuses.

Classe 2 : aucun symptôme et au repos, mais diminution légère de l'activité physique ; l'activité usuelle entraîne soit fatigue, dyspnée, douleurs angineuses ou palpitations.

Classe 3 : aucun symptôme au repos, mais gêne au moindre effort.

Classe 4 : gêne au moindre effort au repos.

L'American College of Cardiology/American Heart Association (ACC/AHA) ont publié pour la première fois des lignes directives pour l'évaluation et la gestion de l'IC en 1995. Suite aux progrès thérapeutiques, cette classification a été revue en 2001. Elle définit l'IC en 4 étapes basées sur les modifications structurelles et/ou fonctionnelles du cœur. Contrairement à la classification NYHA elle reconnaît l'existence des facteurs de risques établis et permet l'intervention thérapeutique avant même l'apparition d'un dysfonctionnement ventriculaire gauche ou de symptômes. La reconnaissance précoce de ces anomalies est importante car elles peuvent entraîner des complications graves, et l'initiation du traitement au stade précoce pourrait réduire le taux de mortalité.

Le **stade A** identifie le patient qui présente un risque élevé de développer une IC mais qui ne présente aucun trouble structurel du cœur

Le **stade B** fait référence à un patient présentant un trouble structurel du cœur mais qui n'a jamais développé de symptômes d'HF.

Le **stade C** désigne le patient présentant des symptômes passés ou actuels d'HF associés à une maladie cardiaque structurelle sous-jacente.

Le **stade D** désigne le patient atteint d'une maladie en phase terminale qui nécessite des stratégies de traitement spécialisées telles que l'assistance circulatoire mécanique, les perfusions inotropes continues, la transplantation cardiaque ou les soins palliatifs.

Ce système de classification n'est pas destiné à remplacer la classification fonctionnelle de la NYHA mais plutôt à la compléter

B. L'Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

1. Généralités

Les patients atteints d'ICFEp représentent approximativement 50% des patients souffrant d'ICC. Le diagnostic est souvent difficile à poser, particulièrement au stade précoce, car les symptômes sont peu spécifiques et peuvent être reliés à d'autres facteurs. En effet, la dyspnée peut être la conséquence d'une valvulopathie, d'une péricardite constructive, de l'obésité, d'une embolie pulmonaire, d'anémie, d'hypertension pulmonaire, de désordre neuromusculaire etc. De plus, bon nombre de patients souffrent de plusieurs maladies et leurs symptômes se chevauchent. Un autre élément pouvant compliquer le diagnostic précoce est le fait que la plupart des patients manifestent des symptômes légers et l'élévation des pressions de remplissage ne survient qu'à l'effort. Chez ces patients l'examen clinique, la radiographie pulmonaire et l'électrocardiogramme peuvent être normaux et l'utilisation de tests d'effort est souvent nécessaire.

L'échographie Doppler se situe au premier plan pour le diagnostic de l'ICFEp. Elle donne une valeur chiffrée de la FE du ventricule gauche et évalue la présence de trouble de relaxation et de dysfonction diastolique.

Le dosage des BNP (ou NT pro-BNP) peut constituer un outil facilitant le diagnostic car une augmentation de ces derniers est généralement bien corrélée à une élévation des pressions de remplissage. Néanmoins, cet outil est imparfait car il possède une

faible spécificité et doit être combiné avec d'autres mesures de dysfonction diastolique. En effet, un taux normal de BNP n'exclut pas une ICFEp notamment chez des patients présentant une élévation des pressions de remplissage faibles ou intermittentes (seulement à l'effort). Plusieurs facteurs autres que l'augmentation de pression peuvent aussi influencer le niveau de BNP comme la fibrillation auriculaire, la tachycardie ou encore l'insuffisance rénale. De plus, les niveaux de BNP et NT pro-BNP sont souvent normaux chez les patients obèses atteints d'ICFEp.

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) cardiaque est un outil permettant la caractérisation tissulaire du myocarde et l'évaluation de la fibrose. Son utilité dans le diagnostic demeure toutefois controversée car la corrélation entre le degré de fibrose interstitielle diffuse dans le ventricule gauche et la présence d'une dysfonction diastolique n'est pas bien établie.

Enfin, l'utilisation du cathétérisme droit-gauche constitue le seul test permettant de mesurer directement les pressions de remplissage intracardiaques au repos et à l'exercice. Néanmoins, cet examen est invasif et n'est pas effectué en routine. Il permet cependant de confirmer un diagnostic ICFEP en cas d'incertitude.

En 2019, un consensus de recommandations pour le diagnostic de l'ICFEp a été proposé par l'Heart Failure Association (HFA) et la société Européenne de cardiologie (ESC) (Pieske *et al.*, 2019) (FIGURE 11).

P	Bilan initial	<ul style="list-style-type: none"> - Symptômes et/ou signes d'IC - Comorbidités - Biologie standard + peptides natriurétiques, si disponibles - ECG - Ergométrie - Echocardiographie standard
E	Bilan diagnostique	<ul style="list-style-type: none"> - Echocardiographie détaillée - Peptides natriurétiques (seuils différents selon la présence/absence de FA)
F	Bilan avancé	<ul style="list-style-type: none"> - Echocardiographie de stress/à l'effort (=test de stress diastolique) - Paramètres hémodynamiques invasif au repos +/- à l'effort
F2	Bilan étiologique	<ul style="list-style-type: none"> - Epreuve d'effort cardiopulmonaire (CPET) - Imagerie par résonance magnétique cardiaque - Biopsies cardiaques/extracardiaques - Scintigraphie myocardique - Tests génétiques - Analyses de laboratoires spécifiques

Figure 11. L'algorithme proposé par l' HFA-PEFF pour le diagnostic de l'ICFEp (adapté de Pieske *et al.*, 2019).

La **première étape** permet d'orienter le diagnostic vers l'ICFEp. Elle consiste en la réalisation de tests de laboratoire, de test d'effort non invasif, un électrocardiogramme ainsi qu'un échocardiogramme standard. Ces examens permettent de suspecter une ICFEp si la FE du VG est normale et qu'aucune maladie valvulaire ou ischémique n'est identifiée. Cette étape est généralement effectuée en milieu ambulatoire sur des patients présentant des symptômes et signes cliniques d'IC et porteurs de facteurs de risques typiques (obésité, hypertension, diabète, fibrillation auriculaire...).

La **deuxième étape** permet la mise en place d'un système de score basé sur des mesure échocardiographiques et les niveaux des peptides natriurétiques pour le bilan diagnostique de l'ICFEp (**FIGURE 12**). Elle nécessite une échocardiographie complète et généralement effectuée par un cardiologue. Les critères de mesure sont constitués de marqueurs fonctionnels (estimation des pressions de remplissage, vitesse de régurgitation tricuspide, la contrainte systolique longitudinale globale VG) et de marqueurs morphologiques (indice de volume auriculaire gauche, indice de masse du VG, épaisseur de paroi relative du VG). Le dosage sérique des peptides natriurétiques peut se faire s'il n'a pas déjà été fait à l'étape 1.

Des critères majeurs (2 points) et mineurs (1 point) ont été définis à partir de ces différentes mesures. Un score ≥ 5 points implique une IC-FEP définie ; ≤ 1 point rend une IC-FEP improbable et nécessite plus d'examen afin d'explorer des causes alternatives ; un score intermédiaire (2-4 points) implique une incertitude de diagnostic et les patients doivent être évalués plus en détail.

	Fonctionnels	Morphologiques	Biomarqueurs (RS)	Biomarqueurs (FA)
Majeurs	e' septal < 7 cm/s ou e' latéral < 10 cm/s E/e' moyen ≥ 15	LAVI > 34 ml/m ² ou LVMI $\geq 149/122$ g/m ² et RWT > 0,42	Nt-proBNP > 220 pg/ml ou BNP > 80 pg/ml	Nt-proBNP > 660 pg/ml ou BNP > 240 pg/ml
Mineurs	E/e' moyen 9-14 vitesse TR > 2,8 m/s GLS < 16%	LAVI 29-34 ml/m ² ou LVMI $\geq 115/95$ g/m ² ou RWT > 0,42 ou épaisseur pariétale du VG ≥ 12 mm	Nt-proBNP 125-220 pg/ml ou BNP 35-80 pg/ml	Nt-proBNP 365-660 pg/ml ou BNP 105-240 pg/ml

■ Majeurs: 2 points ≥ 5 points: IC-FEP
■ Mineurs: 1 point 2-5 points: échocardiographie de stress ou paramètres hémodynamiques invasifs

Figure 12. Le score HFA-PEFF (adapté de Pieske *et al.*, 2019).

Le score HFA-PEFF est constitué de trois critères : fonctionnels, morphologiques et de biomarqueurs. Pour chaque catégorie, on détermine les critères majeurs (2 points) et mineurs (1 point). Si le score est inférieur à 2, l'IC-FEP peut être exclue. RS : rythme sinusal, FA : fibrillation atriale, E : onde E, e' : onde e', E/e' : ratio de l'onde E sur l'onde e', GLS : contrainte longitudinale globale, TR : régurgitation tricuspide, LAVI : index du volume de l'oreillette gauche, LVMI : indice de masse ventriculaire gauche, RWT : épaisseur relative de la paroi, VG : ventricule gauche, BNP : peptide natriurétique de type B, IC-FEP : insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.

La **troisième étape** intervient lors d'une incertitude de diagnostic d'IC-FEP. Un bilan complémentaire sous forme d'échocardiographie de stress pendant l'effort ou même des mesures hémodynamiques invasives permettent de confirmer le diagnostic.

La **quatrième étape** est recommandée pour établir une cause spécifique possible d'IC-FEP ou d'autres explications. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour une meilleure classification d'IC-FEP.

2. Facteurs de risques et comorbidités

Plusieurs études ont établi que les patients atteints IC-FEP sont plus âgés et que l'incidence et la prévalence augmentent plus fortement avec l'âge par rapport aux patients atteints IC-FE. Le vieillissement entraîne une dégradation progressive de la structure et de la fonction cardiaque (Chiao and Rabinovitch, 2015). En effet, il a été

montré qu'avec l'âge, une personne en bonne santé, sans maladie cardiovasculaire associée, est sujette à une hypertrophie ventriculaire gauche, une baisse de la fonction diastolique, une baisse de la capacité systolique à l'effort ainsi qu'une augmentation de la prévalence de la fibrillation auriculaire (Lakatta and Levy, 2003). Ces changements constituent le vieillissement intrinsèque cardiaque puisqu'ils peuvent être indépendants des facteurs de risques classiques de maladies cardiaques. Ces altérations représentent un facteur aggravant de l'ICFEP.

D'autres études signalent également que les patients atteints d'ICFEP sont plus susceptibles d'être des femmes. Ces observations ont conduit à considérer le sexe comme un facteur de risque. Seulement certaines études épidémiologiques remettent en question cette hypothèse. En effet, l'âge est un puissant facteur de risque et en 2012, les femmes représentaient 60% de la population américaine âgée de plus de 75 ans. Les taux d'incidence de l'ICFEP chez les femmes ne seraient en fait que légèrement supérieurs à ceux des hommes lorsqu'on standardise les taux d'incidence en fonction de la répartition par âge de la population (Dunlay, Roger and Redfield, 2017).

La majorité des patients atteints d'ICFEP souffre de multiples maladies chroniques qui rendent la physiopathologie difficile (Paulus and Tschöpe, 2013; Chamberlain *et al.*, 2015). L'hypertension artérielle (Gottdiener, 2002; Lee *et al.*, 2009), le diabète de type 2 (Owan *et al.*, 2006; Aguilar *et al.*, 2010) ou encore l'obésité (Owan *et al.*, 2006; Aguilar *et al.*, 2010) sont depuis quelques années des facteurs de risque cardiovasculaire bien identifiés. Il est important de noter que près de 50% des patients atteints d'ICFEP présentent au moins cinq comorbidités majeures (Dunlay, Roger and Redfield, 2017).

L'hypertension artérielle (HTA) correspond à une élévation pathologique de la pression du sang sur la paroi vasculaire artérielle. On parle d'HTA lorsque l'on observe une augmentation de la pression artérielle systolique à 140 mmHg ou plus et/ou de la pression artérielle diastolique à 90 mmHg ou plus sur plusieurs mois successifs. En France, elle touche près d'un adulte sur trois et constitue un facteur de risque important de morbi-mortalité cardiovasculaire (Perrine *et al.*, 2018). Une relation forte entre le niveau de pression artérielle et le risque cardiovasculaire, quel que soit l'âge, a été décrite : la mortalité cardiovasculaire double pour chaque augmentation de 20/10

mmHg de la pression artérielle systolique/diastolique respectivement (Lewington *et al.*, 2002; Rapsomaniki *et al.*, 2014). L'HTA représente une comorbidité majeure puisqu'elle est retrouvée chez 50 à 90% des patients atteints d'ICFEP, ce qui est plus élevé que sa prévalence dans la population générale (Chinali *et al.*, 2010).

Le diabète se définit par une hyperglycémie chronique à jeun qui est égale ou supérieure à 1,26 mg/L ou 7 mmol/L. Un lien étroit entre diabète de type 2 et risque cardiovasculaire a été établie par de nombreuses études. La Framingham Heart Study a mis en évidence une multiplication par 2 du risque relatif d'IC chez l'homme et par 5 chez la femme (Kannel, Hjortland and Castelli, 1974). Globalement, les études menées rapportent qu'environ 20 à 45% des patients souffrant d'ICFEP sont diabétiques (Paulus and Tschöpe, 2013).

Selon l'OMS, l'obésité se caractérise par « une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé ». Elle se définit par une augmentation de l'indice de masse corporelle (IMC) au-delà de 30 kg/m². Elle concerne environ 17% des adultes en France et représente plus de 80% des patients atteints d'ICFEP. En effet, l'obésité est connue pour être fortement associée à d'autres comorbidités comme l'hypertension et le diabète, il n'est donc pas surprenant de constater que la plupart des patients soient en surpoids ou obèses (Haass *et al.*, 2011). Une étude a même suggéré l'existence d'une augmentation de 5% chez les hommes et de 7% chez les femmes de risque de développer de l'IC par unité d'IMC (Horwich and Fonarow, 2010).

3. Physiopathologie ICFEP : rigidité cardiaque

De nombreuses études ont démontré chez des patients atteints d'ICFEP des altérations progressives de deux composantes majeures : musculaire et vasculaire. En effet, l'analyse de biopsies cardiaques de patients atteints d'ICFEP a permis de mettre en évidence des altérations structurelles telles qu'une hypertrophie cardiomyocytaire et une fibrose interstitielle ainsi que des changements fonctionnels tels qu'une relaxation incomplète des bandes myocardiques et une augmentation de la rigidité des cardiomyocytes (Paulus and Tschöpe, 2013). Ces anomalies ont pour conséquences une relaxation incomplète du myocarde et une rigidité ventriculaire. Les comorbidités associées à la maladie semblent directement impliquées dans les

mécanismes aboutissant à ces modifications. En effet, la vieillesse, l'obésité, le diabète et l'hypertension contribuent à la détérioration de la fonction diastolique par l'augmentation de la rigidité des ventricules et des artères, des dysfonctions vasculaires ou encore l'altération de la voie du calcium (Upadhya, Taffet, *et al.*, 2015).

Cette rigidité cardiaque entraîne une incapacité du cœur à se distendre correctement et engendre une augmentation des pressions en amont. Elle semble principalement liée à un remodelage du myocarde accompagné d'une modification de la composition matricielle et d'une altération structurelle et fonctionnelle des cellules contractiles (Paulus and Tschöpe, 2013).

a) Remodelage cardiaque et fibrose interstitielle

La globalité des modifications structurales, cellulaires et géométriques endurées par le cœur au cours d'un développement pathologique constituent le remodelage cardiaque. Chez les patients atteints d'ICFÉp, une hypertrophie concentrique est observée. Elle résulte d'une augmentation de l'épaisseur de la paroi du VG en réponse à une surcharge de pression sévère. Il s'agit d'un mécanisme compensatoire qui permet de maintenir une fraction d'éjection supérieure à 50%. L'hypertrophie concentrique est le résultat d'une réplication de sarcomères en parallèle au niveau du myocyte sans modification de la taille de la cavité du VG (Russell, Motlagh and Ashley, 2000). L'augmentation de la masse du VG est associée à un risque relatif de décès cardiovasculaire de 1,73 chez les hommes et de 2,12 chez les femmes (Lorell and Carabello, 2000) et apparaît donc comme un marqueur pronostic de morbidité et mortalité.

La fibrose cardiaque est un phénomène pathologique durant lequel le tissu parenchymateux classique est remplacé par du tissu conjonctif. Un dépôt excessif et continu de matrice extracellulaire (MEC) se produit, avec une sécrétion de protéines inextensibles : le collagène de type I et III (Westermann *et al.*, 2011). La MEC est un réseau non cellulaire présent dans tous les tissus. Essentiel dans l'homéostasie, elle permet non seulement un support mécanique mais sert aussi à la signalisation de cascades de transduction (Hynes, 2009). Contrairement à la fibrose de remplacement observée après une lésion cardiaque comme lors d'un infarctus du myocarde où les

cellules cardiaques nécrosées sont remplacées par du collagène, la fibrose retrouvée dans l'ICFep est compacte, diffuse et inégale. Cette fibrose dite « réactive » est la conséquence d'une accumulation de collagène dans l'espace périvasculaire des artères coronaires intramural, du périnysium et de l'endomysium. Chez les patients atteints d'ICFep, on observe par ailleurs un rapport du collagène de type I au collagène de type III anormalement augmenté.

Le processus de fibrose cardiaque se déroule en plusieurs phases : la surcharge de pression et/ou la sécrétion de facteurs pro-fibrotiques par les cellules inflammatoires vont aboutir à la synthèse et au dépôt de collagène dans l'espace interstitiel. Les fibroblastes sont les principaux acteurs de la progression fibrotique cardiaque puisqu'ils sont les premiers à produire les fibres de collagène. En présence de nombreux facteurs physiques et chimiques comme le TGF β ou encore les espèces réactives de l'oxygène, ces cellules peuvent se trans-différencier en myofibroblastes, réelle usine à fibrose. Cette accumulation de collagène est accompagnée par une diminution de la production de métalloprotéases matricielles (MMPs). Les MMPs sont des protéases dont le rôle est de dégrader la matrice extracellulaire. Une régulation fine de ces protéines est nécessaire afin de maintenir un équilibre entre la synthèse et la dégradation de la MEC. Il a été rapporté une diminution du taux de MMPs ainsi qu'une augmentation des taux des inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMPS) dans l'ICFep (González Arantxa *et al.*, 2010; Westermann *et al.*, 2011).

En somme, ce remodelage de la matrice extracellulaire pathologique entraîne des anomalies dans la composition et la qualité de la matrice ainsi qu'une altération du muscle cardiaque. Néanmoins, il est important de noter que la fibrose dans l'ICFep semble être très hétérogène entre les patients (Mohammed *et al.*, 2015a).

b) Atteinte des cardiomyocytes

Les cardiomyocytes subissent également des altérations structurales. L'hypertrophie cardiomyocytaire se caractérise par une augmentation de la taille des cellules, une synthèse accrue de protéines et une réorganisation du sarcomère (Carreño *et al.*, 2006). Un stress mécanique (comme une augmentation de pression) ou oxydatif (lors du processus inflammatoire, entre autres) peuvent induire

une réponse hypertrophique des cardiomyocytes. La voie de signalisation de la GMPc-PKG joue un rôle essentiel dans le système cardiovasculaire. Dans le myocarde, il apparaît que la PKG joue un rôle important dans l'atténuation de l'hypertrophie cardiomyocytaire (Zahabi *et al.*, 2003). Cette voie semble être altérée dans l'ICFEP. En effet, il a été montré une activité de la PKG réduite au niveau du myocarde ainsi qu'une concentration en GMPc diminuée chez des patients atteints ICFEP victimes d'une hypertrophie concentrique (van Heerebeek *et al.*, 2012).

D'un point de vue fonctionnel, un ralentissement cardiomyocytaire est observé. Divers mécanismes sont à l'origine de ce phénomène, dont l'augmentation de la rigidité intrinsèque du cardiomyocyte. Le sarcomère est l'unité organisationnelle de base des protéines contractiles des myocytes. Il est composé de trois protéines majeures : l'actine, la myosine et la titine. La titine est une protéine géante et indispensable à l'assemblage et la stabilité du sarcomère (Kontogianni-Konstantopoulos *et al.*, 2009). Pendant la contraction-relaxation, la titine s'oppose aux forces contractiles produites par la myosine et permet à ces filaments de rester centrés dans le sarcomère (Tskhovrebova *et al.*, 1997). L'élasticité de la titine lui permet de s'étirer et de se raccourcir, régulant ainsi la longueur du sarcomère.

La rigidité de la titine peut être modulée par la variation de ces isoformes ainsi que sa phosphorylation par des protéines kinases. La titine est codée par un seul gène mais un épissage alternatif aboutit à des classes d'isoformes distinctes. Chez l'adulte deux classes existent : la N2BA et la N2B. La titine N2B est plus courte que la N2BA et son extension fractionnaire est plus grande (Trombitás *et al.*, 2000) (**FIGURE 13A**). Cette isoforme est par conséquent plus rigide car de plus grandes forces sont nécessaires pour l'étirer. Le muscle cardiaque adulte coexprime la N2BA et la N2B et le rapport d'expression est d'environ 30/70 respectivement. Une régulation à la hausse de la N2B a été observée chez des patients atteints d'ICFEP et pourrait expliquer, en partie l'augmentation de la rigidité des cardiomyocytes (van Heerebeek Loek *et al.*, 2006).

En parallèle, des modifications post-traductionnelles de la titine fournissent un mécanisme rapide pour moduler sa rigidité. En effet, l'état de phosphorylation de la titine dépendant de la régulation à la hausse ou à la baisse des signalisations des kinases (Linke and Hamdani, 2014), modifie ses propriétés élastiques (Kötter *et al.*, 2013). Ainsi, une phosphorylation dans le domaine N2-BUS par la PKA ou PKG réduit

la rigidité de la titine alors qu'une phosphorylation de la région PEVK l'augmente (Kötter *et al.*, 2013; Hamdani, Herwig and Linke, 2017) (FIGURE 13B).

Dans des biopsies humaine d'ICFEP, il a été montré une hypophosphorylation de l'isoforme N2B au niveau du domaine N2-BUS et une hyperphosphorylation au niveau des sites PEVK (Zile *et al.*, 2015).

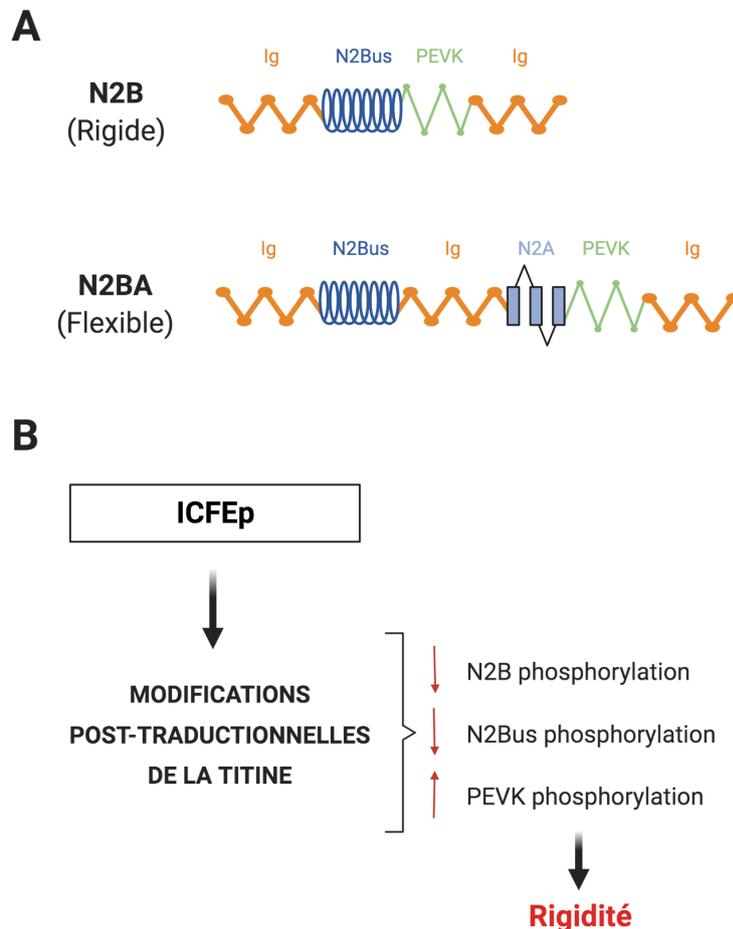


Figure 13. Rôle de la titine dans la rigidité ventriculaire (adapté de Simmonds *et al.*, 2020).

(A) Différentes isoformes de la titine : N2B et N2BA. (B) Modifications post-traductionnelles de la titine.

La relaxation cardiaque dépend également de la régulation calcique, nécessaire au couplage excitation-contraction décrite en B.6. Un niveau de Ca^{2+} élevé est observé dans les myocardiocytes des patients atteints d'ICFEP (Selby *et al.*, 2011), indiquant une réduction de l'élimination de Ca^{2+} ou une surproduction de ce dernier. Malheureusement, aucune étude n'a à ce jour élucidé ce phénomène. Cette augmentation de la concentration calcique intra-cytoplasmique ne semble néanmoins pas être due à une expression ou activité réduite du SERCA2a (Primessnig *et al.*, 2016).

4. Traitements

Jusqu'à présent, aucun essai clinique thérapeutique n'a démontré, de manière convaincante, une réduction de la morbidité ou de la mortalité chez les patients atteints de l'ICFEP. L'hétérogénéité de la maladie, ses différents phénotypes et sa physiopathologie multifactorielle encore à ce jour mal comprise participent grandement aux difficultés à trouver un traitement efficace. Bien que des thérapies médicamenteuses efficaces existent pour l'ICFEP, ces traitements n'ont pas montré la même efficacité chez les patients de l'ICFEP (Owan *et al.*, 2006).

La dysfonction diastolique représente l'altération principale et omniprésente dans l'ICFEP. Ainsi, l'amélioration de la relaxation cardiaque et la réduction de l'hypertrophie sont au cœur des thérapies explorées ces dernières années.

L'inhibition du système rénine angiotensine-aldostérone (SRAA) a démontré des améliorations de la morbidité et de la mortalité chez les patients atteints d'ICFEP. Il a paru alors évident de tester son effet sur la prévention et/ou le traitement de l'ICFEP. L'inhibition du SRAA peut se faire par l'inhibition de l'enzyme de conversion ou par le blocage des récepteurs à l'angiotensine ou de l'aldostérone. Son utilisation est associée à une diminution de la fibrose interstitielle, une amélioration de la pression de l'hémodynamique du VG et un soulagement de la dyspnée. Malheureusement, même si certaines études rapportent des améliorations dans les symptômes et la capacité d'exercice et une diminution du nombre d'hospitalisations au cours de la première année de suivi (Cleland *et al.*, 2006), ces traitements ne montrent pas d'amélioration sur la mortalité et la morbidité.

Le blocage des récepteurs β -adrénergiques avec des β -bloquants permet de diminuer la fréquence cardiaque. L'hypothèse était que le ralentissement de la fréquence cardiaque permettrait d'augmenter le temps de diastole et ainsi le prolongement de la période de remplissage du VG. Malheureusement, il a été montré que les β -bloquants augmentent principalement le temps de diastasis (période située entre le remplissage passif et actif) et ne contribuent donc pas à une augmentation de remplissage de VG (From and Borlaug, 2011). Concernant l'effet des β -bloquants sur les symptômes et la tolérance à l'effort, les données sont contradictoires avec des risques préjudiciables. Dans une étude une diminution des symptômes ainsi qu'une augmentation de la capacité des efforts ont été observées, alors que (Borlaug *et al.*,

2006) ont démontré que pendant l'exercice, les patients obtenaient une réponse chronotrope inadéquate et n'étaient pas en mesure d'augmenter leur débit cardiaque de manière appropriée. Pour l'instant, les preuves de l'efficacité du traitement de l'ICFEP par les β -bloquants font défaut.

Les diurétiques sont largement utilisés afin de réduire la rétention de l'eau et diminuer ainsi la pression auriculaire et réduire les signes et les symptômes de congestion. Néanmoins, les patients ICFEP ont une marge thérapeutique plus étroite que dans l'ICFER puisqu'ils sont plus sensibles aux changements hémodynamiques et qu'une diurèse trop agressive peut entraîner une nouvelle réduction du débit cardiaque, de l'hypotension et une diminution de la fonction rénale (Howard, 2015).

Malheureusement, malgré leur efficacité démontrée dans le traitement de l'ICFER, les β -bloquants, les inhibiteurs de SRAA ou encore les bloqueurs de canaux calciques ont montré des résultats plutôt neutres dans la diminution de la mortalité et de la morbidité des patients atteints d'ICFEP. L'hétérogénéité des patients inscrits dans les essais avec des différences d'étiologies et/ou de stades de la maladie peut être un frein à la recherche de thérapie. En effet, en fonction de la gravité et des comorbidités, les patients ne répondent pas de la même manière au traitement. La sélection de patient relève donc d'un vrai défi et compliqué par le manque d'un consensus pour mieux définir chaque catégorie d'insuffisance cardiaque. Une thérapie unique devant l'hétérogénéité des patients semble difficile. Néanmoins, de nouvelles thérapies prometteuses basées sur la voie NO/PKG/GMPc sont en cours d'évaluation (Pieske *et al.*, 2014).

Il est important de noter que 30% des patients atteints d'ICFEP meurent de causes non-cardiaques (comme d'obstruction des poumons, de maladie rénale chronique ou encore du diabète) en raison de la présence de plusieurs comorbidités. En absence de traitement de l'ICFEP, la prise en charge des patients se concentre actuellement sur les symptômes et la bonne prise en charge des comorbidités. Il est par exemple nécessaire aux patients souffrant d'obésité, de diabète, d'hypertension et de fibrillation auriculaire de réduire leurs poids, de pratiquer une activité physique modérée, de contrôler leur glycémie, leur pression artérielle et leur fréquence cardiaque.

III. Rôle de l'endothélium dans l'ICFep

L'endothélium constitue une interface cellulaire entre le sang circulant et la paroi vasculaire. Les cellules endothéliales sont sensibles aux modifications pathologiques et sont une cible importante des facteurs de risque cardiovasculaire. Elles peuvent subir des modifications fonctionnelles regroupées sous le terme de « dysfonction endothéliale ». La dysfonction endothéliale a de graves conséquences puisqu'elle s'accompagne d'une perte ou d'une grave détérioration des mécanismes homéostatiques de l'endothélium. Elle intervient de manière précoce dans le développement de maladies cardiovasculaires et est un facteur pronostic de mortalité (Katz Stuart D. *et al.*, 2005).

De plus en plus d'études décrivent des dysfonctions de l'endothélium dans l'ICFep directement corrélées à la dysfonction diastolique (Alem, 2019). C'est pourquoi depuis quelques années, l'importance de l'homéostasie des cellules endothéliales dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque est étudiée car elle pourrait être la clé de cibles thérapeutiques.

A. Mécanismes de dysfonction endothéliale

1. Inflammation

L'inflammation est généralement définie comme une réponse biologique locale du système immunitaire déclenchée par divers facteurs (agent pathogène, cellules endommagées, composés toxiques ou irradiation) (Medzhitov, 2010). On parle d'inflammation chronique, ou « bas grade », lorsque la réponse inflammatoire n'est pas spécifique d'un antigène précis, et ne se manifeste pas par des symptômes aigus mais par une augmentation chronique et régulière de la quantité de facteurs pro-inflammatoires. On observe que les patients atteints d'ICFep présentent un état pro-inflammatoire systémique de par l'augmentation plasmatique significative de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF β , l'IL6 ou encore la protéine C-réactive (CRP) (Glezeva *et al.*, 2015). Un taux élevé de monocytes circulant est aussi observé chez ces patients (Glezeva *et al.*, 2015).

Le vieillissement est caractérisé par une détérioration graduelle des fonctions biologiques des systèmes cellulaires. Il est aussi corrélé à un état inflammatoire chronique qui serait dû à une augmentation d'espèces réactives en lien avec un système de défense compromis contre le stress oxydatif ou avec une altération progressive du système immunitaire (Baylis *et al.*, 2013). Les comorbidités cardiovasculaires participent aussi à cet état inflammatoire chronique puisqu'une inflammation de bas grade est également retrouvée chez les patients obèses ou diabétiques (Pereira and Alvarez-Leite, 2014) ou hypertendus (Harrison *et al.*, 2011).

L'inflammation systémique de bas grade impacte directement les fonctions de l'endothélium. En effet, un recrutement anormal de monocytes au niveau du cœur est observé (Hulsmans *et al.*, 2018). Ce dernier est favorisé par l'expression accrue de molécules d'adhérences telles que l'E-sélectine, la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1) ou encore la molécule d'adhésion vasculaire (VCAM1) par les cellules endothéliales. Les protéines d'adhésion cellulaire font partie de la famille des immunoglobulines et interviennent dans le mécanisme de liaison cellulaire. Elles participent notamment à l'augmentation de l'infiltration de leucocytes vers le parenchyme. L'inflammation chronique de bas grade favorise ce phénomène puisqu'un certain nombre de cytokines inflammatoires augmentent l'expression des molécules d'adhérence (Sutton, Baek and Pinsky, 2014). Cette activation de l'endothélium, normalement au repos, affecte sa fonction de barrière. Les protéines d'adhésion cellulaire sont augmentées dans l'ICFep et auraient comme conséquences directes une progression de la fibrose et une augmentation du stress oxydant (Paulus and Tschöpe, 2013).

Une raréfaction microvasculaire coronaire (densité capillaire myocardique réduite) est également observée dans l'ICFep (Mohammed *et al.*, 2015a). La raréfaction microvasculaire semble en lien direct avec la dysfonction endothéliale et l'inflammation puisque sa gravité est associée à la gravité de la fibrose myocardique (Mohammed, Majure and Redfield, 2016; Anyfanti *et al.*, 2018) et contribue au dysfonctionnement diastolique.

2. Stress oxydant

Le stress oxydant (ou stress oxydatif) est défini par un déséquilibre entre les systèmes de production et de régulation des espèces réactives. Les radicaux libres sont des molécules instables et hautement réactives aux électrons non-appariés. Ces molécules peuvent attirer, ou au contraire émettre, des électrons d'autres molécules ce qui produit des réducteurs ou des oxydants. Les radicaux libres oxygénés (ERO ou ROS en anglais pour reactive oxygen species) et le monoxyde d'azote (NO) sont les plus importants en biologie. Parmi les ROS on retrouve l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (OH^-) ou encore le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) bien qu'il ne soit pas un radical libre à proprement parler car il ne possède pas d'électron célibataire. Lorsque les systèmes de défense antiradicalaire sont dépassés soit en raison d'une augmentation de la production de ROS et/ou une diminution des défenses, un stress oxydatif se produit. La surproduction d'espèces réactives oxygénées va impacter de façon délétère les constituants cellulaires. Les sites radicalaires peuvent entraîner des mutations ponctuelles au sein de l'ADN, modifier la conformation de certaines protéines par oxydation ou encore ébranler la fluidité membranaire en ciblant les chaînes d'acides gras.

Bien que les espèces réactives soient toxiques et impliquées dans de nombreuses pathologies, une production contrôlée de ces radicaux est essentielle à la signalisation et au maintien de l'homéostasie cellulaire. A faible dose, les ROS peuvent agir comme des molécules de signalisation qui soutiennent la prolifération ou encore la différenciation cellulaire (Janssen-Heininger *et al.*, 2008).

Les ROS peuvent être produits lors de réactions catalysées par des enzymes comme la NADPH oxydase (NOX), la Xanthine oxydase ou encore l'oxyde nitrique synthase (NOS), mais c'est la mitochondrie qui représente la source majeure de radicaux libres. En effet, leur production est essentielle au métabolisme cellulaire de l'oxygène et aux réactions d'oxydoréduction. On estime qu'environ 0,2 à 2% de l'oxygène utilisé par la chaîne respiratoire mitochondriale (qui permet la synthèse d'ATP) est transformé en O_2^- . Instable, l' O_2^- va être rapidement modifié par des enzymes antioxydantes telles que les superoxyde dismutases (SOD), capables de former de l' H_2O_2 , plus stable. L' H_2O_2 peut ensuite être pris en charge par les catalases (pour former de l'eau) ou être

converti en OH^\cdot en présence de Fe^{2+} (ion fer II) ou Cu^{2+} (ion cuivre). O_2^\cdot peut aussi réagir avec le NO et former un anion peroxytrite (ONOO^-) (FIGURE 14).

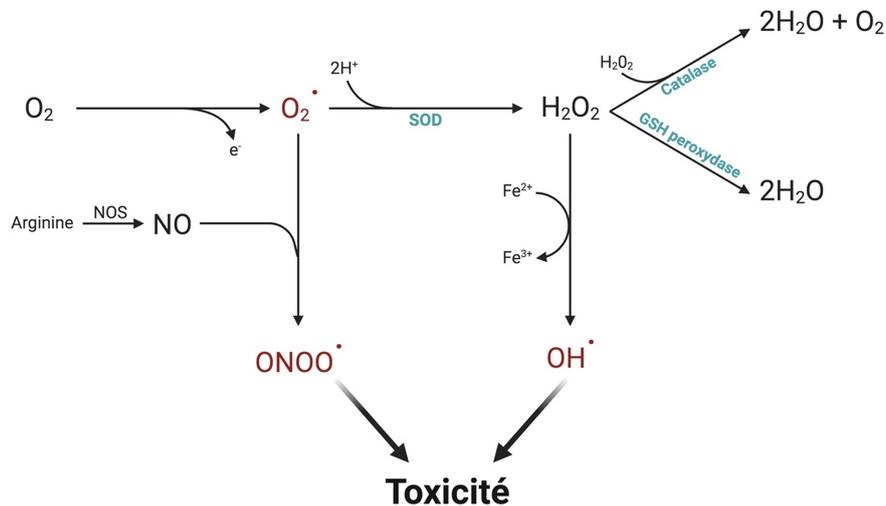


Figure 14. Formation d'espèces réactives de l'oxygène

O_2 : dioxygène, O_2^\cdot : anion superoxyde, H_2O : eau, H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène, NO : monoxyde d'azote, OH^\cdot : radical hydroxyl, ONOO^\cdot peroxytrite, SOD : superoxyde dismutase. GSH : glutathion.

En plus d'être toxique pour la cellule, la surproduction de ROS aggrave la dysfonction endothéliale en induisant la synthèse de molécules d'adhésion renforçant ainsi le passage anormal de leucocytes dans le parenchyme (Deem and Cook-Mills, 2004).

Le diabète est très associé à une production excessive de ROS puisque le stress oxydatif est l'une des premières réponses cellulaires face à une hyperglycémie (Incalza *et al.*, 2018). Dans ce cas, le stress oxydatif est dû à l'expression régulée à la hausse de la NADPH oxydase (Guzik *et al.*, 2002). Sans surprise, une augmentation du stress oxydant est également retrouvée chez les patients ICFEp avec une augmentation de la production d' O_2^\cdot et H_2O_2 au niveau du myocarde (Franssen *et al.*, 2016).

3. Voie NO

Le NO est un gaz radicalaire soluble capable de diffuser facilement entre les cellules et les tissus. Il possède des propriétés vasodilatatrices mais également cardioprotecteurs. Il est synthétisé à partir de la L-arginine et d'oxygène par une famille d'enzymes, les nitrique oxyde synthases (NOS) (Bruckdorfer, 2005). Il existe trois isoformes de NOS :

- La NOS neuronale, nNOS (ou NOS 1), qui produit du NO dans les terminaisons axonales du système nerveux autonome.
- La NOS inductible, iNOS (ou NOS 2), dont l'expression est régulée par un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires.
- La NOS endothéliale, eNOS (ou NOS 3), constitutivement exprimée dans l'endothélium.

L'expression des nNOS et eNOS est dépendante du calcium et ces enzymes constitutives produisent continuellement de faibles niveaux de NO. A l'inverse, iNOS, indépendante du calcium, voit son expression induite par des cytokines inflammatoires et produit de grandes quantités de NO (environ 1000 fois plus que l'eNOS ou la nNOS) (Strijdom, Chamane and Lochner, 2009).

Des trois isoformes, eNOS apparait comme étant la forme principale responsable de la production de NO au niveau du système cardiovasculaire, en particulier dans les cellules endothéliales.

Les contraintes de cisaillement sont des stimuli physiologiques importants pour la production de NO : en cas de hausse du débit sanguin, une augmentation de la production de NO permet la vasodilatation du vaisseau ce qui diminue les contraintes de cisaillement que subissent les cellules endothéliales. Le NO permet aussi la diminution de l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales, empêchant ainsi l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium et l'agrégation plaquettaire (Carreau, Kieda and Grillon, 2011; Hamilos, Petousis and Parthenakis, 2018). En plus d'avoir des actions vasodilatatrice, anti-thrombotique, anti-athéromateuse et anti-inflammatoire, le NO agit directement sur l'homéostasie des cellules contractiles cardiaques.

En effets, le NO est le premier messenger de la voie de signalisation NO/cGMP/PKG et ses effets dépendent de sa concentration. Au repos, la concentration de NO est faible ce qui provoque un effet inotrope positif sur la contraction cardiaque. A l'effort ou en condition pathologique, la concentration de NO est forte et induit un effet inotrope négatif.

Au niveau des cardiomyocytes, l'activation de la guanylate cyclase soluble par le NO permet la production de la protéine kinase GMPc. L'augmentation du taux intracellulaire de GMPc active la protéine kinase G qui permettra la relaxation cellulaire par la phosphorylation de la titine et la recapture de Ca^{2+} dans le RS (Schulz *et al.*, 2008; Krüger *et al.*, 2009). En parallèle, la signalisation de PKG semble jouer un rôle important dans la lutte contre l'hypertrophie cardiomyocytaire (Takimoto, 2012a).

Plusieurs phénomènes peuvent déséquilibrer la production de NO. C'est par exemple le cas de l'augmentation de la production de ROS observée dans l'ICFep. En effet, lors de stress oxydant, le NO peut interagir avec d'autres molécules radicalaires lorsque leurs concentrations sont augmentées. L'interaction du NO avec l' O_2^- en excès, forme du peroxy-nitrite l'ONOO-, dont la surproduction est toxique pour la cellule. Un phénomène de « découplage de la NOS » peut aussi se produire en condition de stress oxydant. Dans des conditions physiologiques, la eNOS est sous forme d'un homodimère actif et permet la production de NO. En cas d'augmentation de ROS, ou d'apport insuffisant en arginine, les deux sous-unités de la NOS produiront indépendamment et de manière simultanée du NO et de l' O_2 . Le peu de NO synthétisé va alors interagir avec l' O_2^- pour former de l'ONOO- (Rasmusen, Cynober and Couderc, 2005). En plus d'être cytotoxique, l'ONOO- participe au découplage de la eNOS, ce qui entretient un cercle vicieux allant à l'encontre de la production de NO (Zou, Shi and Cohen, 2002) (**FIGURE 15**). L'activité de la eNOS peut aussi être régulée par des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation (Bátori *et al.*, 2017).

La diminution de la biodisponibilité du NO peut donc être la conséquence d'une diminution de l'expression et/ou de l'activité de la eNOS ou bien de sa réaction avec des radicaux libres.

Tous ces phénomènes aboutissent à une diminution de NO qui aura une conséquence directe sur la vasorelaxation des vaisseaux mais aussi sur la relaxation et la taille des

cardiomyocytes. Les facteurs de risques et comorbidités participent activement à ce phénomène. Il a par exemple été montré une diminution de l'activité de la eNOS ainsi que la sGC avec l'âge (Herrera *et al.*, 2010). Le diabète et l'hypertension sont tous deux associés au stress oxydatif, ce qui impactera directement la production de NO (Avogaro, de Kreutzenberg and Fadini, 2008; Tang and Vanhoutte, 2010).

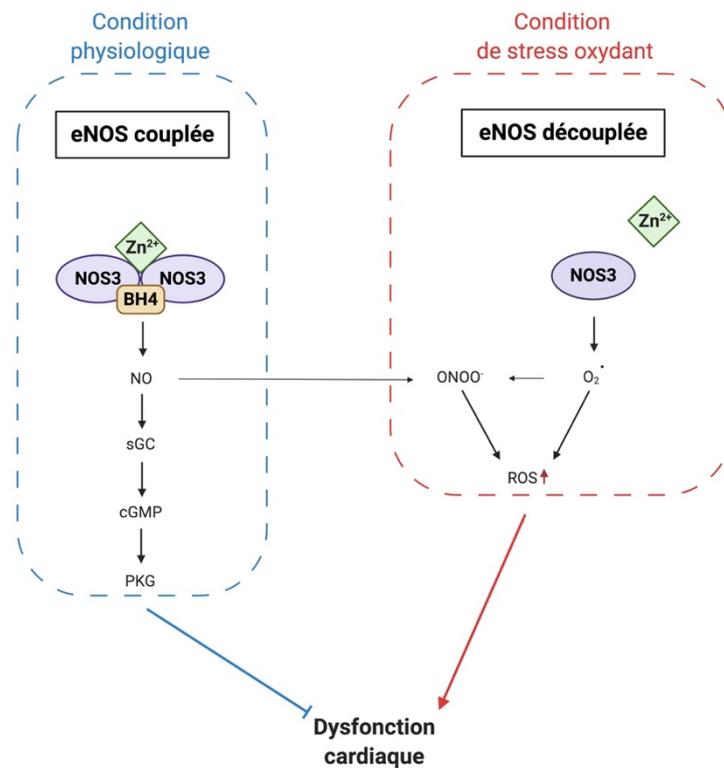


Figure 15. Fonctionnement de la eNOS en condition physiologique (eNOS couplée) et lors d'un stress oxydant (eNOS découplée).

eNOS : nitric oxide synthase endothéliale, BH4 : tétrahydrobioptérine, NO : monoxyde d'azote, sGC : guanylate cyclase soluble, GMPc : guanosine monophosphate cyclique, PKG : protéine kinase GMPc dépendante, ROS : reactive oxygen species, O₂⁻ : anion superoxyde, ZN²⁺ : ion zinc, NOS3 : Nitric oxide synthase 3.

En 2013, Paulus a proposé un nouveau paradigme selon lequel l'inflammation systémique de bas grade observée chez le patient ICFEp se répercuterait au niveau de la microcirculation coronaire et provoquerait une activation des cellules endothéliales ainsi qu'un stress oxydant. D'une part, ce stress oxydant aura un impact direct sur la signalisation du NO dans le myocarde (la diminution de sa biodisponibilité entrainerait des perturbations de la relaxation et une hypertrophie des cardiomyocytes), d'autre part, l'activation endothéliale caractérisée par l'expression de facteurs d'adhésions favoriserait le passage anormal de leucocytes dans le

parenchyme entraînant le dépôt de collagène, et donc la progression de la fibrose (Paulus and Tschöpe, 2013) (FIGURE 16).

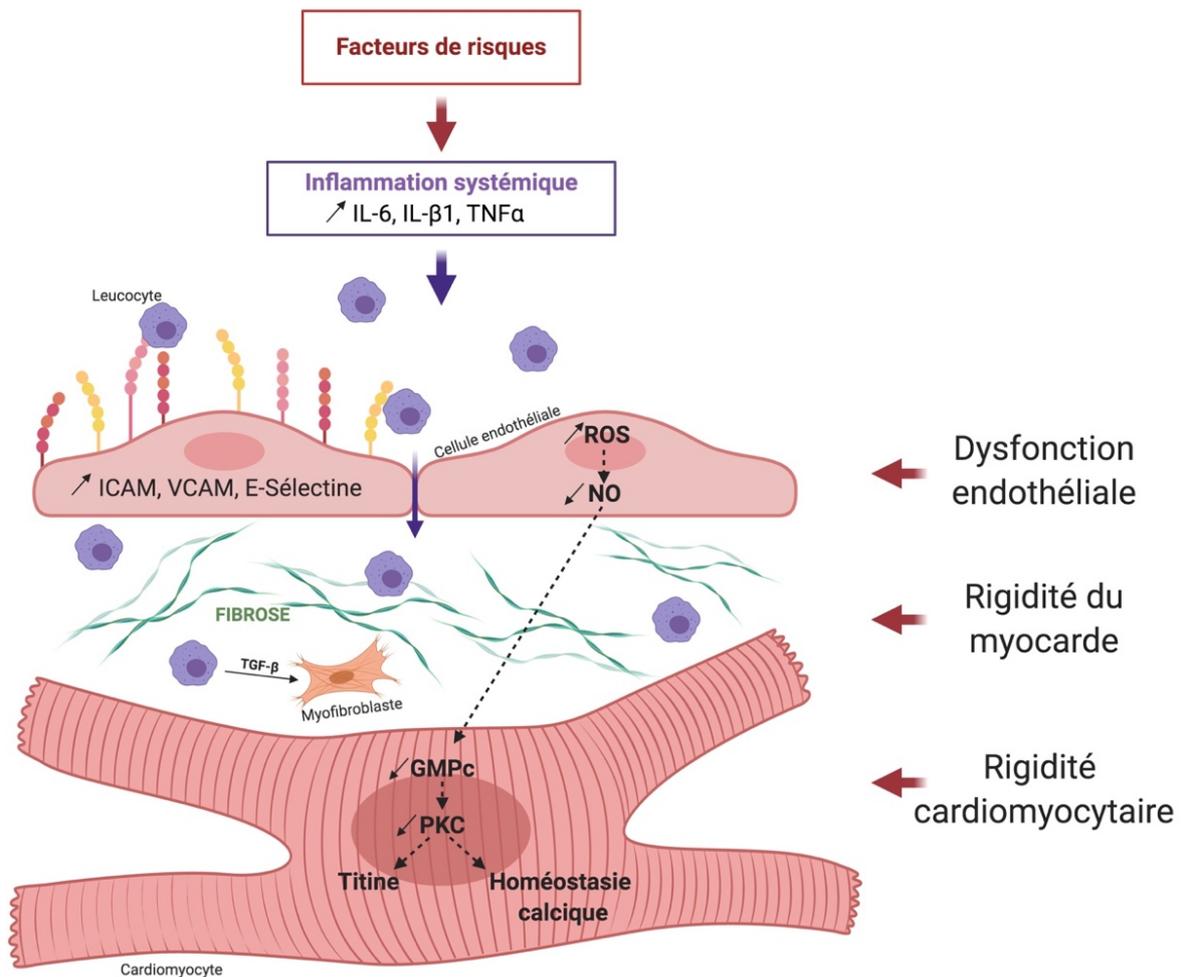


Figure 16. Paradigme proposé pour expliquer la physiopathologie de l'ICFEP (adapté de Paulus and Tschöpe, 2013).

Les comorbidités induisent un état pro-inflammatoire systémique. En réaction à cet état, les cellules endothéliales microvasculaires coronaires produisent des espèces d'oxygène réactif (ROS) et des molécules d'adhésion cellulaire (ICAM, VCAM, E-sélectine). La production de ROS conduit à la réduction de la biodisponibilité du nitricoxyde (NO) qui diminue la concentration de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) ainsi que l'activité de la protéine kinase PKG dans les cardiomyocytes adjacents. Une faible activité PKG augmente la rigidité des cardiomyocytes en raison de l'hypophosphorylation de la titine, l'altération de l'homéostasie calcique et la suppression du frein aux stimuli prohypertrophiques induisant une hypertrophie cardiomyocytaire. L'expression des molécules d'adhésion favorise la migration dans le sous-endothélium des monocytes. Ces monocytes libèrent le facteur de croissance transformant (TGF- β) qui stimule la conversion des fibroblastes en myofibroblastes qui, déposent du collagène dans l'espace interstitiel.

B. Interaction CE/CM

Dans le cœur adulte, les capillaires sont répartis dans tout le myocarde et entourent les cardiomyocytes. Les CE constituant les capillaires présentent un appareil de Golgi bien développé associé à de nombreuses vésicules suggérant que ces cellules sont métaboliquement hautement actives (Brutsaert *et al.*, 1996). La communication CE/CM peut se faire de façon paracrine par la sécrétion de protéines, ARN messagers, facteurs de transcription, via l'échange de microvésicules, ou encore de façon juxtacrine, même si ce type d'interaction est pour l'instant très peu décrit (FIGURE 17). En plus d'apporter de l'oxygène et des nutriments nécessaires à l'homéostasie des CM, les CE cardiaques sécrètent une multitude de protéines cardioprotectrices capables de moduler la contractilité cardiaque et le remodelage des CM.

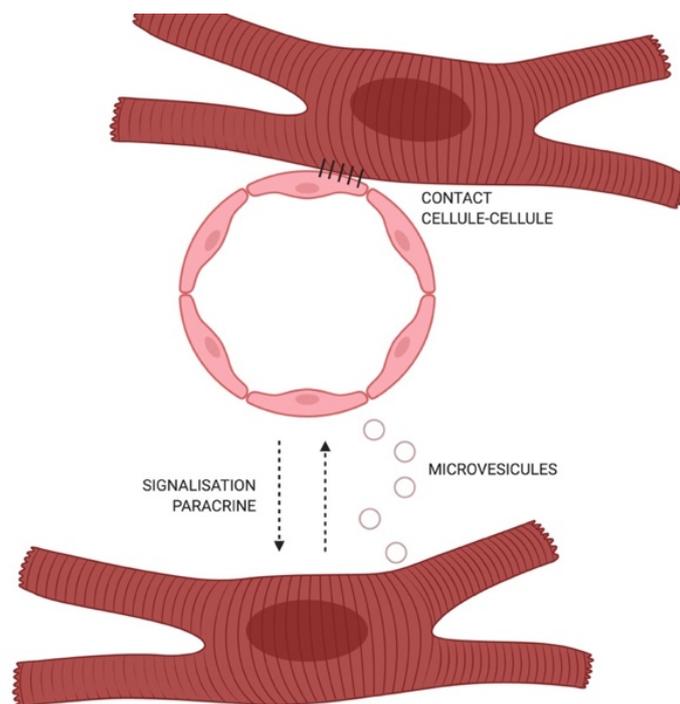


Figure 17. Les différentes méthodes de communication possibles entre cellules endothéliales et cardiomyocytes.

Plusieurs études ont montré que le dialogue CE/CM est requis pour un développement normal du système cardio-vasculaire. En effet, les CE contribuent directement au développement du myocarde. La suppression du gène de facteur de croissance dérivé des plaquettes B (PDGFB) spécifiquement dans les cellules endothéliales provoque des anomalies cardiaques majeures avec notamment un amincissement de la paroi

myocardique, une dilatation des chambres et des anomalies septales (Bjarnegård *et al.*, 2004). La neuréguline-1 (NRG1) sécrétée par les CE se lie aux récepteurs ErbB2 et ErbB4 des cardiomyocytes et contribue essentiellement à la formation de coussins endocardiques et de trabécules myocardiques (Meyer and Birchmeier, 1995).

Les CM sont capables de moduler le développement et la croissance de vaisseaux. Une réduction de l'expression du VEGF dans les CM aboutit à des souris viables présentant un nombre réduit de microvaisseaux coronaires, des parois ventriculaires amincies, une fonction contractile diminuée et des signes d'ischémie (Giordano *et al.*, 2001). Le VEGF dérivé des cardiomyocytes joue donc un rôle crucial dans le développement vasculaire coronaire et dans la détermination de la fonction cardiaque adulte. L'angiopoïétine-1 (ang1) dérivée des CM joue également un rôle dans le développement des vaisseaux cardiaques car 90% des souris surexprimant cette protéine dans les CM meurent entre E12,5 et E15,5 d'hémorragie cardiaque. Les souris présentent des malformations cardiaques majeures dont une absence d'artères coronaires (Ward *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent que les niveaux d'Ang1 sont finement réglementés et nécessaires au cours du développement cardiaque.

L'étude de tissus cardiaques artificiels a permis une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires du développement cardiaque et de l'importance du dialogue CE/CM. Bien qu'il soit difficile de reconstruire l'architecture complexe du muscle cardiaque ainsi que sa fonction mécanique, les modèles *in vitro* permettent de simplifier le modèle et de mieux contrôler les différentes variables. Les CM générés à partir de cellules souches pluripotentes humaines (hPSC) sont immatures dans leur structure et leur fonction. Il a été montré que la co-culture de ces cellules avec des CE issues de cellules progénitrices cardiaques (CPC) accélère la maturation des CM. En effet, ces derniers augmentent de taille et voient l'expression de protéines de sarcomères et de canaux ionique augmentée (Dunn *et al.*, 2019). Une autre étude a montré que l'ensemencement de CM néonataux de souris sur un réseau préformé de CE (isolées à partir de cœurs et poumons) favorise une organisation des CM le long des structures vascularisées, et inhibe l'apoptose et la nécrose des CM. De plus, les CE promeuvent l'expression de la connexine 43 (Cx43) au niveau des cardiomyocytes et favorise leur contraction synchronisée. Fait intéressant, cet article montre que des jonctions CE-CM via la Cx43 peuvent exister même si ces jonctions hétérocellulaires n'ont jamais été décrites dans un tissu cardiaque (Narmoneva *et al.*, 2004). Dans

l'ensemble, l'étude de ces modèles allant de la simple co-culture jusqu'aux organoïdes démontre un rôle majeur des CE pour la survie ainsi que la maturation structurelle et fonctionnelle des CM.

Dans le cœur adulte, les CE libèrent divers facteurs contrôlant la contractilité des CM. En plus du NO dont nous avons parlé précédemment, les CE cardiaques produisent également abondamment de l'endothéline-1 (ET-1) un puissant vasoactif qui se lie aux récepteurs à l'endothéline ET_A et -_B des CM et induit un effet inotrope positif (Rich and McLaughlin, 2003). Une multitude de protéines produites par les CE comme l'angiotensine 2, les prostaglandines ou l'apeline jouent un rôle dans la contraction cardiaque. D'autres facteurs sécrétés par les CE sont capables de moduler l'hypertrophie des CM ainsi que leur survie (Segers, Brutsaert and De Keulenaer, 2018).

Malheureusement, moins de choses sont connues sur les protéines produites par les CM capables de réguler les CE. Les CM produisent des protéines connues pour contrôler le tonus vasculaire comme le NO, l'ET-1 ou encore l'urocortine. L'ET-1, se fixe aux récepteurs ET_B exprimés par les CE et stimule la libération de NO (Tirziu, Giordano and Simons, 2010).

Le cœur est un organe capable de subir des remodelages. Comme nous l'avons vu, une surcharge de pression induit une hypertrophie des CM. La grossesse ou encore des exercices sportifs extrêmes et répétés peuvent aussi provoquer une hypertrophie physiologique dite adaptative. Cette hypertrophie est réversible et s'accompagne d'une augmentation de la taille des CM et d'une angiogenèse accrue en absence de fibrose. Les CM subissant cette hypertrophie compensatrice produisent des facteurs pro-angiogéniques stimulant la croissance de vaisseaux sanguins afin de fournir suffisamment de nutriment au myocarde croissant (Zentilin *et al.*, 2010).

Ces dernières années, les recherches sur le dialogue CE/CM mettent en lumière l'importance d'une bonne communication entre ces deux types cellulaires pour un bon fonctionnement cardiaque (FIGURE 18). Il paraît évident qu'une dysfonction endothéliale aura un impact important sur la communication CE/CM et pourrait intervenir dans la progression de l'insuffisance cardiaque.

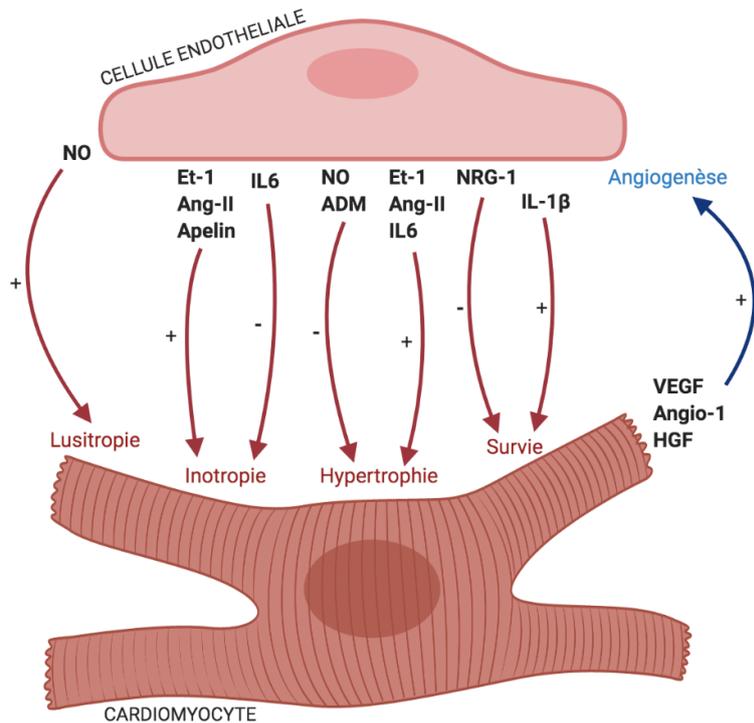


Figure 18. Communications paracrines entre cellules endothéliales et cardiomyocytes et leurs effets sur le système cardiovasculaire (Adapté de Segers et al., 2018 et Talman and Kivelä, 2018).

IV. Voie Wnt et maintien de l'intégrité endothéliale

La voie Wnt est extrêmement bien conservée et initie une cascade de signalisations cruciales pendant le développement embryonnaire mais aussi tout au long de la vie adulte. Elle régule plusieurs processus biologiques et cellulaires comme la prolifération, l'apoptose, la différenciation ou encore la polarité. Elle est indispensable au sein de l'endothélium pour le maintien de l'intégrité des microvaisseaux. De part ces implications dans pratiquement tous les systèmes tissulaires, de nombreux travaux ont démontré ces dernières années des implications de cette voie dans des processus pathologiques. La signalisation Wnt est complexe avec dix-neuf protéines Wnt solubles capables de se lier à dix récepteurs Frizzled différents. Lors de mon travail de thèse, je me suis intéressée plus particulièrement à un acteur de la voie Wnt non-canonique. L'idée était de moduler cette voie au sein des cellules endothéliales afin d'altérer leur homéostasie et créer ainsi une altération de la fonction endothéliale.

A. Généralités sur la voie Wnt

La signalisation Wnt se compose de deux voies principales : une voie canonique impliquant la β -caténine et une voie Wnt non canonique.

1. La voie canonique

La β -caténine est une protéine multifonctionnelle capable d'agir comme un facteur de transcription dans la signalisation Wnt canonique. Elle possède aussi des fonctions structurales puisqu'elle permet l'association de la N- ou VE-cadhérine au cytosquelette au niveau des jonctions adhérentes (Valenta, Hausmann and Basler, 2012). La β -caténine joue un rôle central dans la voie Wnt canonique car c'est son accumulation nucléaire qui détermine l'activation de cette voie (FIGURE 19).

En l'absence de signalisation Wnt, la β -caténine est principalement associée aux complexes jonctionnelles, et sa concentration cytosolique est maintenue basse par un complexe de destruction (Archbold *et al.*, 2012). Le complexe de destruction comprend quatre protéines majeures, bien qu'il puisse y en avoir d'autres. L'Axine, est une protéine d'échafaudage qui sert de site d'ancrage pour la β -caténine ainsi qu'aux autres protéines du complexe (Hart *et al.*, 1998). L'Adenomatous Polypispos Coli (APC) est une protéine de liaison qui permet aux deux kinases la caséine kinase 1α (CK1 α) et la glycogène synthase kinase 3β (GSK3 β) de phosphoryler séquentiellement la β -caténine (Stamos and Weis, 2013). La dégradation de cette dernière se passe en plusieurs étapes : la protéine est d'abord séquestrée par les protéines Axine et APC (Hart *et al.*, 1998) puis phosphorylée sur son extrémité N-terminale par les kinases CK1 α et GSK3 β . Bien que l'ordre exact de la phosphorylation de la β -caténine soit encore flou, il semblerait que la phosphorylation de la sérine 45 par la CK1 α permettrait la phosphorylation ultérieure des sérines 33, 37 et la thréonine 41 par la GSK3 β (Ha *et al.*, 2004; Stamos and Weis, 2013). Ces modifications post-traductionnelles entraînent le recrutement et la poly-ubiquitination de la β -caténine par l'E3-ubiquitine-ligase E3 β -TrCP et son adressage vers le protéasome pour la dégradation. Ce phénomène permet de maintenir un niveau bas de β -caténine cytoplasmique et une transcription régulée par la voie Wnt désactivée (Nelson and Nusse, 2004).

Les ligands Wnt se lient à la fois aux récepteurs transmembranaires Frizzled (Fz) et LRP5/6 qui recrutent la protéine cytoplasmique Disheveled (Dvl). Dvl est une protéine modulaire qui joue un rôle clé dans les voies de signalisation Wnt canonique et non-canonique. Elle contient trois domaines distincts : un domaine DIX capable d'interagir avec l'Axine (Schwarz-Romond, Metcalfe and Bienz, 2007), un domaine PDZ requis pour l'interaction avec les récepteurs Fz et autres protéines contenant des domaines PDZ (Gao and Chen, 2010), et un domaine DEP qui intervient également dans les interactions protéine-protéine (Wong *et al.*, 2000). Un modèle classique propose que l'activation de la signalisation canonique entraîne la phosphorylation de la protéine Dvl qui se lie à l'Axine (Clevers and Nusse, 2012). Le rapprochement du complexe de dégradation à la membrane plasmique permet une proximité entre la kinase GSK3 β et LRP5/6. La kinase va alors phosphoryler le récepteur LRP5/6 créant un site de liaison pour le complexe de destruction à la membrane et l'inhibition de la GSK3 β (Mao *et al.*, 2001; Cselenyi *et al.*, 2008). Cela régulerait à la baisse l'activité du complexe de destruction. Néanmoins, les mécanismes principaux de la régulation négative ne sont pas encore clairs, car les données soutiennent divers mécanismes comme le désassemblage du complexe de destruction (Liu, Rubin and Kimmel, 2005; Roberts *et al.*, 2011), l'inhibition de GSK3 β par LRP5/6 (Stamos *et al.*, 2014) ou la dégradation de l'Axine (Lee *et al.*, 2003). En 2010 un nouveau modèle d'activation propose que le complexe de destruction recruté à la membrane plasmique subit avec le complexe Wnt/Fz/LRP une endocytose, formant un endosome précoce qui finit par fusionner avec un corps multivésiculaire (Taelman *et al.*, 2010). Cela entraînerait le piégeage et la séparation physique du complexe de destruction de la β -caténine. Plusieurs études ont identifié un domaine régulateur dans l'APC, le domaine inhibiteur de la β -caténine (DIC) qui semble être essentiel à la régulation à la baisse des niveaux de β -caténine (Roberts *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2013). Une étude plus récente a proposé que la phosphorylation par la GSK3 β autour de la région DIC entraînerait un changement de conformation de la protéine APC qui permet normalement l'accessibilité de la ligase E3 à la phospho- β -caténine (Pronobis, Rusan and Peifer, 2015).

Quels que soient les mécanismes d'action, ces événements seraient le signal de la levée d'inhibition de la β -caténine qui verra sa phosphorylation diminuée et se retrouvera donc stabilisée. La β -caténine s'accumule dans le cytoplasme et est transloquée dans le noyau de la cellule. La présence nucléaire de la β -caténine est

importante dans l'assemblage de complexes avec des protéines nucléaires afin d'activer les gènes cibles de la voie Wnt. Les principales protéines de liaison à l'ADN présentes dans ces complexes sont les facteurs de transcription TCF (T-Cell Factor) /LEF (Lymphoid Enhancer binding Factor respectivement) (Cadigan and Waterman, 2012). En absence de β -caténine, les protéines TCF/Lef sont liées aux répresseurs de transcription de la famille TLE/Groucho (G. Chen and Courey, 2000). Le complexe TLE/TCF conduit à la condensation de la chromatine et une répression génique (Jennings and Ish-Horowicz, 2008). Lorsque la β -caténine est présente, elle déplace le TLE et forme un complexe avec des protéines TCF liées à l'ADN qui recrute des activateurs de transcription (Guoqing Chen and Courey, 2000).

Les gènes cibles de la voie β -caténine/dépendante sont divers et spécifiques du contexte cellulaire. La voie de signalisation Wnt canonique joue un rôle crucial dans la mise en place de l'embryon par la régulation de gènes *Siamois* et *Twin* (Hikasa and Sokol, 2013). Elle joue aussi un rôle clé du cycle cellulaire en modulant des gènes tels que la Cycline D1 (Tetsu and McCormick, 1999) ou encore c-Myc (He *et al.*, 1998). La signalisation de Wnt a été un sujet majeur de recherche pour traiter les cancers puisqu'une signalisation Wnt/ β -caténine aberrante est observée dans la carcinogenèse. De façon intéressante les composants de la signalisation Wnt eux-mêmes, comme Fz, LRP6, Axine, TCF/LEF sont aussi régulés positivement ou négativement par TCF/ β -caténine (MacDonald, Tamai and He, 2009). Ces diverses boucles d'autorégulation de la voie Wnt ajoutent une complexité supplémentaire dans le contrôle des réponses Wnt.

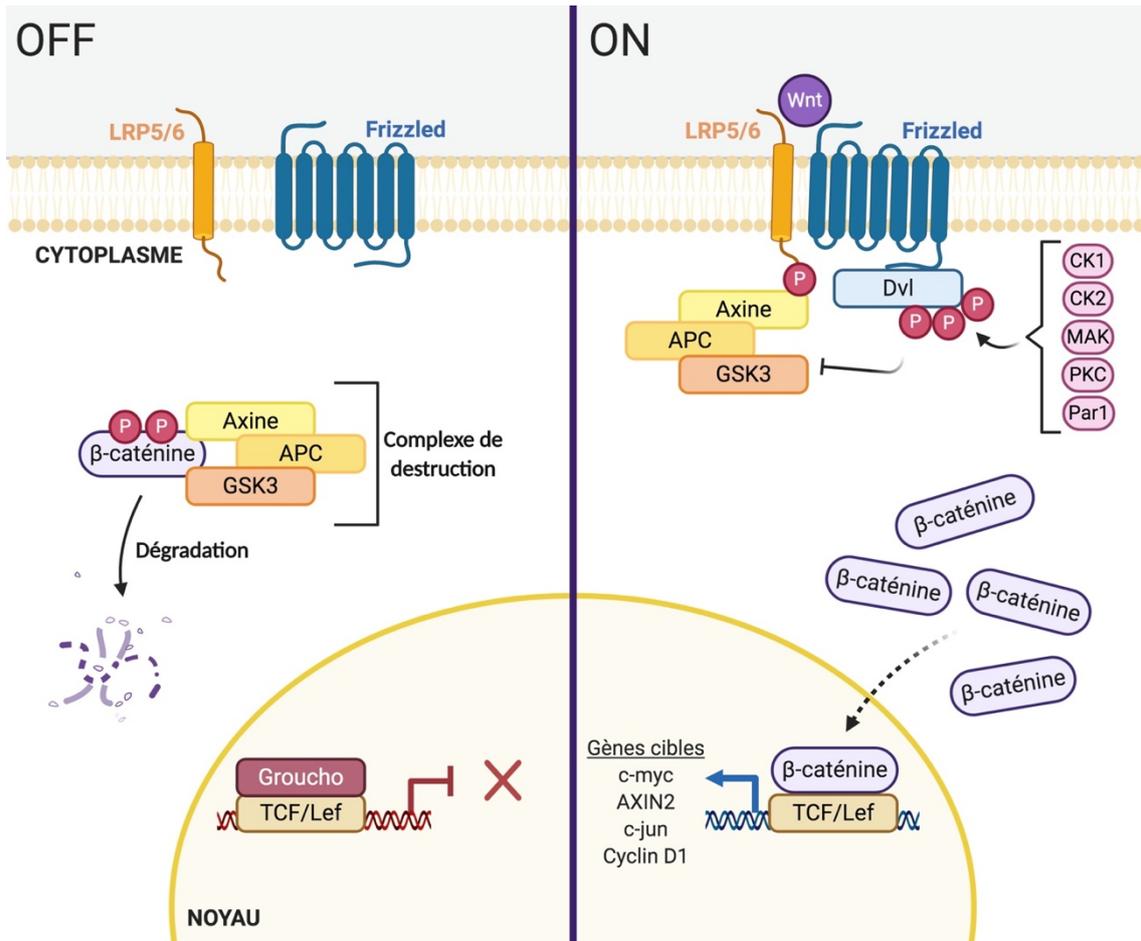


Figure 19. Schéma classique de la voie Wnt/Fz canonique dite β -caténine-dépendante.

La liaison d'un ligand Wnt aux récepteurs Frizzled et LRP5/6 entraîne la migration du complexe de destruction à la membrane alors incapable de séquestrer la β -caténine cytoplasmique. La diminution de la dégradation de la β -caténine conduit à son accumulation et sa translocation nucléaire ou elle peut initier la transcription des gènes cibles. LRP5/6 : low-density lipoprotein receptor-related protein, APC : adenomatous polyposis coli, GSK3 : glycogène synthase kinase 3, TCF : T-Cell Factor, Lef : lymphoid enhancer binding Factor, Dvl : disheveled,

2. La voie non-canonique : la Polarité Cellulaire Planaire.

La voie de signalisation non-canonique est souvent appelée voie indépendante de la β -caténine et se divise en deux voies distinctes : la voie de Polarité Cellulaire Planaire (PCP) et la voie dépendante du Calcium (Wnt/ Ca^{2+}). Leur activation conduit généralement à l'inhibition de la voie canonique (Grumolato *et al.*, 2010). Dans ce manuscrit nous détaillerons seulement la voie non-canonique dite de Polarité Cellulaire Planaire.

La voie PCP permet la polarisation des structures et une migration cellulaire dirigée par la régulation du cytosquelette d'actine. Cette voie est induite par les récepteurs Fz qui permettent le recrutement de Dvl à la membrane. Contrairement à l'activation de la voie canonique, ce signal semble indépendant du co-récepteur LRP5/6. A l'heure actuelle, les co-récepteurs de Fz dans la signalisation non-canonique sont encore méconnus mais quelques-uns comme NRH1 (Sasai *et al.*, 2004), Ryk (W. Lu *et al.*, 2004), PTK7 (X. Lu *et al.*, 2004) ou encore ROR2 (Nishita *et al.*, 2006) ont été identifiés. La relocalisation et l'activation de Dvl à la membrane permet l'activation de 2 voies parallèles impliquant les petites GTPase Rho et Rac (Wallingford and Habas, 2005).

La signalisation de Rho implique Daam1 qui se lie au domaine PDZ de Dvl (Habas, Kato and He, 2001) et conduit à l'activation de la Rho-associated kinase (ROCK) (Amano, Nakayama and Kaibuchi, 2010) qui est l'un des principaux régulateurs du remodelage du cytosquelette d'actine. L'activation de Rac elle, nécessite le domaine DEP de Dvl et stimule l'activité de la kinase N-terminale de c-Jun (c-Jun N-terminal kinase ou JNK) (Habas, Dawid and He, 2003). Dans les deux cas, les éléments du cytosquelette tels que l'actine et les microtubules sont modulés, amenant à un réarrangement du cytosquelette (van Amerongen and Nusse, 2009) (FIGURE 20).

Ces dernières années un nouveau partenaire intracellulaire de la voie Wnt a été mis en évidence par le laboratoire. Il s'agit de l'ubiquitine ligase PDZRN3 qui est capable d'interagir avec la protéine adaptatrice Dvl.

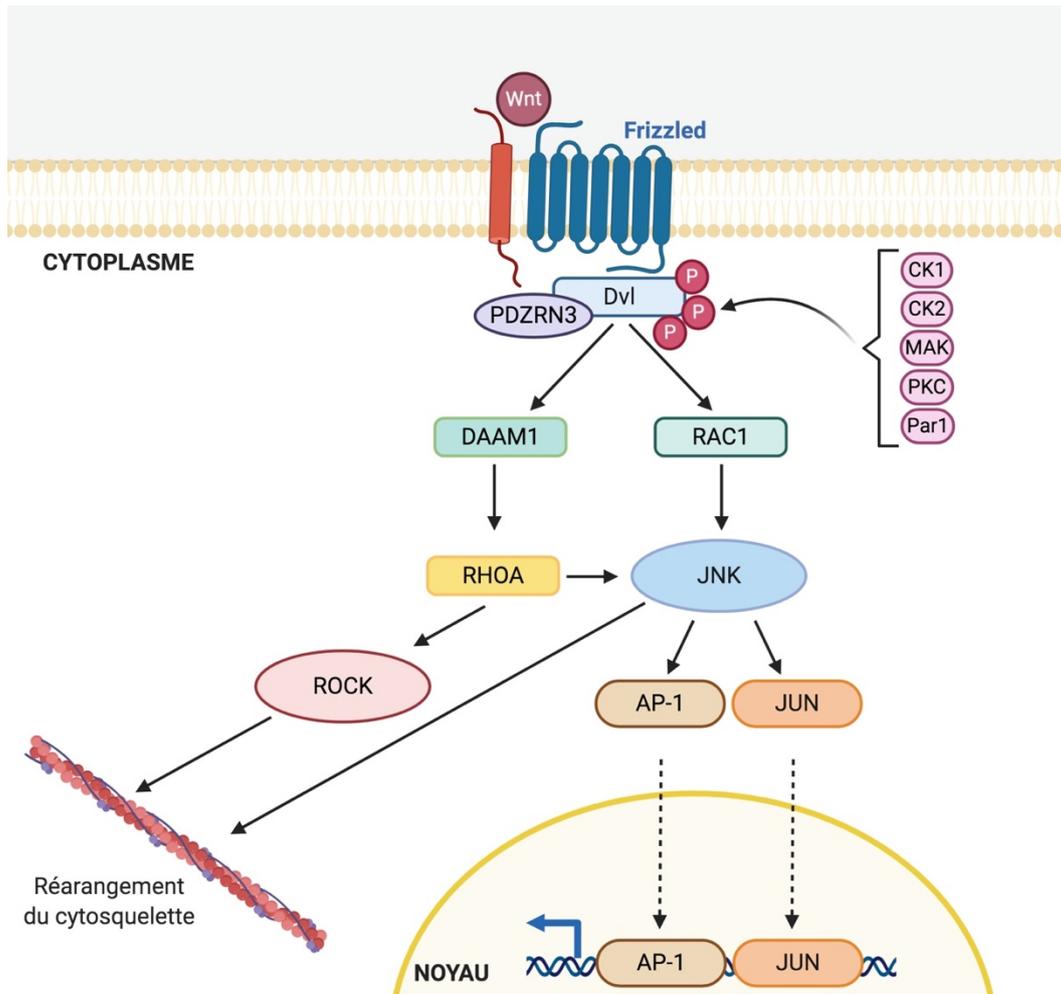


Figure 20. Schéma de la voie de signalisation non canonique Wnt/Fz dite PCP.

La fixation du ligand Wnt à son récepteur Fz et un co-récepteur entraîne le recrutement de la protéine d'échafaudage Dvl à la membrane plasmique. En aval de Dvl diverses voies régulent la réorganisation du cytosquelette. DAAM1 lie Dvl et permet l'activation des Rho GTPases RhoA et ROCK. D'autre part, le complexe Dvl-RAC1 active JNK.

B. Voies Wnt et endothélium

La voie Wnt est une voie majeure de signalisation et joue un rôle déterminant dans le développement embryonnaire. Cette voie hautement conservée contrôle l'homéostasie des tissus adultes et participe notamment au maintien de l'intégrité des microvaisseaux. En effet, différentes études démontrent que les voies de signalisation Wnt au niveau de cellules endothéliales interviennent sur la perméabilité, la polarité ou encore l'angiogenèse.

1. Perméabilité

L'endothélium vasculaire est une barrière sélective à la diffusion de molécules entre le sang et les tissus environnants. Cette barrière régule la circulation de certains solutés et cellules nécessaires au maintien de l'homéostasie tissulaire. La perméabilité de la barrière endothéliale peut être modulée en réponse à des stimuli spécifiques. C'est le cas notamment lors d'une inflammation aiguë où une augmentation de la perméabilité vasculaire est observée. Si la modulation de la barrière vasculaire peut favoriser certains processus comme la résolution d'incidents inflammatoires, un non-contrôle de la perméabilité vasculaire peut mener à des conséquences pathologiques graves. En effet, la perte d'intégrité de la barrière vasculaire est caractéristique de multiples pathologies comme la rétinopathie diabétique, l'asthme ou encore le cancer. Dans la maladie d'Alzheimer par exemple, une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique est observée (Biron *et al.*, 2011). Ce phénomène favorise le passage d'éléments figurés du sang ainsi que leurs produits de dégradation qui contribuent au développement de lésions neuronales et d'hémorragies intracérébrales (Sweeney, Sagare and Zlokovic, 2018). Le maintien de l'intégrité de la barrière vasculaire est donc indispensable à l'homéostasie des tissus et nécessite une signalisation fine.

La barrière endothéliale est régulée dynamiquement par deux mécanismes de transport majeurs : les voies de transport dites paracellulaire et transcellulaire.

a) Régulations de la voie paracellulaire

La voie paracellulaire permet la diffusion de petites molécules à travers les jonctions interendothéliales. Elle est régulée par les contraintes de cisaillement et divers médiateurs biologiques. Une caractéristique importante des cellules endothéliales est leur capacité à former une barrière primaire impliquant des jonctions adhérentes et serrées. En effet, les cellules endothéliales sont connectées entre-elles par des complexes jonctionnels. Un assemblage correct ainsi qu'une maintenance de ces jonctions sont essentiels au bon fonctionnement de l'endothélium et à la régulation de la perméabilité vasculaire.

Les jonctions serrées ou « Tight Junctions » (TJ), sont localisées le long de la membrane plasmique latérale et servent à « imperméabiliser » la fente endothéliale. Elles sont principalement composées de membres de la famille des claudines, de l'occludine et des molécules d'adhésion jonctionnelles (JAM). Ces protéines sont liées au cytosquelette d'actine par des protéines d'échafaudages telles que large/zona occludens-1 (ZO-1).

Ces jonctions serrées sont régulées par deux complexes protéiques : le premier composé de Pals1 (protéine associée à Lin-7), PATJ (protéine de jonction associée à Pals1) ou MUPP1 (multi PDZ domain protein) et Par-3 (régulant la polarité cellulaire). Le deuxième est composé de Par-3, Par-6 et aPKC. Les protéines PAR sont des protéines d'échafaudage multi-modulaires capables de se lier les unes aux autres ainsi qu'à d'autres protéines régulant la polarité cellulaire (Macara, 2004). Ces interactions garantissent aux complexes composés des protéines PAR d'être localisés à des domaines membranaires spécifiques (Tepass, 2012).

Les jonctions adhérentes ont une organisation assez similaire à celles des jonctions serrées. Elles contiennent des cadhérines (protéines transmembranaires) et des caténines (protéines d'échafaudage cytoplasmiques). Dans les cellules endothéliales, la protéine des jonctions adhérentes principales est la VE-Cadhérine (VE-CAD). ZO-1 permet encore une fois de lier ces jonctions avec les filaments d'actine, elle est rattachée à un complexe multi-protéique composé des cadhérines, de la protéine p120, de la β -caténine ainsi que la γ -caténine (aussi nommée plakoglobine) qui se lie elle-même à l' α -caténine (**FIGURE 21**).

Les voies de signalisation Wnt canonique et non-canonique participent à la régulation cellulaire et le maintien des jonctions adhérentes et serrées. Elles ont particulièrement été étudiées dans le cerveau au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette dernière est très enrichie en jonctions serrées (Kniesel, Risau and Wolburg, 1996) et permet l'isolation du système nerveux central de la circulation sanguine. Ainsi, la perméabilité de la BHE dépend majoritairement de la stabilité des jonctions adhérentes et serrées. Ce phénotype de CE unique résulte d'un programme fin de régulation génétique qui : (1) réduit la diffusion intra-endothéliale et la transcytose en supprimant la production de composants associés aux fenestrae et aux cavéoles

respectivement et (2) bloque la diffusion intercellulaire en améliorant la production de protéines des jonctions serrées. Des transporteurs qui permettent aux petites molécules telles que le glucose et les acides aminés d'être acheminés du sang vers le parenchyme cérébral et des pompes à efflux qui expulsent les molécules toxiques du parenchyme cérébral sont aussi régulées à la hausse au niveau de ces CE (Zhao *et al.*, 2015).

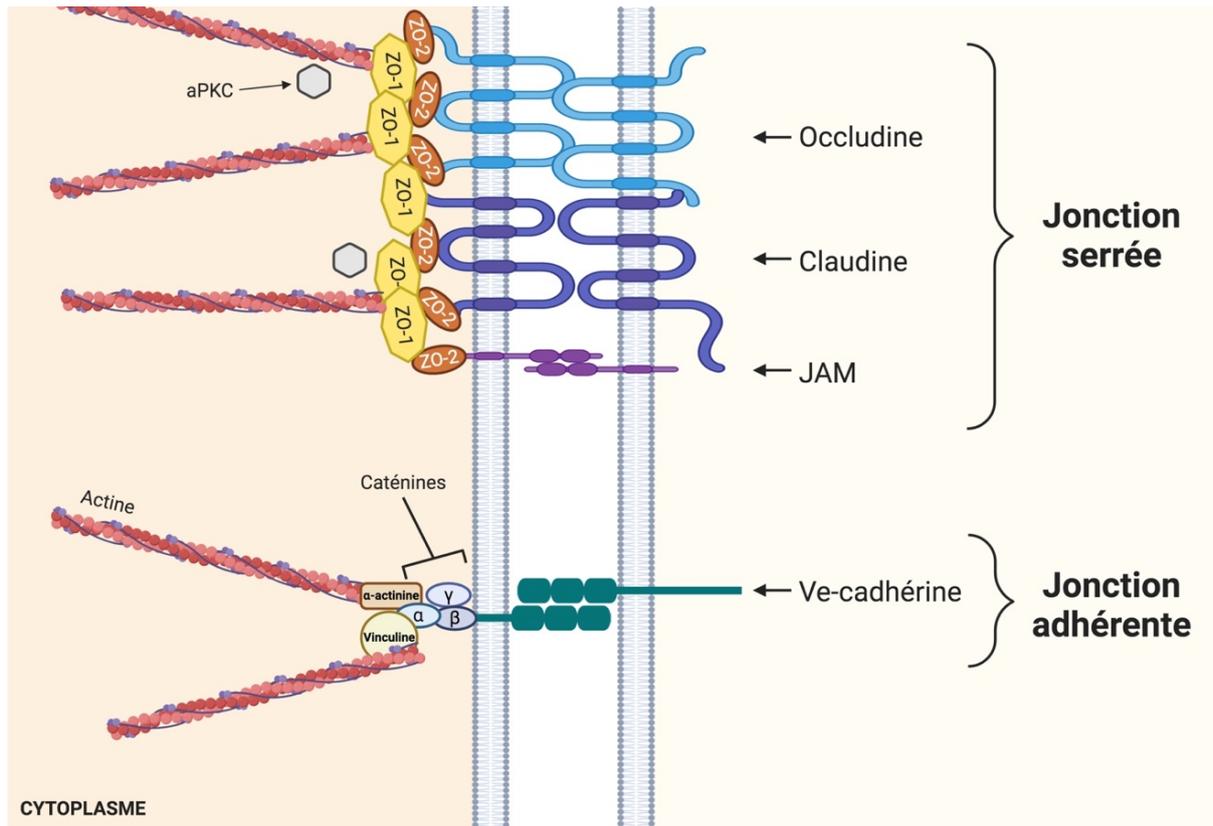


Figure 21. Schéma de jonctions inter-endothéliales impliquées dans la régulation paracellulaire.

La voie PCP régule la formation et le maintien des jonctions serrées. Il a en effet été montré *In vitro*, que l'activation de la voie Wnt PCP dans des lignées de cellules endothéliales cérébrales immortalisées aboutit au recrutement de PAR3 et aPKC aux jonctions serrées (Artus *et al.*, 2014). Un siRNA abaissant l'expression de PAR3 ou aPKC résulte en une augmentation significative de la perméabilité paracellulaire ainsi qu'une perte partielle de l'expression de ZO-1 au niveau des jonctions (Artus *et al.*, 2014). Ces résultats démontrent que l'activation du complexe PAR/aPKC aux jonctions régulées par la voie PCP contribue à la régulation de l'intégrité des jonctions serrées.

Le recrutement de PAR3 aux jonctions pourrait être médié par l'ubiquitine ligase Pdzrn3, acteur intracellulaire de la voie de signalisation PCP. En effet, le laboratoire a montré ces dernières années que Pzdrn3 est recruté aux jonctions serrées vasculaires et est associé aux complexes contenant PAR3. Pdzrn3 régulerait la perméabilité vasculaire à travers ce complexe puisqu'une délétion de ce dernier renforce les jonctions interendothéliales (Sewduth *et al.*, 2017). Malheureusement, les mécanismes d'actions impliquant la voie Wnt non-canonique dans les jonctions endothéliales sont encore peu claires.

La signalisation Wnt canonique est aussi nécessaire pour le maintien de l'intégrité des CE de la BHE. La β -caténine augmenterait la perméabilité vasculaire en formant un complexe avec le facteur de transcription FoxO1 qui réprimerait l'expression de la Claudine-5. La VE-cadhérine semble réguler ce phénomène puisqu'en stabilisant sa liaison avec la β -caténine aux jonctions, elle inhiberait ainsi la localisation et signalisation nucléaire du complexe FoxO1/ β -caténine (Taddei *et al.*, 2008). En cas de déstabilisation de la liaison VE-cadhérine/ β -caténine, FoxO1 et cette dernière sont phosphorylés et transloqués vers le noyau où ils répriment la transcription de la claudine-5 (Gavard and Gutkind, 2008).

A l'inverse, d'autres études ont mis en évidence que la β -caténine nucléaire activerait la transcription des claudines -3 et -1 ce qui stabiliserait les jonctions serrées (Reis and Liebner, 2013; Tran Khiem A. *et al.*, 2016). Ces résultats contradictoires sont certainement dus à des rôles nucléaires distincts de la β -caténine associées aux jonctions de celle cytoplasmique.

Le facteur de transcription Sox17 peut agir comme régulateur positif ou négatif de la signalisation Wnt/ β -caténine (Li *et al.*, 2018; Corada *et al.*, 2019). L'inactivation spécifique de Sox17 dans les cellules endothéliales conduit à une augmentation de la perméabilité de la microcirculation cérébrale.

Cette perturbation de barrière semble directement liée à l'élévation des gènes de perméabilité tels que PLVAP (Plasmalemma Vesicle Associated protein) et Angpt2 (angiopoïétine 2) ainsi qu'à la réduction considérable de gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine tels que Lef1 et la β -caténine elle-même. De façon intéressante, cette déstabilisation de la BHE en l'absence de l'expression de Sox17 peut être compensée

en restaurant la signalisation de la β -caténine. Ces résultats montrent que le facteur de transcription Sox17 permet le maintien d'une BHE correcte en soutenant l'activité de la signalisation Wnt/ β -caténine (Corada *et al.*, 2019).

Enfin, l'activation de la voie canonique β -caténine est aussi essentielle aux jonctions adhérentes puisqu'elle participe à leur organisation et permet le contrôle de l'expression de la β -caténine elle-même et de la VE-cadhérine, constituants majeurs des jonctions adhérentes (Ferreira Tojais *et al.*, 2014).

Ainsi, les voies Wnt PCP et β -caténine dépendante sont essentielles au maintien des jonctions serrées et adhérentes. Elles permettent aux cellules endothéliales de s'interconnecter pour former une barrière plus ou moins pénétrable et, contrôler ainsi la perméabilité paracellulaire.

b) Régulations de la voie transcellulaire

La perméabilité transcellulaire permet le transport actif de macromolécules à travers l'endothélium. Ce transport peut se faire par via les organelles vésiculo-vacuolaire ou VVO (pour vesiculo-vacuolar organelle) ou par les cavéoles.

Les VVO sont des grappes de vésicules et vacuoles interconnectées en clusters qui peuvent s'étendre à travers le cytoplasme endothélial du côté luminal jusqu'au côté apical (**FIGURE 22**). Ils interviendraient dans l'extravasation de macromolécules et de fluides favorisée par le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et certains médiateurs inflammatoires (Dvorak and Feng, 2001).

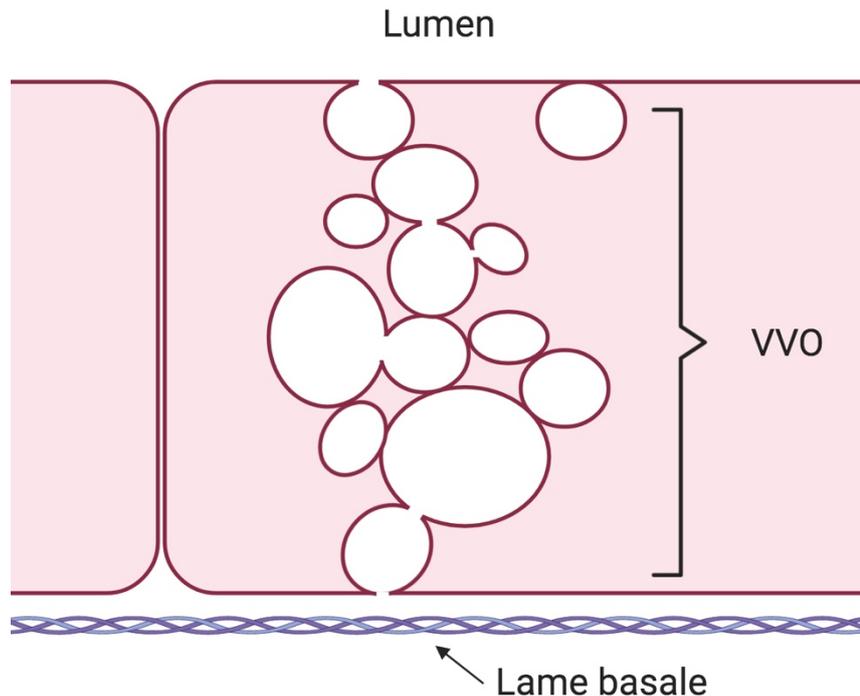


Figure 22. Représentation schématique d'organelles vésiculo-vacuolaires (VVO) dans une cellule endothéliale (adapté de Dvorak, 2015).

Le transport transcellulaire employant des vésicules est appelé « transcytose ». Ce mécanisme se distingue du transit de petites molécules comme les cations, anions ou acides aminés qui se produit par l'absorption puis la diffusion à travers le cytosol des cellules endothéliales. Les cavéoles sont des petites invaginations de la membrane plasmique qui prédominent dans le trafic transcytotique endothélial (Oh *et al.*, 2007) (FIGURE 23A). Ces structures sont très abondantes, notamment au niveau des capillaires et permettent le transport de multiples macromolécules telles que l'albumine, l'insuline ou encore les lipoprotéines.

La cavéoline est une protéine qui joue un rôle majeur dans la biosynthèse et la fonction des cavéoles. Elle comprend plusieurs isomères (Cav-1, -2 et -3) qui participent au revêtement de la membrane des vésicules (FIGURE 23B). Les Cav-1 et -2 sont fortement exprimées dans les cellules endothéliales alors que la Cav-3 est spécifique des cellules musculaires. Des expériences sur des souris n'exprimant pas la Cav-1 (souris *cav-1^{-/-}*) révèlent une absence de cavéoles au niveau des cellules endothéliales et épithéliales (Drab *et al.*, 2001), faisant de cette protéine le composant indispensable à la formation de ces structures. La Cav-2 renforce la constitution des cavéoles mais sa seule expression est insuffisante à leur genèse (Li *et al.*, 1998; Lahtinen *et al.*,

2003). Cette dernière se retrouve même dégradée par le protéasome en absence de Cav-1 (Razani *et al.*, 2001).

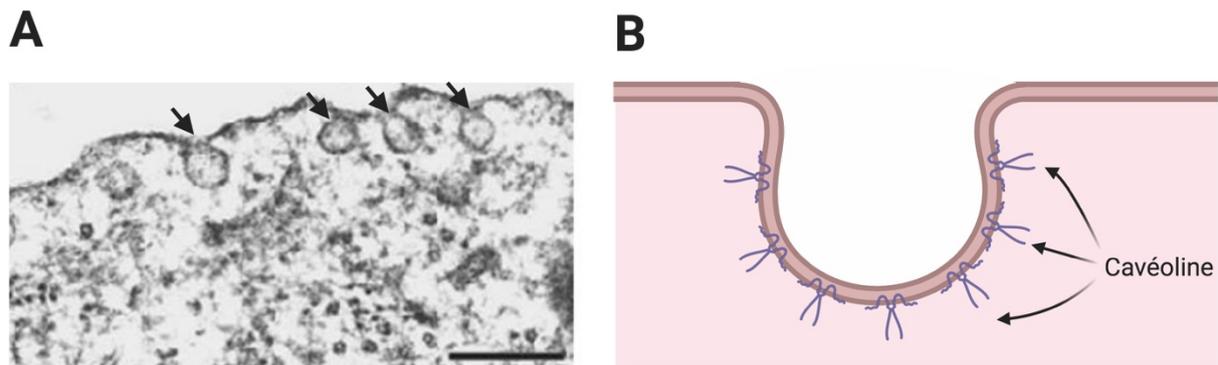


Figure 23. Illustration de cavéoles endothéliales (adapté de Waschke *et al.*, 2006; Parton and Simons, 2007).

(A) Photographie de microscopie électronique montrant des cavéoles. (B) Représentation schématique de l'insertion de cavéolines dans la membrane plasmique.

Les cavéoles sont capables de réguler la perméabilité de la barrière endothéliale. En effet, des évènements d'hyperperméabilité vasculaire dépendants de cavéoles participeraient aux lésions pulmonaires aiguës et ont été rapportés au niveau de la BHE après un accident vasculaire cérébral (Hu *et al.*, 2008; Nahirney, Reeson and Brown, 2016).

La BHE est une barrière hautement sélective permettant de protéger le système nerveux central. Les cellules endothéliales cérébrales présentent un niveau de trafic vésiculaire particulièrement bas. Cette régulation à la baisse de la transcytose serait médiée par la protéine transporteuse de lipide MFSD2a (pour Major Facilitator Superfamily Domain-containing 2a) qui inhibe la formation de cavéoles et permet ainsi la maintenance de l'intégrité de la BHE (Andreone *et al.*, 2017).

La voie Wnt a récemment été identifiée comme un régulateur essentiel de la transcytose. En effet, des souris déficientes de différents acteurs de la voie Wnt, le récepteur LRP5 (low-density lipoprotein receptor-related protein 5) ou le ligand Norrin, présentent une augmentation de la perméabilité vasculaire due à une amplification du mécanisme de transcytose dépendant des cavéoles (Wang *et al.*, 2020). Cette étude démontre que la transcription de la protéine MFSD2a est directement régulée par l'axe Wnt/ β -caténine. En effet, les souris déficientes en signalisation Wnt ($Lrp5^{-/-}$ et $Ndp^{+/-}$)

présentent un niveau élevé de cavéoles et de transcytose vasculaire associées à une régulation à la baisse de la protéine MFSD2a. La signalisation Wnt permet l'activation transcriptionnelle directe de la protéine MFSD2a qui est un régulateur négatif de la transcytose cavéolaire de manière dépendante de la β -caténine.

Toutes ces données démontrent l'importance des voies Wnt/ β -caténine dépendante et PCP dans la régulation et le maintien de la perméabilité endothéliale qu'elle soit para- ou transcellulaire.

2. Angiogenèse

L'angiogenèse permet la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux préexistants. Ce phénomène s'observe à la fois dans des conditions physiologiques et pathologiques. L'angiogenèse est un processus complexe qui comprend l'induction de cellules de tête (ou tip cell), la prolifération et croissance de bourgeons angiogéniques, la ramification vasculaire et la stabilisation du réseau vasculaire nouvellement formé. Dans l'ensemble, les voies de signalisation Wnt dépendantes et indépendantes de la β -caténine s'avèrent avoir des effets opposés sur l'angiogenèse. En effet, la voie β -caténine semble inhiber la prolifération des CE humaines (Cheng, Smith and Charnock-Jones, 2003) alors que l'activation de la signalisation PCP améliore l'angiogenèse via une augmentation de la prolifération et de la migration (Cheng *et al.*, 2008; Samarzija *et al.*, 2009).

La migration coordonnée lors de l'angiogenèse nécessite la mise en place de différents mécanismes de réarrangement du cytosquelette et de polarité. Il a été montré que certains acteurs de la voie Wnt/PCP régulent ces mécanismes. En effet, Wnt5a (activateur de la voie PCP) est capable de stimuler la migration des cellules endothéliales en induisant la formation de lamellipodes (structures de migration riches en actine) orientés vers le front de migration (Nomachi *et al.*, 2008). Cette polarisation du cytosquelette est essentielle à la migration. Daam1 peut agir directement avec la Profilin1 et contrôler le mouvement directionnel des cellules en favorisant la réorganisation du cytosquelette (Sato *et al.*, 2006). Enfin, Rac peut également réguler la migration et la polarité cellulaire (Steffen *et al.*, 2013).

3. Polarité

L'endothélium est un tissu dynamique constamment soumis aux forces hémodynamiques. La pression sanguine est à l'origine de forces de tension et affecte tous les types cellulaires du vaisseau. Parallèlement, les forces de cisaillement (FC) affectent principalement l'endothélium. Il est essentiel pour les CE de s'adapter à la présence de cette force pour demeurer en situation d'équilibre.

Le flux sanguin est un régulateur important du remodelage vasculaire. Il agit comme un coordinateur de la polarisation des cellules endothéliales qui se polarisent, s'allongent dans la direction des FC, orientent leurs centres d'organisation des microtubules (MTOC) en avant du noyau et migrent contre le flux sanguin (Franco *et al.*, 2015). Avant de devenir complètement fonctionnel, un réseau vasculaire subit de multiples remodelages. Lors de l'extension du réseau vasculaire ou lors de phénomènes de régénération chez adultes, médiés principalement par l'angiogenèse, une régression de segments est observée. Le processus de régression vasculaire est caractérisé par la perte de segments préexistants entre deux vaisseaux. Dans les vaisseaux à haut-débit (artères, artérioles, veines, capillaires, plexus rétinien), les cellules endothéliales se polarisent contre le flux. A l'inverse, dans les segments à faible débit et moins fonctionnels, les cellules endothéliales montrent une diminution de l'orientation de la polarité axiale. Il s'avère que la polarité des cellules endothéliales permet la stabilisation des segments. En effet, les flux importants semblent attirer les cellules endothéliales. La polarisation des cellules endothéliales induite par le flux, va diriger la migration des cellules endothéliales vers des segments de débits supérieurs conduisant à la stabilisation de ces derniers et à la régression de ceux à faible débit (Franco *et al.*, 2015).

La voie Wnt non-canonique apparait comme un régulateur de la régression vasculaire. En effet, dans les capillaires vasculaires, la signalisation paracrines des ligands Wnt non-canoniques Wnt5a et Wnt11 permet de diminuer la capacité d'orientation contre le flux sanguin des cellules endothéliales et prévenir la régression prématurée des vaisseaux sanguins (Franco *et al.*, 2016).

La protéine GSK-3 β , actrice de la voie Wnt est aussi impliquée dans la polarité endothéliale. En effet, des études *in vitro* et *in vivo* démontrent que la phosphorylation

de cette dernière conduit à la localisation des MTOCS en avant et l'acétylation de la tubuline provoquant la stabilisation des microtubules et la polarisation des cellules. Le blocage de GSK-3 β perturbe l'orientation du MTOC avec le flux (McCue Shannon *et al.*, 2006). La modulation de l'activité de GSK-3 β par la protéine de polarité cellulaire PAR-3 régule par ailleurs la polarité planaire endothéliale (Hikita *et al.*, 2018).

C. Ubiquitine ligases et dysfonction endothéliale

Le système ubiquitine/protéasome permet la dégradation de protéines. Elle se déroule en deux étapes : le ciblage des protéines et leur dégradation. Ce système permet principalement la dégradation de protéines de courte durée de vie, régulatrices, endommagées ou encore mal repliées. La reconnaissance du substrat est très spécifique et nécessite la fixation d'ubiquitines qui « étiquettent » les protéines à dégrader. Ce phénomène est possible grâce à un système d'ubiquitination qui implique l'activité d'enzymes spécifiques qui induisent ou réduisent l'ubiquitination des protéines cibles.

L'ubiquitination est un processus comprenant trois étapes. L'enzyme E1, active d'abord l'ubiquitine de manière dépendante de l'ATP et le transfère à une enzyme de conjugaison d'ubiquitine (UBC) de type E2. Ces E2 transportent ensuite l'ubiquitine activée vers les ubiquitines-ligases E3 qui se lient spécifiquement à leurs protéines cibles et catalysent la fixation covalente de monomères (mono-ubiquitylation) ou de chaînes (poly-ubiquitylation) d'ubiquitines sur des résidus lysine déterminés. L'ubiquitination ne signale pas toujours la dégradation, elle peut en effet, réguler la localisation des protéines, l'internalisation de récepteurs, l'endocytose ou encore la régulation des interactions protéine-protéine. C'est le type et la localisation de l'ubiquitination qui déterminent le sort des protéines. Néanmoins, le protéasome dégrade préférentiellement les protéines poly-ubiquitylées.

Une seule enzyme E1 est responsable de l'activation des ubiquitines alors que plus de mille ubiquitine ligases de type E3 ont été identifiées et permettent d'assurer une spécificité de substrats (FIGURE 24).

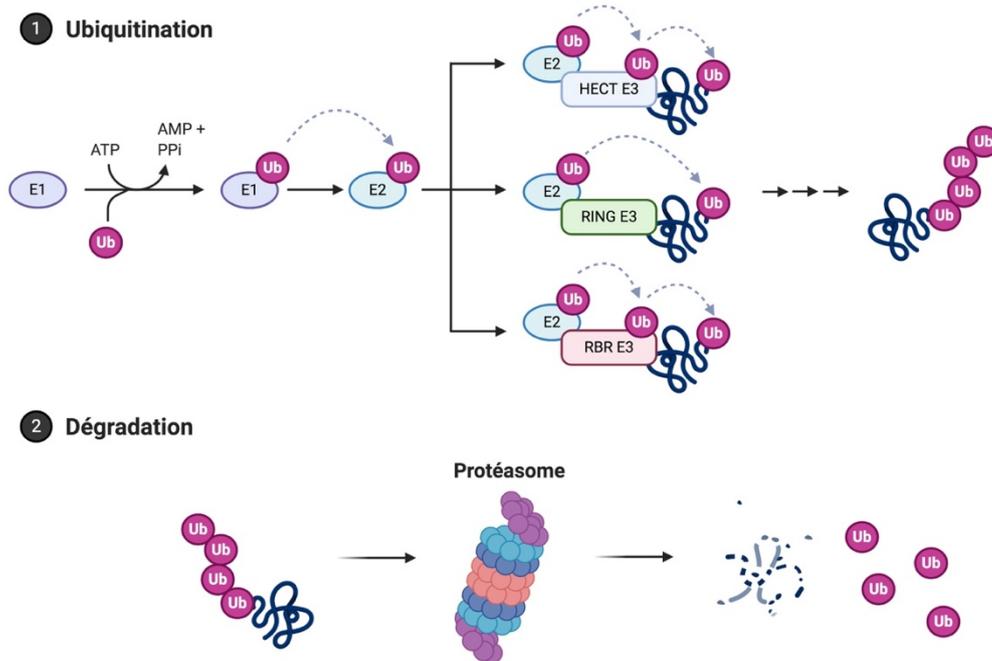


Figure 24. Le système ubiquitine protéasome (adapté de Meyer-Schwesinger, 2019).

L'enzyme E1 active l'ubiquitine en présence d'ATP. L'ubiquitine attachée à la cystéine du site actif de l'E1 est ensuite transférée sur l'enzyme de conjugaison E2. Grâce aux ubiquitines ligases E3, l'E2 peut ubiquitiner des résidus lysines d'un substrat spécifique. Les ligases RING E3 (pour Really Interesting New Gene) catalysent le transfert de l'ubiquitine directement de l'E2 au substrat alors que les E3 HECT (pour Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus) et E3 RBR (pour RING-in-Between-RING) nécessitent d'abord le passage de l'ubiquitine activée sur leur site cystéine pour être transférée sur le substrat. Les protéines poly-ubiquitinées sont ensuite adressées au protéasome afin d'être dégradées.

L'ubiquitination est un processus réversible et l'élimination d'ubiquitines des substrats est contrôlée par des enzymes de dé-ubiquitination (ou DUB). L'activité des DUB est importante pour le recyclage des ubiquitines mais aussi pour le renouvellement des protéines.

L'intégrité des cellules endothéliales est principalement déterminée par les jonctions serrées et adhésives ainsi que par la dynamique du cytosquelette. Plusieurs modifications post-traductionnelles contrôlent l'intégrité endothéliale comme la phosphorylation mais également l'ubiquitination.

Les CE contrôlent la force de leurs contacts cellules-cellules en partie à travers le cytosquelette d'actine. Les principaux acteurs qui contrôlent ces dynamiques d'actine sont les membres de la famille des Rho GTPases comme RAC2, RhoA ou RhoB. Les

Rho GTPases basculent entre des états actifs et non-actifs en lien avec le GTP par l'action de facteurs d'échange de nucléotides guanines (GEF) et de protéines activant les GTPase (GAP). Les Rho activées sont généralement situées au niveau de la membrane plasmique ou elles interagissent avec des protéines kinases et d'échafaudage. Leur signalisation est essentielle pour la stabilisation, la perturbation ou la reformation des jonctions endothéliales (Huveneers, Daemen and Hordijk, 2015; van Buul and Timmerman, 2016).

La localisation, l'activité et la dégradation de ces protéines peut être régulé par l'ubiquitination (Hodge and Ridley, 2016). C'est le cas par exemple de RAC1 dont l'ubiquitination peut être induite en cas de stress oxydatif : en réponse à la stimulation par H₂O₂ et l'IL1b, l'ubiquitine ligase E3 TRAF6 induit l'activation de Rac1 par ubiquitination ce qui favoriserait des signaux oxydatifs et une perte de la barrière endothéliale (Li *et al.*, 2017). L'ubiquitine ligase SCF-FBXL19 E3 peut également cibler et dégrader Rac1 (Zhao *et al.*, 2013) ce qui aura pour conséquence une réduction de la barrière endothéliale (Pronk *et al.*, 2019).

RhoA, RhoB, Cdc42 et autres Rho GTPases sont aussi sujettes à l'ubiquitination et dans la plupart des cas, cela modifie leur localisation, leur abondance et leurs capacités de signalisation.

Plusieurs composants des jonctions endothéliales peuvent aussi être la cible d'ubiquitines ligases : l'internalisation et la dégradation de l'occludine peut être médié après son ubiquitination par la E3 ligase Itch (Traweger *et al.*, 2002). La protéine d'échafaudage ZO-1 peut être dégradée à la suite de son ubiquitination par la ligase E3 N-econnaissance-1 (Chen *et al.*, 2014) ce qui aura pour conséquence une diminution de l'intégrité de la barrière endothéliale. La stabilité des jonctions peut aussi être régulée par l'ubiquitine ligase E3 HECW2 qui cible AMOLT1, une protéine régulatrice des jonctions, et dont l'ubiquitination augmente sa stabilité (Choi *et al.*, 2016).

Enfin, l'ubiquitine ligase E3 PDZRN3 régule négativement l'intégrité endothéliale. PDZRN3 agit en aval du complexe PAR3 et cible MUPP1 pour sa poly-ubiquitination et sa dégradation. Cette dégradation induit la dissociation des protéines composant les jonctions serrées tels que ZO1 ou c-jun et une diminution de la localisation de PKCζ et de PAR3 aux jonctions. Une délétion de PDZRN3 dans les cellules endothéliales aboutit à une accumulation de PKCζ aux jonctions. Ces résultats suggèrent que la localisation ainsi que l'activité de la kinase PKCζ dans la cellule endothéliale et donc,

la perméabilité vasculaire, peuvent être influencés par l'expression de l'ubiquitine ligase PDZRN3. (Sewduth *et al.*, 2017).

Comme nous avons pu le voir certaines ubiquitines ciblent directement les protéines jonctionnelles, ou contrôlent indirectement la fonction de barrière en ciblant des protéines régulatrices de la dynamique du cytosquelette.

V. Projet de recherche

Le laboratoire s'intéresse particulièrement à l'ubiquitine ligase E3 RING PDZRN3 pour ses implications dans le maintien de l'intégrité des cellules endothéliales. En effet, d'une part il a été mis en évidence que *Pdzn3* est un acteur de la voie Wnt non-canonique et comme nous l'avons vu précédemment, cette voie participe activement au maintien des jonctions inter-endothéliales préservant l'intégrité de ces cellules. D'autre part, les ubiquitines ligases jouent un rôle très important dans la dysfonction endothéliale. Même si à ce jour nous n'avons que peu d'informations sur les protéines cibles de PDZRN3, cette ubiquitine ligase semble être un acteur de choix dans l'étude de la dysfonction endothéliale dans la physiopathologie de l'ICFep. Des résultats préliminaires ont montré que la surexpression embryonnaire de PDZRN3 dans les cellules endothéliales entraîne une mortalité embryonnaire liée à des dysfonctions vasculaires telles que la présence d'hémorragies dans différents tissus, une perméabilité cellulaire accrue et une dilatation des vaisseaux du sac vitellin (Sewduth *et al.*, 2017).

Du fait de l'implication de *Pdzn3* dans la morphogénèse vasculaire ainsi que dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium, nous avons décidé d'utiliser cette protéine comme acteur de dysfonction vasculaire. Pour cela, nous avons généré des souris transgéniques présentant une surexpression spécifique de PDZRN3 dans les cellules endothéliales inducible au tamoxifène. Nos travaux ont eu pour objectif d'étudier l'impact de la dysfonction endothéliale induite par PDZRN3 sur la fonction cardiaque.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Lignées Murines et hébergement :

Modèle murin de surexpression de *Pdzrn3* dans les cellules endothéliales

Afin d'étudier le rôle de la dysfonction endothéliale dans l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (ICFEP), nous avons généré une lignée de souris surexprimant le gène *Pdzrn3* spécifiquement dans l'endothélium. Ces souris expriment le gène codant pour la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur endothélium spécifique Cadherine 5 (*Cdh 5*) (cédé par R.H Adams (Wang *et al.*, 2010) ainsi qu'une séquence *tTa* (tétracycline) interrompue par un codon STOP flanqué de deux séquences *Flox* (ROSA :LNL :tTA ; JAX stock #008600) (Nagy, 2000). Une cassette sous le contrôle Tet-Off permet la surexpression du gène *Pdzrn3* en aval, étiqueté d'un tag « V5 », et du gène rapporteur *LacZ* en tandem. La Cre recombinase est une endonucléase capable de reconnaître et couper spécifiquement des sites LoxP et catalyser l'excision d'une séquence ADN. Cette dernière se retrouve transloquée dans le noyau des cellules après l'injection de tamoxifène. Ce phénomène permet l'excision du codon STOP qui entrainera la synthèse de la protéine transactivatrice tTA et engendrera la surexpression du gène *Pdzrn3-V5*.

La vérification de l'induction du transgène est faite par l'analyse de l'activité β -galactosidase dans l'endothélium après l'ajout de substrat X-gal. Les souris surexprimant PDZRN3 dans l'endothélium sont *Cdh5-creERT2; tTa; Pdzrn3-V5* et seront nommées iEC-Pdzrn3 alors que les souris contrôles, qui sont issues des mêmes croisements mais n'expriment pas la cre-recombinase, seront dénommées « littermates » (FIGURE 25).

Les expériences ont été effectuées sur des souris âgées de 1, 3 ou 8 mois. Pour l'étude du régime western, les animaux âgés de 8 mois ont été nourris pendant 12 semaines avec un régime PF4318 Atherogenic Rodent Diet (Envigo).

Les souris sont hébergées en animalerie conventionnelle, en cage communes transparentes sur portoirs ventilés, avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Toutes

les expérimentations sont conformes aux recommandations du guide des soins et de l'utilisation des animaux de laboratoire, et ont obtenu l'approbation du comité d'éthique local de l'Université de Bordeaux.

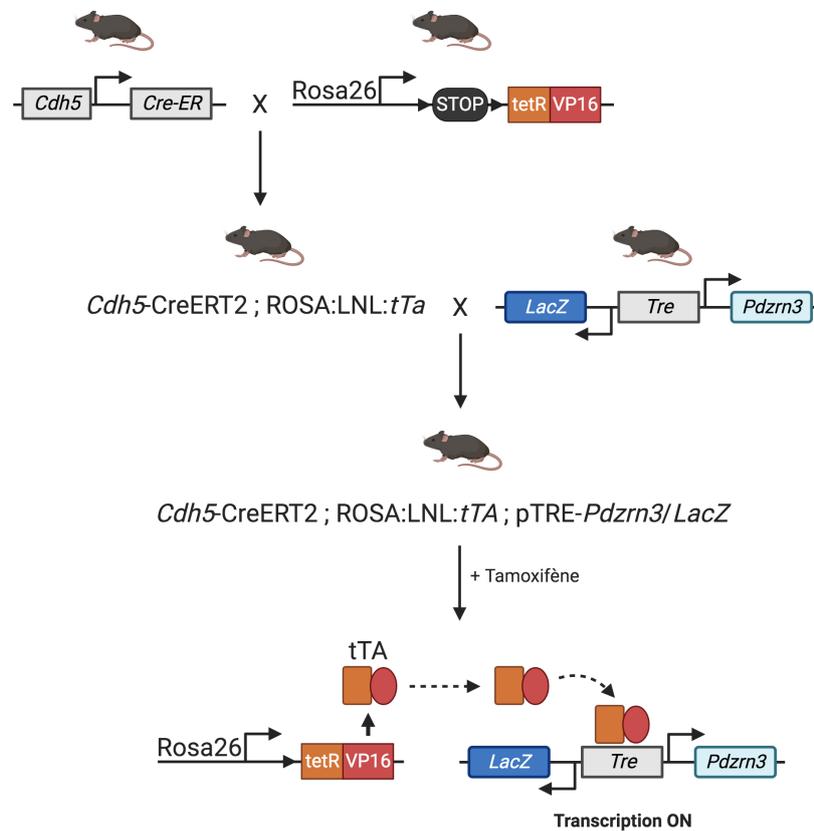


Figure 25. Représentation schématique des constructions génétiques des souris iEC-Pdzn3

Construction génétique des souris iEC-Pdzn3 réalisée en croisant des souris Cdh5-CreERT2 avec des souris ROSA:LNL:tTA pour donner des souris Cdh5-CreERT2 ; ROSA:LNL:tTA. Ces dernières sont alors croisées avec des souris pTRE-Pdzn3/LacZ donnant des souris Cdh5-CreERT2 ; ROSA:LNL:tTA ; pTRE-Pdzn3/LacZ. L'injection de tamoxifène permet la surexpression de Pdzn3 dans l'endothélium.

Tamoxifène

Les injections de tamoxifène sont réalisées par voie intra-péritonéale (IP) soit 1 mois, soit 10 jours après la naissance des souris (3 doses successives de 100µL à 0,5mg/mL).

La solution est réalisée à partir de poudre de Tamoxifène (Sigma-Aldrich #T5648) diluée à 0,5mg/mL dans de l'huile de tournesol (9/10) et de l'alcool à 96° (1/10).

Procédures chirurgicales :

Mesures hémodynamiques ventriculaires gauche

L'analyse des pressions ventriculaires gauche est réalisée avant l'euthanasie des animaux.

Les souris sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane à 3 % pour l'induction puis à 1,5 % pendant la durée de l'examen. L'artère carotide droite est soigneusement isolée du nerf vague et un clamp est positionné au niveau le plus proximal afin d'interrompre le flux carotidien, le temps d'introduire le cathéter de pression (1,2F, FTM-1211B-0018, Transonic, NY, USA) par l'artère carotide commune. Ce cathéter est connecté à un moniteur de type Millar relié à un Bridge Amp-Power Lab 8/35 (ADInstruments Inc. CO, USA) et analysé par le logiciel LabChart (version 6, ADInstruments Inc. CO, USA). Les courbes sont obtenues sur plusieurs cycles cardiaques et permettent l'acquisition de la pression ventriculaire gauche, la pression télédiastolique, la fréquence cardiaque, la constante de relaxation, ainsi que la vitesse maximale de relaxation du ventricule gauche.

Test de Miles

48h avant le test, les souris sont placées dans des cages individuelles et leurs dos dépilés pour laisser apparaître une peau à nue.

Le jour du test, les animaux sont endormis à l'isoflurane 3% et 100µL de Bleu Evans à 2% (MERCK AG DARMSTART) est injecté par voie retro-orbitaire. Les souris sont alors laissées vigiles dans leurs cages pendant 30 minutes afin de faire circuler le colorant. Trois injections sous-cutanées de 20 µL de VEGF-A (à 2,5 ng/µL) (Brash, Ruhrberg and Fantin, 2018) et un volume égal en PBS sont administrés de façon opposée sous la peau dorsale. Les animaux sont de nouveaux laissés vigiles 30 min dans leur cage puis sacrifiés par dislocation cervicale. La peau est alors récupérée, photographiée, les sites d'injections sous-cutanées sont coupés, pesés puis incubés dans 300µL de formamide (NORMAPUR) toute la nuit dans un four à 70°C afin d'extraire le colorant. Le lendemain, la perméabilité vasculaire est quantifiée en mesurant l'absorbance de 100µL de formamide à 610 nm (TECAN Infinite®).

Analyses non-invasives :

Échocardiographie

Pour les analyses échocardiographiques, nous avons utilisé un échographe (Vevo® 2100 Imaging System, FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, Canada) associé à une sonde MS 400 (VisualSonics MS400, FUJIFILM VisualSonics, Inc., Toronto, Canada avec une plage de fréquences de 18 – 38 MHz) pour l'évaluation de la fonction cardiaque in vivo. Toutes les échocardiographies ont été réalisées par une seule et même personne formée.

Les souris sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane à 3 % pour l'induction puis à 1,5 % pour la durée de l'examen. Une plaque chauffante (à 37°C) permet le contrôle de la température ainsi qu'une surveillance de la fréquence cardiaque de la souris. Une dépilation du thorax par crème dépilatoire est effectuée avant l'analyse échographique.

Les images ont été prises en deux plans de coupes parasternales : le grand axe et le petit axe, nous permettant la mesure de l'épaisseur du septum, de la paroi postérieure du ventricule gauche, ainsi que le calcul de la fraction d'éjection et de la masse ventriculaire gauche.

Test de tolérance à l'effort

Avant l'expérimentation de course sur tapis, les souris ont préalablement été habituées à être manipulées par un expérimentateur afin de réduire l'anxiété. Les animaux ont ensuite été familiarisés à la course (tapis roulant à 6 voies, UGO BASILE S.R.L, Italie) pendant 3 jours. Le premier jour, les souris sont déposées sur le tapis et explorent leur nouvel environnement pendant 2 minutes. La vitesse du tapis roulant est d'abord fixée à 3 m/min pendant 4 minutes puis à 8 m/min pendant 2 minutes avec une pente de 10°. Les 3 jours suivants, les souris sont entraînées pendant 12 minutes à des séances de course avec des vitesses augmentant progressivement jusqu'à atteindre un maximum de 18 m/min avec une inclinaison de 20°.

Après 3 jours d'accoutumance à l'exercice sur tapis de course, des tests d'épuisement ainsi que de fatigue ont été effectués. L'épreuve est réalisée avec une vitesse initiale,

dite de préchauffage, de 5m/min avec une pente de 20° pendant 4 minutes. La vitesse est ensuite augmentée à 14m/min pendant 2 minutes et le test à l'effort est réalisé par l'augmentation progressive de la vitesse par palier ; toutes les deux minutes la vitesse augmente de 2 m/min jusqu'à un maximum de 32 m/min.

Un suivi vidéo de l'ensemble du tapis roulant a été enregistré afin de tracer la position moyenne de chaque souris en course. Les positions des souris ont été représentées sur un graphique grâce au logiciel KINOVEA et nous ont permis de définir la fatigue et l'épuisement des animaux. Chaque couloir a été divisé en trois zones : l'avant du tapis de course (premier tiers), la « zone de fatigue » (tiers médian) et la « zone d'épuisement » (dernier tiers).

La fatigue a ainsi été définie par la difficulté de l'animal à maintenir son rythme de course, qui se positionne alors dans la « zone de fatigue » pendant plus de 30 secondes par palier. On considère donc qu'un animal est fatigué lorsqu'il est incapable de se positionner vers l'avant du tapis (premier tiers) pendant plus de 30 secondes par palier. L'épuisement a été défini par l'incapacité de l'animal à suivre le rythme de la course, ce dernier se situe alors dans la « zone d'épuisement ». On considère donc qu'un animal est épuisé lorsqu'il reste dans la partie inférieure du tapis roulant (dernier tiers) pendant plus de 10 secondes successives. Lorsqu'un animal présente des signes d'épuisements, le test prend fin et le temps de course mesuré.

Mesures de paramètres physiologiques in vivo :

Glycémie

La mesure de la glycémie est réalisée avant le sacrifice par un lecteur de glycémie (ACCU-CHECK, Aviva) après collection de sang au niveau du sinus rétro-orbital.

Poids du corps et du cœur

Les mesures du poids du corps et du cœur sont rapportées à la longueur du tibia, réalisée après euthanasie.

Gravimétrie

La teneur en eau (ou œdème) pulmonaire et cardiaque a été déterminée par la méthode poids humide-sec. Les poumons et les cœurs entiers sont prélevés, pesés puis séchés pendant 5 jours à 80°C dans un four. L'œdème est calculé en pondérant le poids des poumons humides par celui des poumons secs.

Numération de Formule Sanguine (NFS)

Les souris sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane à 3 % et 50 µL de sang sont collectés au niveau du sinus rétro-orbital dans un tube contenant 5 µL d'EDTA à 100mM. Le compte de cellules est ensuite réalisé dans les 4 heures suivant le prélèvement à l'aide d'un analyseur d'hématologie automatisé (scil Vet abc Plus+).

Biologie moléculaire :

Isolement des cellules endothéliales

L'isolement des cellules endothéliales se fait par séparation magnétique. Après sacrifice par injection létale par voie intra-péritonéale d'un mélange d'Exagon/Lurocaïne, une thoracotomie antérieure est réalisée et le cœur perfusé depuis l'apex avec 5 mL de PBS 1X froid (après rupture de l'oreillette droite). Le cœur est ensuite haché manuellement puis digéré dans de la collagénase de type IV à 5mg/mL (Gibco™) diluée dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) à 37°C, pendant 1h sous agitation. Les enzymes sont ensuite inactivées par l'ajout de sérum de veau fœtal, le broyat cellulaire est filtré à 40 µm (Miltenyi Biotec) puis lavé trois fois

au PBS, BSA 0,5% et EDTA 2mM. L'homogénat est incubé 30 minutes avec des billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti CD31 (Miltenyi Biotec) à 4°C sur une roue. La suspension cellulaire est ensuite chargée sur une colonne MACS (Miltenyi Biotec) elle-même placée sur un portoir magnétique. Les cellules non-marquées traversent la colonne et forment une fraction cellulaire appauvrie en cellules CD31⁺ (fraction négative). Cette fraction sera utilisée pour l'analyse du contenu inflammatoire par cytométrie de flux. Les cellules étiquetées CD31⁺ sont conservées dans la colonne (fraction positive) et éluées après avoir retiré la colonne du champ magnétique. Cette fraction sera utilisée pour l'analyse du transcriptome en RT-qPCR.

Cytométrie en flux

La fraction négative (appauvrie en cellules CD31⁺) provenant de l'isolement de cellules endothéliales cardiaques est récupérée afin d'analyser le contenu inflammatoire des cœurs. Les globules rouges (produisant de l'auto-fluorescence) sont lysés dans un tampon de lyse 1X (Biolegend). Les cellules sont remises en suspension dans du PBS, BSA 0,5% et EDTA 2mM et incubées avec des anticorps bloquant les récepteurs Fc (afin de réduire l'immunofluorescence non-spécifique) pendant 15 minutes à température ambiante sur une roue. Les sous-populations de cellules immunitaires ont été identifiées après incubation avec des anticorps spécifiques couplés à un marqueur fluorescent, à des concentrations prédéterminées, pendant 20 minutes à 4°C dans l'obscurité. Après deux lavages au PBS, le marqueur de viabilité ZombieAqua™ (Biolegend) est incubé à température ambiante pendant 20 minutes avant la fixation des cellules dans 2% de PFA pendant 15 minutes. Après deux lavages au PBS, les échantillons sont conservés à 4°C jusqu'au passage au cytomètre (BD LSRFortessa) au plus tard 48h après.

Pour la cytométrie en flux quantitative, 20 uL de billes CountBright™ (Invitrogen) sont mélangées dans chaque échantillon au moment du passage au cytomètre. Elles permettent le calcul du compte absolu de cellules dans les échantillons.

Les sous-populations immunitaires analysées sont les leucocytes (CD45⁺), les cellules myéloïdes CD11b (CD45⁺CD11b⁺), les neutrophiles Ly6G (CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺), les macrophages pro-inflammatoires de type M1 CCR2

(CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺CCR2⁺CD206⁻), les macrophages anti-inflammatoires de type M2 CD206 (CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁻CCR2⁻CD206⁺), les lymphocytes T CD3 ϵ (CD45⁺CD11b⁻CD19⁻CD3 ϵ ⁺), ainsi que les lymphocytes B CD19 (CD45⁺CD11b⁻CD19⁺CD3 ϵ ⁻).

Anticorps	Source	Référence
FC blocker	Biologend	92
CD45 PE/Cy7	Biologend	103114
CD45 PE	Biologend	103106
CD11c APC/Cy7	Biologend	117324
CD11b PE	Biologend	101208
Ly-6C AL700	Biologend	128024
Ly6G APC	Biologend	127614
CCR2 BV 605	Biologend	150615
CD206 BV 711	Biologend	141727
CD3 ϵ FITC	Biologend	152304
CD19 APC	Biologend	152410
Zombie Aqua™	Biologend	423102

Analyse de l'expression génique par RT-PCR quantitative

L'analyse du transcriptome des cellules endothéliales ou du tissu cardiaque a été réalisé par RT-qPCR. Les ARN sont extraits selon la méthode Phénol-Chloroforme. Un point correspond soit à l'isolement de cellules endothéliales provenant d'un cœur, d'un cœur entier ou d'oreillettes. Les cellules sont lysées dans 800 μ L de TRI-REAGENT (Euromedex) additionné de 200 μ L de chloroforme. Après 15 minutes de centrifugation à 13 000 g à 4°C, 400 μ L de la phase supérieure (contenant les ARN) est prélevée. 400 μ L d'une solution d'isopropanol/glycogène (volume à volume) est alors ajoutée et les échantillons centrifugés pendant 10 minutes à 13 000 g à 4°C. Le culot est lavé trois fois à l'éthanol 70% et après un traitement à la DNase, les ARN sont dosés à l'aide d'un NanoQuant Plate Infinite M200 Pro (Tecan).

La transcription inverse est réalisée sur 0,5 µg d'ARN total. L'expression relative des ARN est normalisée par rapport à l'expression du gène rapporteur cyclophilline en utilisant la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$ où $\Delta Ct = Ct \text{ gène} - Ct \text{ cyclophilline}$ et $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{gène}} - \Delta Ct_{\text{du groupe de référence}}$.

Gène rapporteur

Gène	Type	Séquence
<i>Cyclophilin A</i>	R	ATTTCTTTTGACTTGCGGGC
	F	AGCTAGACTTGAAGGGGAATG

Gène d'intérêt

Gène	Type	Séquence
<i>Pdzrn3</i> total	R	ATGGGCTCCTTGGCTGTCTTGAAAGC
	F	CTGACTCTTGTCTGCATCGGGACTC
<i>Pdzrn3</i> endogène	R	GAGCCAGGACACCCAAAGTT
	F	GACATCCCTGCCTCGTTCAA
<i>Pdzrn3</i> ectopique	R	CAGCTTGAGGATAAGGCGCT
	F	CTTCGAGCTGGACCGCTTC

Marqueurs génériques des cellules endothéliales

Gène	Type	Séquence
<i>Pecam1</i>	R	AGGGGACCAGCTGCACATTAG G
	F	AGGCCGCTTCTCTTGACCACT T
<i>Meox2</i>	R	GGCAGAATTTGCCCATCATA
	F	TGCTCAGAGCTGTGGTCACT
<i>Cdh5</i>	F	GCAAGGTGTATGAATCTGTGCT
	R	GTCAAGGTAACAAAGAGTGCCA
<i>Tjp1</i>	F	TTTGAGACAAGCCTTCTGC
	R	AGCATCAGTTTCGGGTTTTC

Marqueurs de dysfonction endothéliale

Gène	Type	Séquence
<i>Plvap</i>	F	GCTGGTACTACCTGCGCTATT
	R	CCTGTGAGGCAGATAGTCCA
<i>IL6</i>	F	GAGCGGAGAGTACTGGATCG
	R	GTTCTGGGCTGATGTACCAGT
<i>Icam1</i>	F	TGGCCTGGGGGATGCACACT
	R	CCACCGGGCTGTAGGTGGGT
<i>Vcam1</i>	F	CGTACACCATCCGCCAGGCA
	R	TAGAGTGCAAGGAGTTCGGGCG

Voie de signalisation Wnt

Gène	Type	Séquence
<i>Axin2</i>	F	AACCTATGCCCGTTTCCTCT
	R	CTGGTCACCCAACAAGGAGT
<i>Lef1</i>	F	ACCCGTGATGGGATAAACAG
	R	TCCTGAAATCCCCACCTTC
<i>Ndp</i>	F	AGCTCAAAGATGGTGCTCCT
	R	TAGAGCCAACAGGGGAAATG
<i>Wnt 4</i>	F	GAGAAGTGTGGCTGTGACCGG
	R	ATGTTGTCCGAGCATCCTGACC
<i>Wnt 9b</i>	F	AAGTAACAGCACCAAGTTCCTCAGC
	R	GAACAGCACAGGAGCCTGACAC
<i>Fzl4</i>	F	TGGTCTGCCAAAACCTTTCACACG
	R	TCTCCAACCCAGCATTTCAG
<i>Sox17</i>	F	GGGACAAGAGTTCGGAAAG
	R	GCTCTGCCTCATCCACATAG

Inflammation

Gène	Type	Séquence
<i>IL6</i>	F	GAGCGGAGAGTACTGGATCG
	R	GTTCCGGGCTGATGTACCAGT
<i>Col1a1</i>	F	CCCCGGGACTCCTGGACTT
	R	GCTCCGACACGCCCTCTCTC
<i>Col3a1</i>	F	CCATTTGGAGAATGTTGTGCAAT
	R	GGACATGATTCACAGATTCCAGG
<i>LOX</i>	F	AACCAAGGGACATCGGACTT
	R	TGGCATCAAGCAGGTCATAG
<i>Tgfbf1</i>	F	TGCTCTTGTGACAGCAAAG
	R	GGAGCTGAAGCAATAGTTGG
<i>MMP2</i>	F	CAAGTTCCCCGGCGATGTC
	R	TTCTGGTCAAGGTCACCTGTC
<i>MMP9</i>	F	CTGGACAGCCAGACACTAAAG
	R	CTCGCGGCAAGTCTTCAGAG

Cardiomyocytes

Gène	Type	Séquence
<i>Cx43</i>	F	ATCAGGGAGGCAAGCCATGCTCA
	R	ACGTTGGCCCACACCACAAAGA
<i>TitinN2A</i>	F	GAGACATTGCTCCGTTTTTC
	R	GATCTCCAAGAGGCTGTGC
<i>TitinN2B</i>	F	ACAGTGGGAAAGCAAAGACATC
	R	AGGTGGCCCAFACACTACTTC
<i>Serca2</i>	F	GATCCTCTACGTGGAACCTTTG
	R	GGTAGATGTGTTGCTAACAACG
<i>Mef2C</i>	F	TAAGCAGGCAAGGGTCACTG
	R	AAAGTCCAGCTTATGCCGCT
<i>Pln</i>	F	TGCTCACTACCACATCAACTTCA
	R	TTCACCAAATCAAACCTCCATTTG

Dysfonction cardiaque

Gène	Type	Séquence
<i>ANP</i>	F	CGTCTTGGCCTTTTGGCTTC
	R	GGTGGTCTAGCAGGTTCTTGAAA
<i>BNP</i>	F	AAGCTGCTGGAGCTGATAAGA
	R	GTTACAGCCCAAACGACTGAC

Séquençage ARN

Un séquençage ARN issu d'isollements de CE (expliqué précédemment) de souris littermates et iEC-Pdzn3 a été effectué. La préparation de la bibliothèque d'ARN messagers a été réalisée en suivant les recommandations du fabricant (ARNm KAPA Kit HyperPrep de Roche). Les échantillons ont été séquencés sur Nextseq 500 ILLUMINA avec 2X30 millions de lectures par échantillons. Seules les lectures appariées de bonnes qualités ont été conservées. Les lectures ont ensuite été alignées sur le génome de référence à l'aide du logiciel Star v2.5.3a. Le nombre de lectures alignées sur chaque séquence a ensuite été comptabilisé afin d'obtenir le niveau d'expression génique en FPKM (pour Fragment per kilobase per million). L'analyse de l'expression différentielle génique entre les littermates et les souris iEC-Pdzn3 a été réalisé en utilisant les critères de filtre suivant : $p < 0,05$ et valeur absolue de \log_2 .

Analyse protéique par Western Blot

Les protéines sont lysées dans un tampon RIPA (0,5% NaDéoxycholate, 1% Nonidet P-40, 0,1% SDS dans du PBS 10X) supplémenté d'anti-protéases (AEBSF 1/500, Leupeptin 1/1000, Apropeptin 1/1000, Orthovanadate de sodium 1/1000) pendant 1 heure sur glace puis centrifugées pendant 10 minutes à 4°C, à 10 000 g. Le surnageant est ensuite récupéré et les protéines dosées à l'aide d'un kit de quantification BCA (Thermo scientific).

Les protéines sont ensuite séparées par électrophorèse SDS-PAGE dans un gel polyacrylamide. La migration se fait dans un tampon composé de Tris/glycine/SDS à

150 volts. Le transfert se fait sur une membrane de Polyfluor de Vinylidène (PVDF) dans un tampon de Tris/glycine/éthanol.

Après blocage pendant 1 heure dans du lait à 2% dilué dans une solution saline tamponnée au Tween20 (PBS-T), les membranes sont incubées pendant une nuit à 4°C avec des anticorps primaires. Le lendemain, les membranes sont incubées pendant 1 heure avec des anticorps secondaires et les protéines révélées à l'aide du système d'imagerie infrarouge Odyssey (LI-COR Biosciences).

Histologie :

Prélèvement et préparation des tissus

Les souris (iEC-Pdzn3 versus leurs littermates) ont été sacrifiées à différents âges par injection létale par voie intra-péritonéale d'un mélange d'Exagon/Lurocaïne, une thoracotomie antérieure est réalisée. Le cœur est ensuite perfusé depuis l'apex avec 5 mL de PBS 1X froid après rupture de l'oreillette droite puis prélevés rapidement et placé dans du PBS 1X froid (pour les coupes en cryoconservation), ou perfusé pendant 5 minutes avec une solution de formaline 4% tamponnée en phosphate (pour les coupes en paraffines) avant d'être prélevé.

Coupes en cryoconservation

Cette inclusion ne nécessite pas de fixation ce qui nous permet de récupérer la moitié inférieure du cœur pour des extractions géniques. Les tissus cryoconservés maintiennent une bonne reconnaissance antigénique par les anticorps mais ne conservent pas l'architecture absolue du tissu.

Après prélèvement, les cœurs sont directement inclus en OCT (OCT compound VWR Chemicals) par des vapeurs d'isohexane (HiPerSolv CHROMANORM®HPLC VWR Chemicals) refroidi à l'azote liquide (Air Liquide). Les cœurs sont ensuite cryo-sectionnés entre 7 µm et 14 µm (Cryotome Leica CM3050S), les lames sont séchées 1h à 37°C et conservées à -80°C avant marquage.

Pour l'immunofluorescence, les cryosections sont sorties du congélateur et laissées 20 minutes à température ambiante. Elles sont ensuite post-fixées 10 minutes dans de l'acétone froide puis rincées trois fois au PBS. Les lames sont alors saturées avec un tampon de saturation (PBS 1X, sérum d'âne 10%, Triton X100 0,5%) durant 1h. Les anticorps primaires (cf tableau) dilués dans un tampon d'immunofluorescence (PBS 1X, sérum d'âne 1%, Triton X100 0,5%) sont ensuite ajoutés et incubés sur la nuit à 4°C. Les coupes sont lavées trois fois 10 minutes au PBS 1X, puis incubées avec les anticorps secondaires fluorescents dilués dans le tampon d'immunofluorescence pendant 2h à température ambiante. Après trois lavages au PBS 1X, les échantillons sont plongés pendant 30 minutes dans du Soudan Noir (2mg/mL dilué dans de l'éthanol 96°) afin d'atténuer l'auto-fluorescence puis, montés sous lamelle avec du milieu de montage avec DAPI (Invitrogen, Fluoromount-G®).

Coupes en Paraffine

Nous avons utilisé un type de fixateur pour ce type d'inclusion : la formaline. La fixation en formaline va interconnecter de façon covalente les protéines de l'échantillon ce qui permettra la préservation de l'architecture du tissu. Cependant, un changement de conformation des épitopes et par conséquent, une mauvaise reconnaissance des antigènes par les anticorps peut se produire.

Après prélèvement, les cœurs sont fixés avec une solution de paraformaldéhyde à 4% pendant 3h puis transférés dans de l'alcool à 50°. L'inclusion des tissus se fait par un protocole automatisé grâce à un préparateur de tissus de paillasse semi-intégré (Leica TP1020). Rapidement, les échantillons sont déshydratés dans des bains successifs d'éthanol, puis de xylène. Les échantillons sont ensuite inclus en paraffine et conservés à température ambiante jusqu'à la coupe. Les cœurs sont ensuite coupés au microtome (Leica) à 7 µm.

Pour l'immunofluorescence, les lames sont d'abord déparaffinées après deux bains de xylène, puis réhydratées avec des bains successifs d'alcool à concentration décroissante allant jusqu'à l'eau. Elles sont ensuite saturées pendant 1h et traitées de la même manière que l'immunofluorescence sur coupes cryocongelées.

Le nombre de cellules positives au marquage β -galactosidase par cœur a été quantifié manuellement sur 10 coupes par souris (1 mois, n= 3). Il en est de même pour le compte des macrophages par cœur. La surface moyenne des cardiomyocytes a été mesurée sur 5 coupes par souris (n= 4 par groupe) sur des cardiomyocytes en coupe transversale immunomarqués au WGA-FITC. La densité capillaire a été quantifié sur 6 coupes par souris (n= 4 par groupe) avec les capillaires en coupe transversale : le seuillage des cellules CD31+ par ImageJ nous permet d’obtenir le compte du nombre de vaisseaux sur l’ensemble des sections. Les tailles des jonctions Cx43 des cardiomyocytes ont été mesurées manuellement sur 5 coupes par souris (n= 4 par groupe). La perméabilité cardiaque a été quantifiée sur 6 coupes par souris (n= 4 par groupe) avec les capillaires en coupe transversale : le pourcentage d’extravasation des différentes protéines a été obtenu en soustrayant le seuillage des vaisseaux au seuillage de l’albumine/IgG/fibrinogène afin de ne conserver que ce qui se trouve à l’extérieur des vaisseaux. Le recouvrement péricytaire a été quantifié sur 5 coupes par souris avec les capillaires en coupe transversale en rapportant le nombre de cellules NG2+ au nombre de cellules CD31+ (utilisation du logiciel ImageJ). Le pourcentage de surface des vaisseaux Ve-Cadhérine+ rapporté à une surface de tissu cardiaque a été quantifié après seuillage sur ImageJ sur 5 coupes par souris (n=4 par groupe) avec les capillaires en coupe longitudinale.

Anticorps utilisés

	Cibles	Dilution	Source	Référence	Laboratoire
Anticorps primaires	CD31	1/100	Rat	T-2001	BMA
	Bgalactosidase	1/200	Poulet	ab9361	Abcam
	CD68	1/100	Rat	137001	Biolegend
	alpha-actinine	1/200	Lapin	ab68167	Abcam
	ColIIV	1/400	Lapin	ab19808	Abcam
	Albumine	1/500	Chèvre	ab8940	Abcam
	Fibrinogène	1/1000	Lapin	A0080	DAKO
	Podocalyxine	1/200	Chèvre	AF1556	R&D
	Connexin 43	1/500	Lapin	C6219	Sigma

	VE-cadhérine	1/200	Chèvre	AF1002	R&D
	WGA- α 488	1/200	/	W11261	Lifetechnologies
	Ter119	1/200	Souris	550565	Pharmingen
	ICAM1	1/100	Hamster	550287	BD Pharmingen
	VCAM1	1/100	Rat	14-1061-82	Invitrogen
	NG2	1/100	Lapin	AB5320	Chemicon

	Cible	Dilution	Source	Référence	Laboratoire
Anticorps secondaires biotinylés	Anti-Hamster	1/100	Âne	706-065-148	Jackson ImmunoResearch

	Fluorescence	Cible	Dilution	Source	Référence	Laboratoire
Anticorps secondaires	Alexa488	Lapin	1/400	Âne	A-21206	Invitrogen
		Souris	1/400	Âne	A-21202	Invitrogen
		Chèvre	1/400	Âne	A-11055	Invitrogen
		Rat	1/400	Âne	A-21208	Invitrogen
	Alexa568	Lapin	1/400	Âne	A-10042	Invitrogen
		Chèvre	1/400	Âne	A-11057	Invitrogen
		Rat	1/400	Chèvre	A-11077	Invitrogen

Colorations histologiques

Révélation X-gal

Ce protocole est utilisé pour détecter l'expression du gène rapporteur *LacZ* par l'apparition de substrat bleu après l'ajout de X-gal.

Les révélations X-gal ont été effectuées in toto sur des morceaux d'apex non fixés. Les tissus sont incubés dans de la solution X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside, à une concentration finale de 1 mg/mL diluée dans un tampon phosphate à 0.1M supplémenté avec 2 mM de chlorure de magnésium (MgCl₂), 5mM de ferrocyanure de potassium K₄[Fe(CN)₆] et 5mM de ferricyanure de potassium

$K_3[Fe(CN)_6]$ à 37°C toute la nuit sous agitation. Les échantillons doivent être totalement immergés afin d'éviter tout dessèchement.

Picosirius Red

Cette coloration permet la teinte en rouge des fibres de collagène de type I et III et donc l'observation de la fibrose.

Une fois déparaffinées les lames sont incubées dans le Picosirius Red pendant 30 minutes, rincées à eau du robinet pendant 5 minutes, déshydratées dans des bains de concentrations croissantes d'éthanol puis de xylène afin d'être montées sous lamelles avec un produit de montage (Eukitt®).

La fibrose périvasculaire a été quantifiée sur des coupes colorées au rouge sirius en quantifiant le pourcentage de zones positives relatives à la taille des vaisseaux à l'aide du logiciel ImageJ.

Transparisation

Bien que différentes méthodes existent pour transpariser des organes, nous avons utilisé la technique iDISCO+ basé sur la délipidation et la déshydratation des tissus suivis de l'immersion dans une solution avec un indice de réfraction égal à celui de l'échantillon (Costa *et al.*, 2019).

Capillaires

Les animaux sont endormis à l'isoflurane 3% et 100µL de lectine DyLight594 à 1mg/mL (Vector Laboratories) est injecté par voie retro-orbitaire. Après 10 minutes de circulation du produit, les animaux sont sacrifiés par injection létale par voie intra-péritonéale d'un mélange d'Exagon/Lurocaïne, une thoracotomie antérieure est réalisée, les cœurs sont prélevés perfusés par du PBS puis par du PFA 4%. Après fixation sur la nuit à 4°C dans du PFA 4%, s'ensuivent, à température ambiante, des bains successifs de méthanol ($\geq 99,5\%$, GPR RECTAPUR®, VWR Chemicals) à 20%, 40%, 60%, 80% pendant une heure chacun, puis à 100% pendant la nuit afin de les

déshydrater. Les cœurs sont ensuite placés pendant 3h dans un mélange de dichlorométhane (anhydre $\geq 99,8\%$, contenant 40-150 ppm d'amylène comme stabilisateur, Sigma-Aldrich) et de méthanol. Puis, pendant 30 minutes dans du dichlorométhane à 100% afin d'éliminer le reste de méthanol et délipider au maximum les organes. Enfin, les échantillons sont placés dans un bain de benzyle ether (98%, Sigma-Aldrich) à 100% pendant quelques heures le temps qu'ils deviennent transparents à l'œil, puis conservés dans le benzyle éther à 4°C à l'abri de la lumière.

Réseau lymphatique

Après sacrifice par injection létale par voie intra-péritonéale d'un mélange d'Exagon/Lurocaïne, une thoracotomie antérieure est réalisée, les cœurs sont prélevés perfusés par du PBS puis par du PFA 4%. Après fixation sur la nuit à 4°C dans du PFA 4%, s'ensuivent, à température ambiante, des bains successifs de méthanol (MeOH) ($\geq 99,5\%$, GPR RECTAPUR[®], VWR Chemicals) à 20%, 40%, 60%, 80% pendant une heure chacun, puis à 100% pendant la nuit afin de les déshydrater. Les cœurs sont ensuite placés pendant 3h dans un mélange de dichlorométhane (anhydre $\geq 99,8\%$, contenant 40-150 ppm d'amylène comme stabilisateur, Sigma-Aldrich) et de MeOH. Après deux lavages au MeOH 100% (à 4°C), les cœurs sont baignés toute la nuit à 4°C dans du MeOH+5% H_2O_2 . Ils sont ensuite réhydratés au MeOH/H₂O, 1h à chaque fois à 80%, 60%, 40% puis 20%. Les cœurs sont saturés dans 2mL de PBSG-T (0,2% gélatine et 0,5% Triton) pendant 5 jours à température ambiante en rotation. L'incubation des anticorps primaires Lyve1 (ab14917 Abcam, dilution 1/500) se fait ensuite pendant 4 jours dans 2mL d'une solution de PBSG-T+0,1% saponine à température ambiante en rotation. Après 1 jour de rinçage au PBGS-T, les cœurs sont incubés avec les anticorps secondaires alexa568 (A-10042 Invitrogen, dilution 1/1000) dans 2mL d'une solution de PBSG-T+0,1% saponine pendant 5 jours en rotation à température ambiante. Après 1 jour de rinçage au PBSG-T, les cœurs sont déshydratés dans des solutions de MeOH/PBS (à 20%, 40%, 60% MeOH) 1h à chaque fois, puis dans du MeOH 100% toute la nuit. Les cœurs sont ensuite incubés 3h dans 2/3 de DCM et 1/3 de MeOH, puis placés 30 minutes dans du DCM à 100% afin d'éliminer le reste de méthanol et délipider au maximum l'organe. Enfin, les échantillons sont placés dans un bain de benzyle ether (98%, Sigma-Aldrich)

à 100% pendant quelques heures le temps qu'ils deviennent transparents à l'œil, puis conservés dans le benzyle éther à 4°C à l'abri de la lumière.

Les images de transparenisation ont été acquises au microscope ItraMicroscope[®], LaVision BioTec à la plateforme du BIC (Bordeaux Imaging Center). La densité du réseau vasculaire et le volume du réseau lymphatique ont été obtenus après le traitement des images par ImageJ et Imaris.

Microscopie électronique :

Pour les sacrifices de souris à visée de préparation de tissu pour la microscopie électronique : les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale, afin de permettre une thoracotomie rapide. Immédiatement après son retrait, le cœur battant est plongé dans du PBS froid pendant plusieurs secondes arrêtant ainsi le battement cardiaque. Après l'arrêt, le ventricule gauche est rapidement et minutieusement débité sur glace en coupes d'environ 1 mm³ et fixé dans une solution de fixation de glutaraldéhyde à 2% dans un tampon phosphate pH = 7,4 froid pour une analyse plus poussée en microscopie électronique.

La préparation tissulaire se poursuit par une succession de lavages (tampon phosphate pH=7,4, 4°C, 12h, 2 bains minimums), post fixation à l'osmium (1 volume de saccharose 1M, 1 volume de tampon phosphate pH=7,4, 2 volumes d'Osmium 2%; 1h à température ambiante), rinçage à l'eau distillée, lavage (acétate d'uranie à 2%, 12h à 4°C), déshydratation (bains d'alcool de ° croissante jusqu'à 100%, environ 2h), substitution par de la résine (1 volume epon-araldite (40% epon A, 60% epon B), et alcool 100°; 1-2h à température ambiante), imprégnation (epon-araldite, 12h température ambiante), et finalement inclusion en epon-araldite (à l'étuve 60°C, 24-48h). Les blocs de résine sont ensuite coupés à l'ultramicrotome à une épaisseur de 70nm pour être déposés sur une grille et colorés par acétate d'uranie puis par le citrate de plomb (en vue de diminuer les effets de charge). Ainsi prêtes, les grilles ont été observées grâce à l'aide d'un microscope électronique à transmission (TEM) : HT-7700 Hitachi 120kV (à Toulouse, CMEAB) ou H7650 Hitachi 120kv (à Bordeaux, BIC).

L'œdème a été estimé via la mesure des aires extra-cellulaires en microscopie électronique. Les images ont été prises de façon identique par rapport au tissu et dans des zones où la conservation structurale était de bonne qualité afin d'obtenir des résultats reproductibles. Les espaces étudiés correspondent aux espaces cardiomyocytes-cellules endothéliales en transversal. Ceux-ci ont été mesurés manuellement avec un grossissement constant de x5000 avec le logiciel Image J. Une longueur de référence de 1µm de paroi cardiomyocytaire (sarcolemme) a été choisie. Les deux cotés libres de l'aire mesurée se prolongent de manière perpendiculaire à cet axe, jusqu'à la paroi de la cellule endothéliale (FIGURE 26).

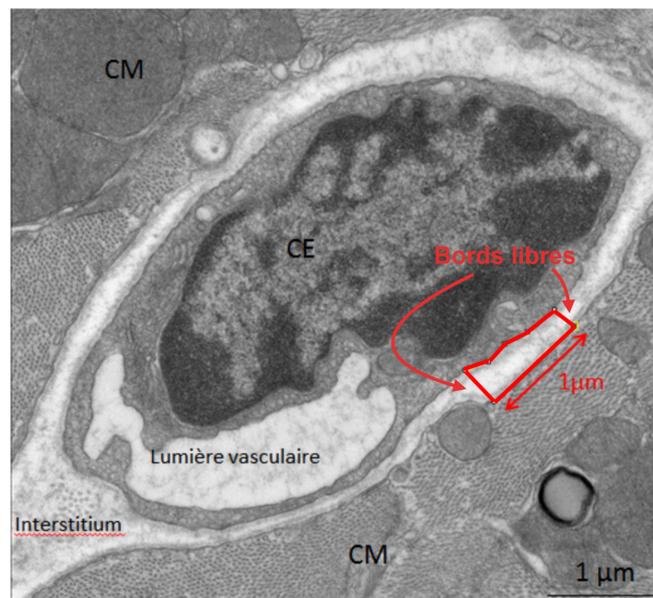


Figure 26. Calcul de l'aire interstitielle

Le nombre des vésicules a été quantifié manuellement sur n=8 vaisseaux par souris (n=4/groupe) sur des images prises à un grossissement de X5000. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism6.

La partie microscopie électronique et une partie des acquisitions MET ont été réalisées à Toulouse par le Dr Céline GUILBEAU-FRUGIER, au Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie (CMEAB), en collaboration avec le Dr Céline GALÉS, Inserm UMR 1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires de Toulouse. L'autre partie a été faite en collaboration avec le centre électronique du BIC.

Acquisition d'images et traitement :

Les colorations histologiques sont visualisées en microscopie optique avec un microscope à lumière transmise Zeiss Axio ScopeA.1 équipé d'une caméra AxioCam 105 color. Les images d'immunofluorescence ont été acquises au microscope confocal Zeiss Imager.Z294LSM700. Les images de microscopie électronique ont été acquises aux microscopes HT-7700 Hitachi 120kV et H7650 Hitachi 120kV (à Bordeaux, BIC). Les images de transparation ont été acquises au microscope ItraMicroscope[®], LaVision BioTec (BIC).

Toutes les images sont analysées à l'aide de logiciels d'imagerie analytique (ImageJ et Imaris) et quantifiées à l'aide d'un logiciel de statistique (Graphpad Prism6).

Analyses statistiques :

Les analyses statistiques ont été appliquées sur les données brutes obtenues et calculées à l'aide du logiciel GraphPad Prism6. Elles sont le résultat de la moyenne (\pm écart-types) d'au moins quatre individus. La perméabilité vasculaire (test de Miles) a été analysée statistiquement par l'analyse de variance Two-Way ANOVA. Les différents paramètres extraits de la transparation des capillaires ont été analysés par des régressions non-linéaires. La significativité de l'intégralité des autres expériences a été calculée par un test t de Student non paramétrique et non apparié (Mann-Whitney).

Pour toutes les analyses, $p \leq 0,05$ est considérée comme significative. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, NS = absence de significativité.

RÉSULTATS

Modèle murin de surexpression constitutive de *Pdzrn3* dans les cellules endothéliales

A. Analyse phénotypique

1. Expression du transgène

Afin d'examiner le rôle de la dysfonction endothéliale dans l'ICFep, nous avons étudié des souris sur-exprimant l'ubiquitine ligase PDZRN3 de manière constitutive dans les cellules endothéliales. La surexpression de cette protéine peut être visualisée par la mise en évidence de l'étiquette V5 du transgène ou du gène rapporteur, *LacZ* codant pour la β -galactosidase.

Tout d'abord, nous avons voulu vérifier l'efficacité de l'expression de la cassette transgénique au niveau du cœur et sa spécificité dans les cellules endothéliales. Pour cela, nous avons immunomarcqué des coupes de cœurs pour la β -galactosidase accompagnée d'un marquage podocalyxine afin d'identifier l'endothélium.

Le transgène est bien exprimé dans les cellules endothéliales cardiaques puisqu'un co-marquage β -galactosidase/podocalyxine est constaté. De plus, la recombinaison est efficace car on décompte environ 60% des noyaux des cellules endothéliales cardiaques positifs à la β -galactosidase (FIGURE 27).

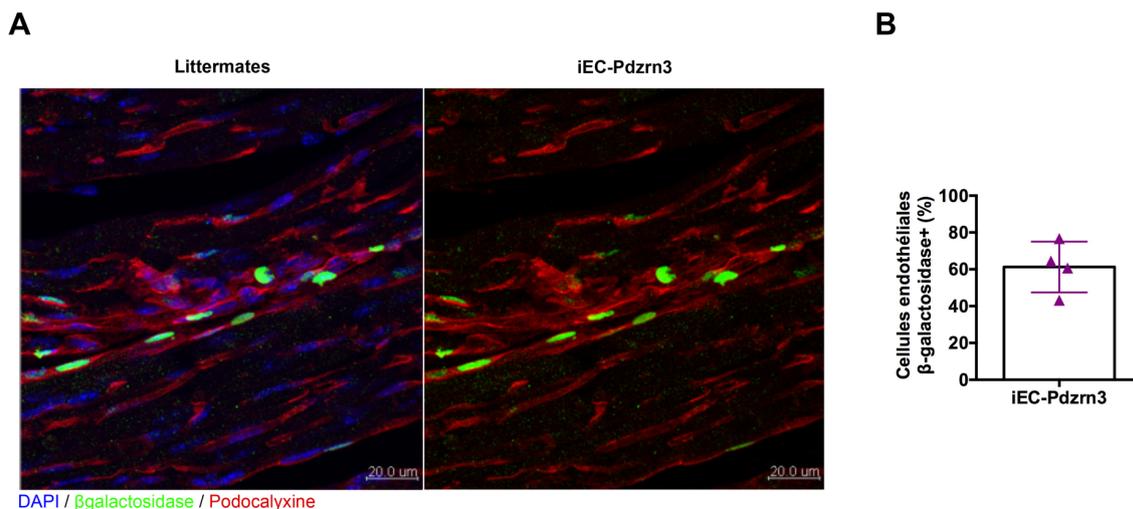


Figure 27. Le gène rapporteur *LacZ* est exprimé spécifiquement dans les cellules endothéliales cardiaques.

(A) Images représentatives de coupes de cœurs immunomarcquées pour la β -galactosidase (en vert) pour visualiser l'expression du gène rapporteur *LacZ* accompagné d'un marquage podocalyxine (en rouge) pour localiser l'endothélium des vaisseaux sanguins. iEC-Pdzrn3 n=4.

2. Paramètres morphologiques

L'exploration phénotypique des souris s'est poursuivie par des analyses morphologiques. Il apparaît que les souris iEC-Pdzn3 âgées de 8 mois ne présentent pas de défaut de croissance ni ne semblent développer d'hypertrophie myocardique puisque les poids de leurs corps ainsi que de leurs cœurs sont comparables à ceux de leurs littermates (**FIGURE 28**).

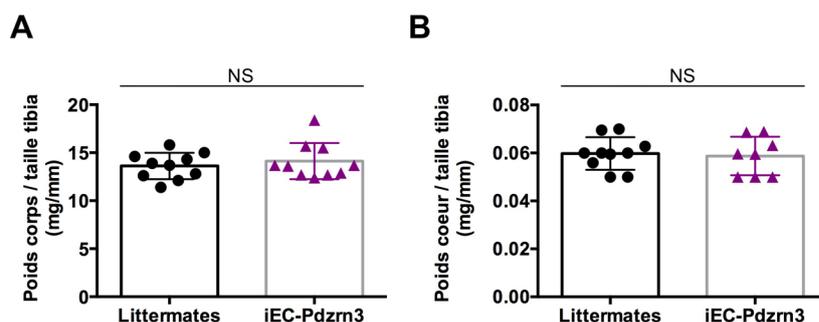


Figure 28. La surexpression de PDZRN3 dans l'endothélium n'entraîne pas de modification de poids du corps ou du cœur.

(A) Analyse du poids des souris rapporté à leur taille de tibia. (B) Analyse du poids du cœur de souris rapporté à leur taille de tibia. Littermates n=10, iEC-Pdzn3 n=10. Analyse statistique : Mann-Whitney. NS=non significatif.

3. Analyses transcriptomiques

Nous avons réalisé des isollements de cellules endothéliales cardiaques afin de confirmer l'expression du transgène dans l'endothélium.

Les souris iEC-Pdzn3 présentent une augmentation significative de l'expression du gène *Pdzn3*, spécifiquement dans les cellules endothéliales (**FIGURE 29A**). Cette augmentation nous confirme que le transgène menant à la surexpression du gène *Pdzn3* dans les cellules endothéliales est bien exprimé dans les souris iEC-Pdzn3. L'analyse des marqueurs endothéliaux tels que CD31 (*Pecam1*), claudine-5 (*Cldn5*), ZO1 (*Tjp1*) ou encore du marqueur spécifique des capillaires cardiaques *Meox2* (Coppiello Giulia *et al.*, 2015) révèle une homogénéité et reproductibilité de nos isollements de cellules endothéliales mais aussi l'absence de modification de ces marqueurs (**FIGURE 29B**). L'analyse transcriptomique de régulateurs de la voie Wnt canonique montre que cette voie ne semble pas être activée (**FIGURE 29C**). On observe

même une diminution de l'expression de *Ndp* qui est un activateur de la voie Wnt/ β -caténine (Chang *et al.*, 2015). En revanche, une diminution significative de l'expression de certains acteurs de la voie Wnt est observée (**FIGURE 29D**). Les ligands Wnt4 et Wnt9b ont été rapportés comme étant impliqués dans l'angiogenèse et la formation des valves cardiaques respectivement (Zhang *et al.*, 2015; Goddard *et al.*, 2017). Le gène *Fz4* est essentiel à la morphogénèse du réseau artériel (Markovič *et al.*, 2017) et *Sox17* est impliqué dans le maintien de la BHE (Corada *et al.*, 2019). Nous n'avons pas observé de modification dans l'expression de marqueurs classiques de dysfonction endothéliale tels que le marqueur de perméabilité *Plvap* (Plasmalemma Vesicle-Associated Protein) ou bien les marqueurs d'inflammation *IL6*, *Vcam1*, *Icam1* (**FIGURE 29E**).

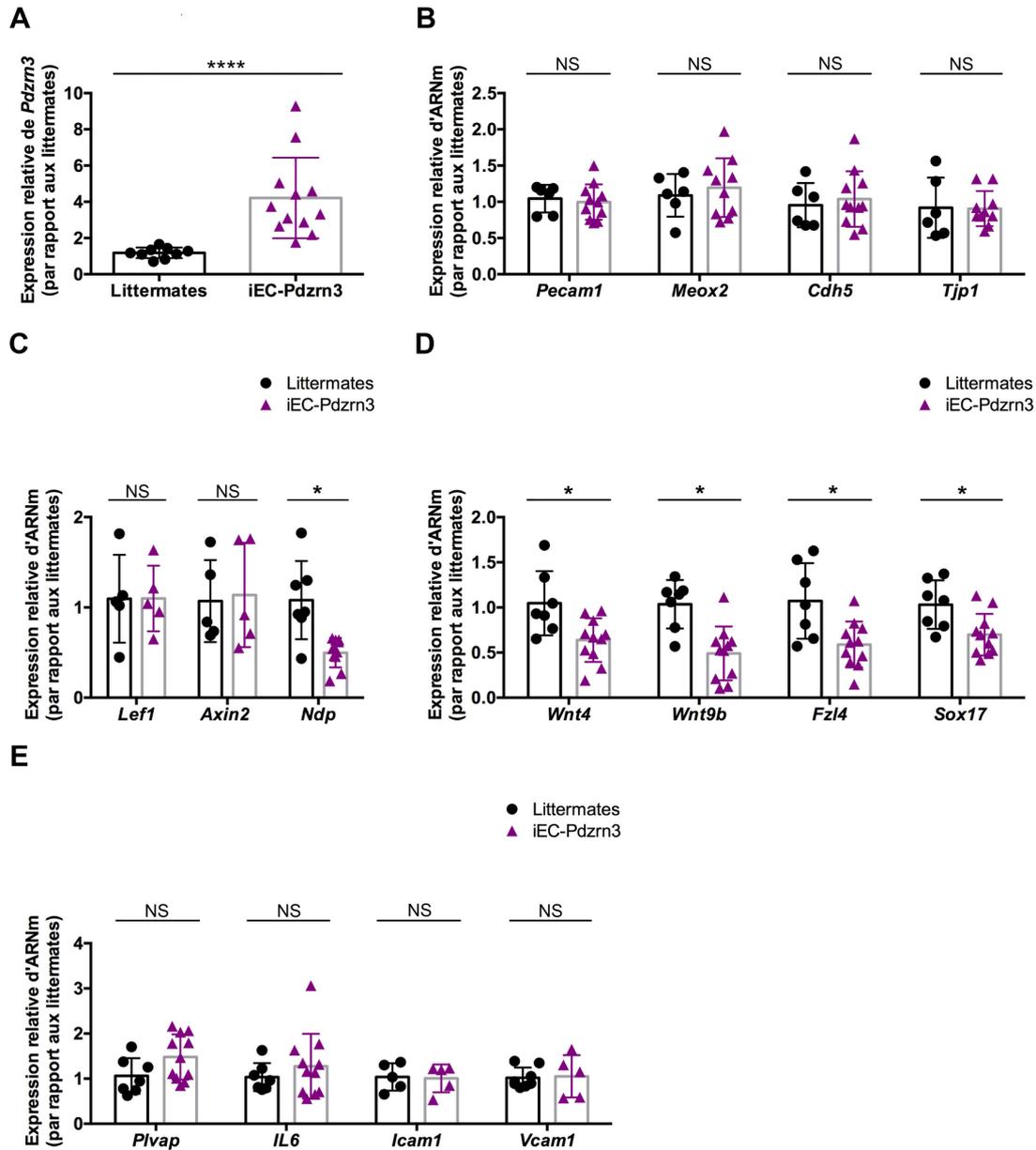


Figure 29. Analyse en RTqPCR après isolement de cellules endothéliales cardiaques.

Analyse par RTqPCR de l'expression (A) de *Pdzrn3*, (B) de marqueurs de cellules endothéliales, (C) de régulateurs de la voie Wnt canonique, (D) d'acteurs de la voie Wnt et (E) de marqueurs de dysfonction endothéliale. Les graphiques correspondent à 1 animal/point. Littermates n= 5-7, iEC-Pdzrn3 n= 5-7. Analyse statistique : Student t-test. *= $p < 0,05$, ****= $p < 0,001$, NS=non significatif.

L'analyse du transcriptome endothélial des souris iEC-Pdzrn3 montre que l'endothélium présente un phénotype classique de cellules endothéliales. Nous avons cependant observé des modifications dans l'expression de certains acteurs de la voie Wnt qui pourraient conférer un phénotype pathologique de l'endothélium.

4. Évaluation de l'hyperperméabilité *in vivo*

Nous avons ensuite voulu évaluer la perméabilité globale des souris iEC-Pdzn3. En effet, de précédentes expériences décrivent une mortalité intra-utérine chez des embryons surexprimant Pdzn3 dans l'endothélium liée à des défauts vasculaires et notamment de la perméabilité vasculaire (Sewduth *et al.*, 2017).

Afin d'explorer ces résultats chez l'adulte, nous avons effectué un test de Miles (Brash, Ruhrberg and Fantin, 2018) nous permettant d'évaluer la perméabilité cutanée sur les souris iEC-Pdzn3 ainsi que leurs littermates. Nous n'avons pas observé de différence significative dans l'extravasation du Bleu Evans entre les littermates et les souris iEC-Pdzn3 après injection de PBS. Cependant, lorsque la perméabilité vasculaire est stimulée avec du VEGF-A, on observe une augmentation significative de l'extravasation de Bleu Evans en comparaison avec la condition PBS et qui est plus importante chez les souris iEC-Pdzn3 par rapport à leurs littermates (FIGURE 30). Ces résultats attestent d'une perméabilité cutanée augmentée des souris iEC-Pdzn3 en condition VEGF-A.

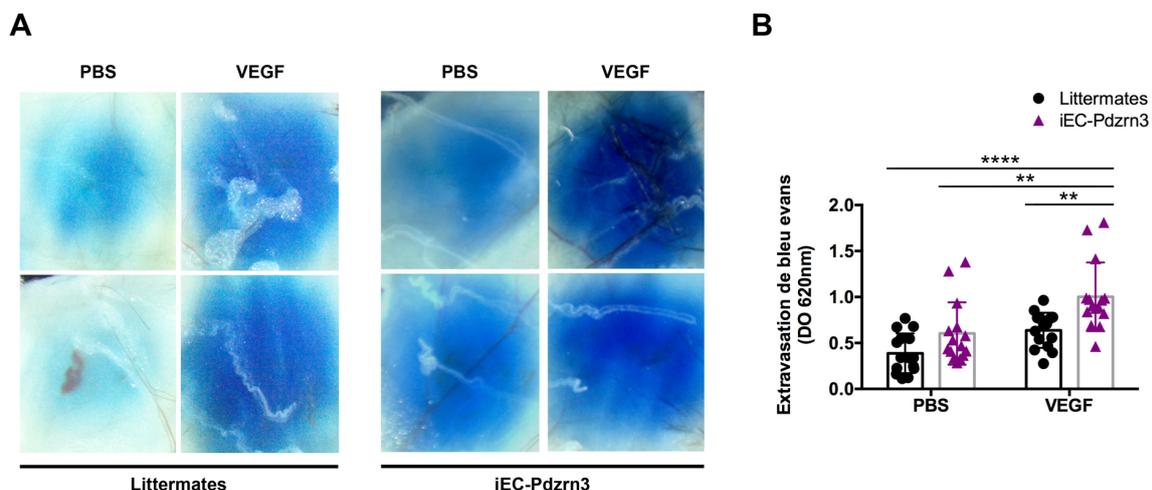


Figure 30. La surexpression de PDZRN3 dans l'endothélium entraîne une induction de la perméabilité vasculaire de la peau dorsale des souris en condition VEGF.

(A) Images représentatives de peau dorsale de souris après injection en retro-orbitale de Bleu Evans puis de PBS ou VEGF-A en sous-cutané sur les souris littermates (à gauche) et iEC-Pdzn3 (à droite). (B) Quantification de l'extravasation de Bleu Evans par lecture de la densité optique du formamide après incubation des morceaux de peau sur la nuit. Chaque point correspond à un patch de peau dorsale de souris (n=5/groupe). Analyse statistique : 2Way ANOVA. **= $p < 0,01$, ****= $p < 0,001$.

B. Analyses de la fonction cardiaque

L'ICFEP est caractérisée par l'incapacité du cœur à faire face aux besoins hémodynamiques de l'organisme à l'effort et au repos. Cette défaillance diastolique est liée à l'augmentation des pressions télédiastoliques du ventricule gauche aboutissant à une rigidité accrue du myocarde. L'augmentation de la post-charge sera, en effet, à l'origine d'un remodelage concentrique (épaississement des parois) du ventricule gauche généralement accompagné d'une fibrose interstitielle (Gladden, Linke and Redfield, 2014). La cellule endothéliale semble impliquée dans la physiopathologie de différentes maladies cardiovasculaire, dont l'ICFEP (Endemann and Schiffrin, 2004; Paulus and Tschöpe, 2013).

Nous avons émis l'hypothèse que la surexpression de *Pdzrn3* spécifiquement dans les cellules endothéliales allait provoquer une dysfonction de ces dernières suffisante pour induire, chez les souris, un phénotype cardiaque de type ICFEP. Toutes les expériences qui suivront seront effectuées sur des animaux âgés de 8 mois.

Dans le but de valider notre postulat, nous avons exploré la fonction cardiaque de ces souris par différents paramètres comme des mesures échocardiographiques, hémodynamiques, gravimétriques, des analyses en RTqPCR, ou encore par un test de capacité à l'effort.

1. Analyses hémodynamiques et échocardiographiques

Les souris iEC-*Pdzrn3* présentent un dysfonctionnement diastolique attesté par une augmentation significative des pressions télédiastoliques associées à une fraction d'éjection normale (>50%) au repos (**FIGURE 31**).

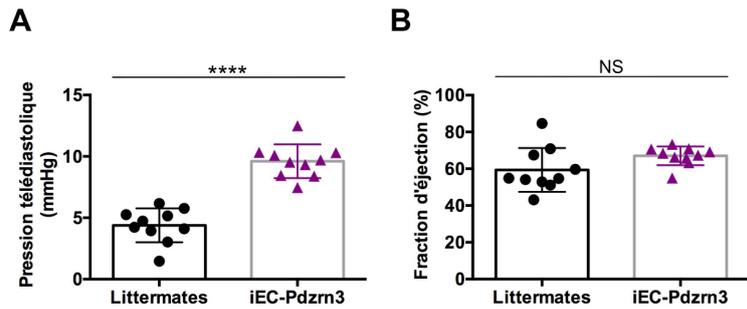


Figure 31. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium manifestent des signes de dysfonction diastolique avec une augmentation des pressions télédiastoliques et une fraction d'éjection préservée.

(A) Mesure des pressions télédiastolique par cathétérisme (B) Evaluation de la fraction d'éjection par échocardiographie. Littermates n=10, iEC-Pdzrn3 n=10. Analyse statistique : Mann-Whitney. ****= $p < 0,001$, NS=non significatif.

Nous n'avons, en revanche, pas relevé de différence entre les souris iEC-Pdzrn3 et leurs littermates dans l'analyse d'autres marqueurs hémodynamiques indicateurs de dysfonction diastolique rapportés chez des patients atteints d'ICFEP (Penicka *et al.*, 2010), tels que la fréquence cardiaque, la vitesse de relaxation cardiaque (min dP/dt) ou encore la constante de relaxation (Tau) au repos (FIGURE 32).

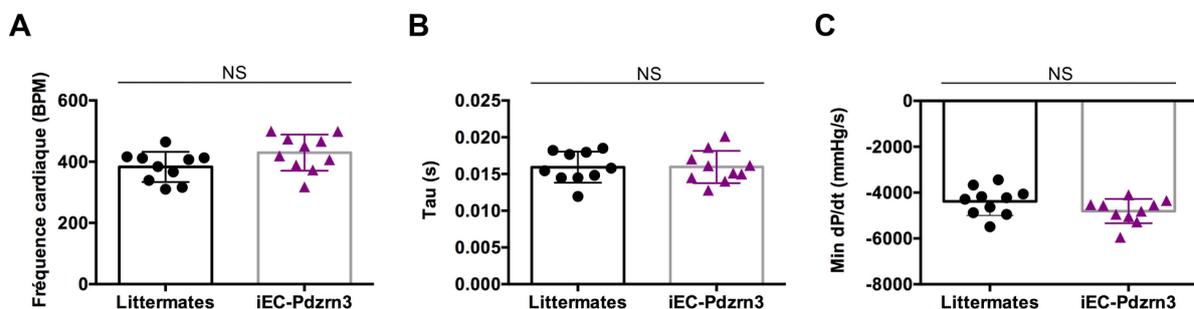


Figure 32. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium ne présentent pas d'autres signes de dysfonction cardiaque après explorations par cathétérisme.

Évaluation par cathétérisme (A) de la fréquence cardiaque (BPM = battements par minute), (B) de la constante de temps de la relaxation isovolumique (Tau), et (C) la vitesse de relaxation isovolumique (min dP/dt) au repos. Littermates n=10, iEC-Pdzrn3 n=10. Analyse statistique : Mann-Whitney. NS=non significatif.

Bien qu'une augmentation des pressions télédiastoliques soit associée à un remodelage du ventricule gauche (Burkhoff, Mirsky and Suga, 2005), aucune anomalie structurelle n'a pu être mise en évidence après l'examen échographique des cœurs des souris iEC-Pdzrn3 en comparaison à leurs littermates. En effet, l'absence de l'augmentation de la masse ventriculaire gauche, de la taille du septum

interventriculaire en diastole ou encore de la paroi postérieure ventriculaire gauche en diastole indique qu'aucun remodelage cardiaque n'a eu lieu (FIGURE 33).

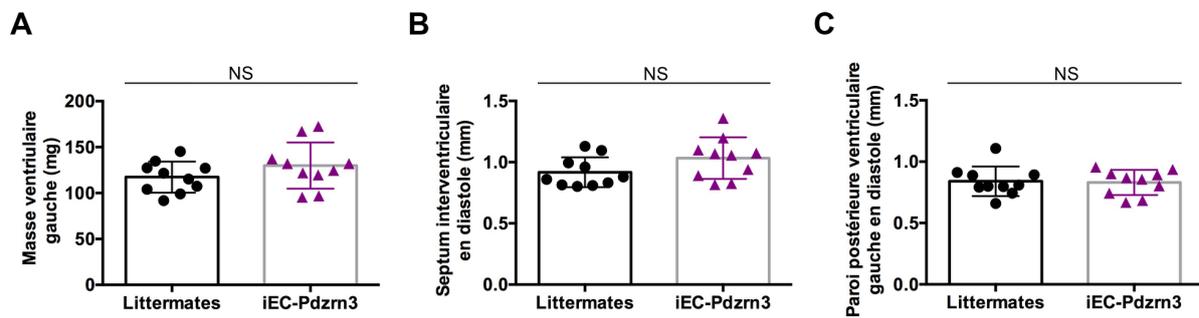


Figure 33. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium ne présentent pas de signes de remodelage myocardique.

Mesures échographiques (A) de la masse ventriculaire gauche, (B) du septum interventriculaire en diastole, et (C) de la paroi postérieure ventriculaire gauche en diastole. Littermates n=10, iEC-Pdzm3 n=10. Analyse statistique : Mann-Whitney. NS=non significatif.

2. Analyses de biomarqueurs cardiaques

L'analyse des oreillettes des souris iEC-Pdzm3 montre une augmentation significative de l'expression du biomarqueur détecté dans l'ICFep, le facteur natriurétique auriculaire (*ANP*) (Cheng *et al.*, 2013; Tromp *et al.*, 2017) (FIGURE 34), consolidant ainsi les signes de dysfonction cardiaque démontrés par l'augmentation de la pression télédiastolique.

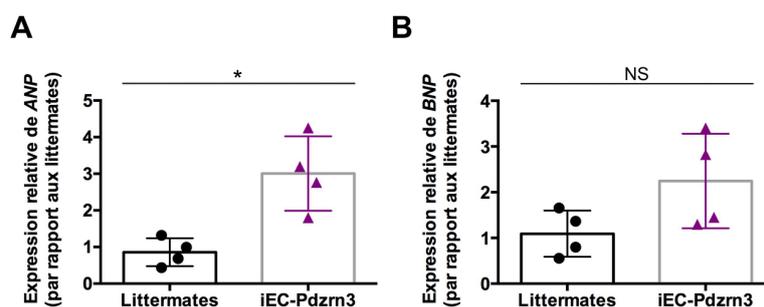


Figure 34. L'analyse par RT-qPCR des oreillettes des souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium montrent une augmentation de l'expression de l'*ANP*.

Analyse par RTqPCR de l'expression (A) de l'*ANP* (Atrial Natriuretic Peptide) et (B) du *BNP* (Brain Natriuretic Peptide) sur des oreillettes. Littermates n=10, iEC-Pdzm3 n=10. Analyse statistique : Mann-Whitney. *=p<0,05, NS=non significatif.

3. Évaluations gravimétriques

Chez certains patients atteints d'ICFEP, des symptômes congestifs peuvent apparaître. En effet, une élévation de la pression de l'oreillette gauche et des capillaires pulmonaires peut aboutir à une extravasation liquidienne vers les alvéoles pulmonaires aboutissant dans les cas les plus graves à un œdème pulmonaire aigu (Guazzi, Gomberg-Maitland and Arena, 2015). Récemment, il a été mis en évidence qu'après un infarctus du myocarde, la fonction cardiaque pouvait être affectée par la présence d'un œdème myocardique (Henri *et al.*, 2016). Bien que l'on ne sache pas si ce phénomène se produit chez les patient atteints d'ICFEP, nous avons, de principe, analysé ce paramètre chez les souris.

Les mesures d'eau extravasculaire (œdème) par gravimétrie ne nous ont pas permis de mettre en évidence la présence d'œdème pulmonaire et cardiaque chez les souris iEC-Pdzrn3 (FIGURE 35).

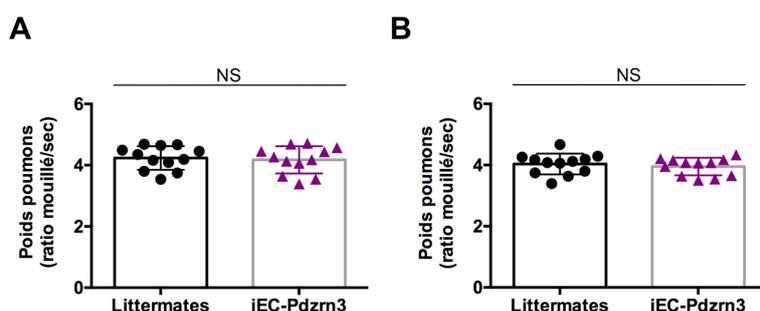


Figure 35. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium ne présentent pas de signes d'œdème pulmonaire ou cardiaque par analyse gravimétrique.

Mesures d'œdème (A) pulmonaire et (B) cardiaque par gravimétrie. Littermates n=12, iEC-Pdzrn3 n=12. Analyse statistique : Mann-Whitney. NS=non significatif.

4. Épreuve d'effort

Les souris iEC-Pdzrn3 présentant des signes de dysfonction diastolique au repos, nous avons décidé d'observer leur capacité à l'effort. Les souris ont ainsi été soumises à des exercices de course sur tapis de course afin d'évaluer leur résistance cardiaque à l'effort.

L'expérience se déroule sur un tapis roulant disposant de 6 voies distinctes où la vitesse ainsi que la pente peuvent être ajustées. Après un échauffement de 4 minutes

à 5m/min avec une pente de 20%, la vitesse du tapis augmente par paliers jusqu'à atteindre un maximum de 32 m/min (FIGURE 36).

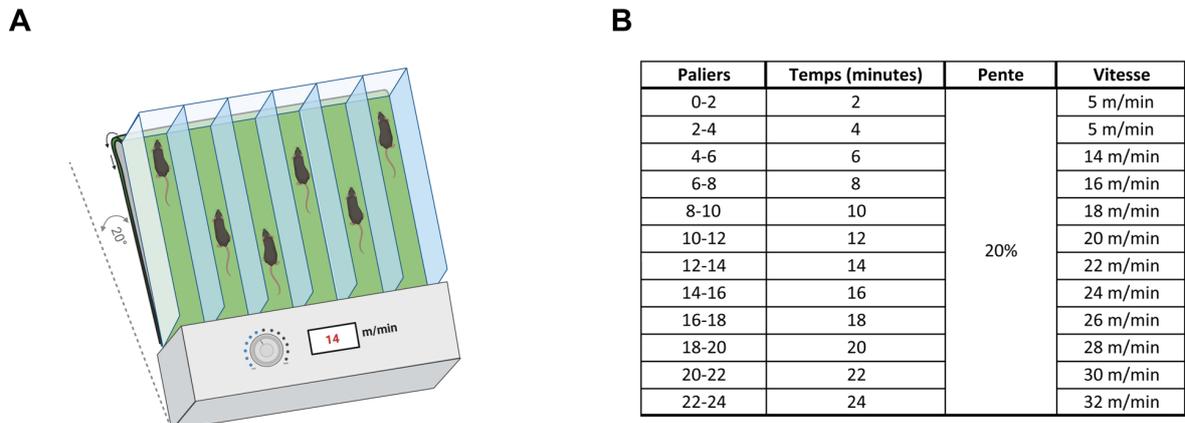


Figure 36. Protocole de course sur tapis roulant

(A) Le tapis roulant utilisé pour cette étude possède 6 voies de course séparées avec la capacité de changer la vitesse ainsi que la pente. (B) Après un échauffement de 4 minutes, la vitesse est fixée à 14 m/min puis augmentée de manière progressive de 2m/min toutes les 2 minutes avec une pente fixée à 20%.

Des grilles de stimulation électrique sont présentes à l'assise du tapis. La majorité des protocoles retrouvés dans la littérature se fondent uniquement sur le décompte de stimulation électrique pour définir l'épuisement (Rao *et al.*, 2019; Schiattarella *et al.*, 2019). Devant l'hétérogénéité des résultats préliminaires que nous avons obtenus avec ces protocoles, nous avons dû procéder à plusieurs ajustements afin d'améliorer la pertinence, l'efficacité et la reproductibilité des résultats. Nous avons pour cela suivi les mouvements des souris par vidéo pendant tout le temps de course afin de définir des comportements de fatigue et d'épuisement de la part des animaux. Chaque couloir a été divisé en trois zones : l'avant du tapis de course (premier tiers), la « zone de fatigue » (tiers médian) ainsi que la « zone d'épuisement » (dernier tiers) (FIGURE 37). Nous avons défini la fatigue lorsque l'animal présente des difficultés à maintenir son rythme de course et se positionne dans la « zone de fatigue » pendant plus de 30 secondes par palier ; et l'épuisement lorsque l'animal est incapable de suivre le rythme de la course et se situe pendant 10 secondes dans la « zone d'épuisement ». Les signes de fatigue et d'épuisement représentent nos critères fonctionnels témoignant

de troubles de la fonction cardiaque. A noter que lorsqu'un animal présente des signes d'épuisements, le test prend immédiatement fin.

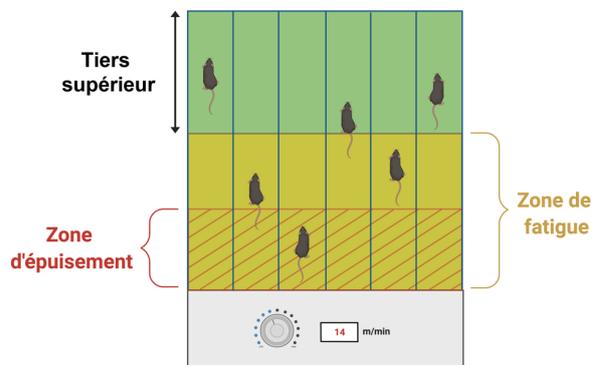


Figure 37. Définition de zones sur le tapis afin de déterminer les comportements de fatigue et d'épuisement des souris pendant l'exercice.

À l'instar des patients atteints d'ICFEP (Upadhyya, Haykowsky, *et al.*, 2015), les souris iEC-Pdzrn3 font preuve d'une tolérance réduite à l'exercice par rapport à leurs littermates. En effet, l'observation des profils de course montre que les littermates présentent un enregistrement de course plus étendu (FIGURE 38A). De ce fait, les souris iEC-Pdzrn3 affichent un temps de course réduit par rapport à leurs littermates (FIGURE 38B). L'analyse du temps cumulé passé par chaque souris dans le premier tiers du tapis montre que les souris iEC-Pdzrn3 ne parviennent plus à se positionner dans cette zone à partir du palier 14-16 alors que les littermates ne commencent à éprouver des difficultés qu'à partir du palier 16-18 (FIGURE 38C). L'analyse de la répartition des souris à l'arrêt ou ayant passé plus ou moins de 30 secondes dans le tiers supérieur du tapis entre les paliers 12-14 et 14-16 nous montre une tendance franche des souris iEC-Pdzrn3 à présenter des signes de fatigue. En effet, pendant le palier 12-14, environ 40% des souris passent moins de 30 secondes dans le tiers supérieur du tapis. A l'atteinte du palier 16-18, cette proportion double et passe à environ 80% avec plus de 50 % de souris à l'arrêt. A l'inverse, on observe une faible évolution dans la répartition des littermates, avec seulement 25% des souris passant moins de 30 secondes dans le tiers supérieur du tapis de course au palier 12-14 à 35% pour le palier 14-16 (FIGURE 38D). Les souris iEC-Pdzrn3 présentent donc des signes de fatigue précoce par rapport à leurs littermates qui parviennent à se maintenir plus longtemps dans le tiers supérieur du tapis.

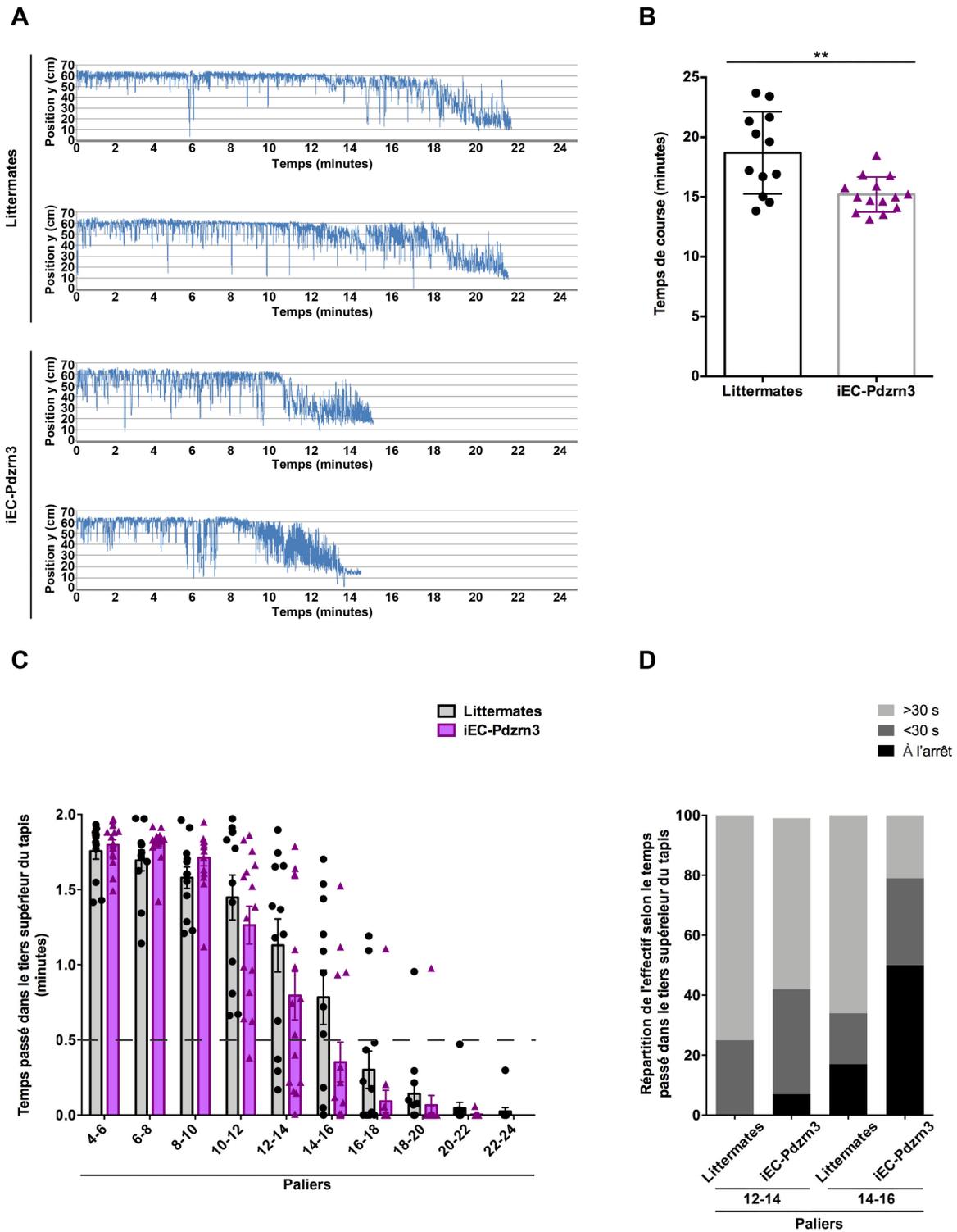


Figure 38. Les souris iEC-Pdzm3 affichent un temps de course sur tapis roulant réduit par rapport à leurs littermates

(A) Profils de course de souris. Les graphiques montrent la position de la souris sur le tapis de course (axe y) en fonction du temps. (B) Temps de course total (C) Temps passé dans le tiers supérieur du tapis par individu et par palier (D) Répartition des souris selon leur statut dans le tiers supérieur du tapis. Littermates n=12, iEC-Pdzm3 n=14. Analyse statistique : Mann-Whitney. **=p<0,01.

Dans l'ensemble, ces données montrent que les souris iEC-Pdzrn3 présentent une dysfonction diastolique au repos ainsi que des capacités à l'effort réduites. Même si les souris ne présentent pas tous les phénotypes de l'ICFEP, elles apparaissent comme un véritable modèle murin permettant l'exploration de l'insuffisance cardiaque. La suite de notre travail a consisté à étudier le phénotype cardiaque des souris iEC-Pdzrn3 afin de comprendre l'origine de ces signes de dysfonction diastolique. Nous nous sommes en particulier intéressés à l'inflammation, aux cellules contractiles ainsi qu'aux phénotypes vasculaires.

C. Contexte inflammatoire

Il a été prouvé que les comorbidités associées à l'ICFEP favorisent l'émergence d'une inflammation systémique de bas grade. Celle-ci va déclencher l'expression de molécules d'adhésions endothéliales ainsi qu'une libération accrue de cytokines et chimiokines inflammatoires. Ces phénomènes vont alors favoriser l'infiltration de cellules inflammatoires, en particulier de monocytes dans le tissu cardiaque (Franssen *et al.*, 2016).

1. Mesure de la numération de la formule sanguine

Afin d'investiguer le contexte inflammatoire présent chez les souris iEC-Pdzrn3, nous avons d'abord effectué une numération de la formule sanguine. Il apparaît que les souris mutantes présentent un nombre de cellules inflammatoires circulantes comparable à celui de leurs littermates (**FIGURE 39**).

Paramètres	Littermates (n=4)	iEC-Pdzrn3 (n =4)
GB ($10^3/\text{mm}^3$)	5,75 \pm 0,9	6,53 \pm 0,74
LYM (%)	75,78 \pm 5,99	79,83 \pm 2,33
MON (%)	4,30 \pm 0,15	3,73 \pm 0,33
GRA (%)	19,9 \pm 5,89	16,70 \pm 2,25
EOS (%)	1,60 \pm 0,10	1,5 \pm 1,05
HT (%)	41,30 \pm 0,85	44,13 \pm 2,99
GR ($10^6/\text{mm}^3$)	9,04 \pm 0,27	9,73 \pm 0,73
PLA ($10^3/\text{mm}^3$)	786,50 \pm 55,75	697,25 \pm 51,75

Figure 39. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium ne présentent pas de modification de la numération de la formule sanguine.

Numération des éléments figurés du sang. GB : globules blancs, LYM : lymphocytes, MON : monocytes, GRA : granulocytes, EOS : éosinophiles, HT : hématoците, GR : globules rouges, PLA : plaquettes. Littermates n=4, iEC-Pdzrn3 n=4. Analyse statistique : Student t-test.

2. Analyse de l'activation endothéliale

Nous avons ensuite examiné l'état d'activation des cellules endothéliales, puisqu'une régulation à la hausse de facteurs d'adhésions est observée dans l'ICFEp (Franssen *et al.*, 2016). Ces facteurs sont stimulés par des cytokines inflammatoires et permettent l'afflux de cellules immunitaires proches du site d'inflammation. L'analyse des facteurs d'adhésion par immunofluorescence ou RT-qPCR sur des biopsies de cœurs entiers n'a pas montré de signe d'activation des cellules endothéliales chez les souris iEC-Pdzrn3. Dans nos différents groupes de souris, ces facteurs sont peu exprimés et uniquement présents sur les artères coronaires (FIGURE 40A-D). L'analyse de l'expression de l'interleukine 6 (cytokine pro-inflammatoire) par RT-qPCR sur des biopsies de cœurs paraît corroborer ces résultats. En effet, nous retrouvons une expression comparable entre les souris iEC-Pdzrn3 et leurs littermates (FIGURE 40E). Les cœurs des souris iEC-Pdzrn3 ne semblent donc pas être dans un environnement pro-inflammatoire qui mènerait à la synthèse de facteurs d'adhésions par les cellules endothéliales.

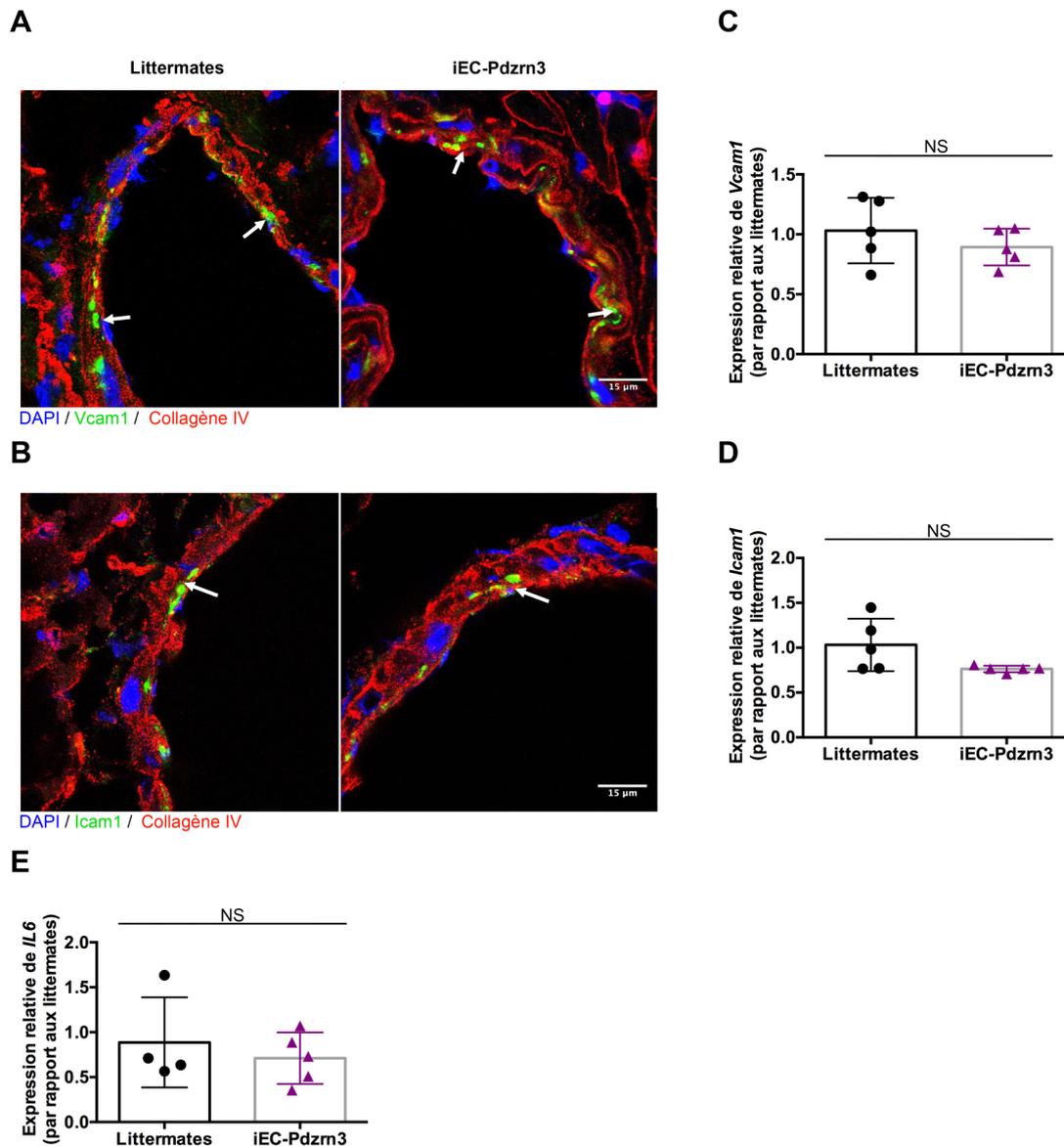


Figure 40. La surexpression de Pdzm3 dans l'endothélium ne provoque pas d'augmentation d'expression de molécules d'adhésion.

Images représentatives de coupes de cœurs immunomarquées pour les marqueurs d'adhésion (A) Vcam1 (en vert) et (B) anti-Icam1 (en vert). Analyse de l'expression par RT-qPCR de (C) Vcam1, (D) Icam1 et (E) IL6 sur des biopsies de cœurs. Littermates n=5, iEC-Pdzm3 n=5. Analyse statistique : Mann-Whitney. NS=non significatif.

3. Analyse du contenu inflammatoire cardiaque

Afin d'examiner les caractéristiques d'une éventuelle inflammation cardiaque, nous avons en premier lieu immunomarqué des coupes de cœurs avec le CD68, marqueur conventionnel pour les macrophages. Nous n'avons pas distingué de différence significative dans le nombre de macrophages présents dans le parenchyme cardiaque entre les souris iEC-Pdzm3 et leurs littermates (**FIGURE 41**).

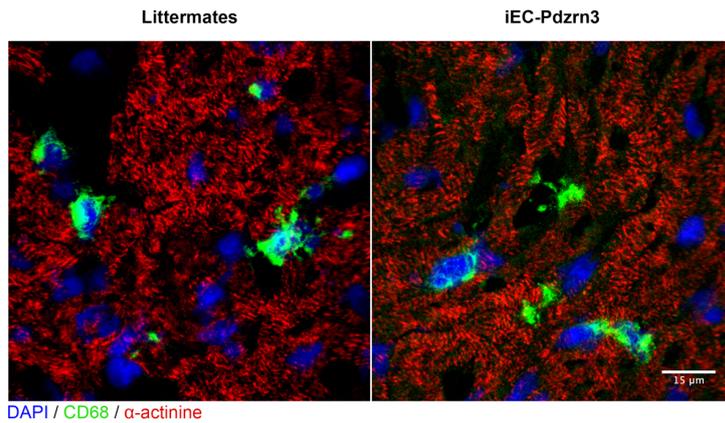
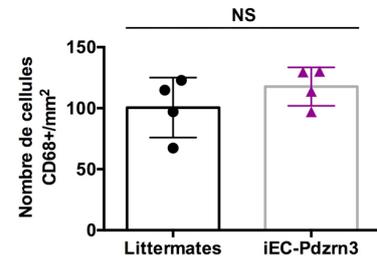
A**B**

Figure 41. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium ne présentent pas d'augmentation d'infiltration de macrophages dans le parenchyme cardiaque.

(A) Images représentatives de coupes de cœurs immunomarquées pour le marqueur de la lignée macrophagique CD68 (en vert) pour identifier les macrophages. (B) Quantification de l'infiltration des macrophages. Littermates n=4, iEC-Pdzrn3 n=4. Analyse statistique : Mann-Whitney. NS=non significatif.

Afin de confirmer ces résultats et élargir notre spectre d'analyse, nous avons procédé à des cytométries en flux. L'utilisation de billes de comptage nous a permis de déterminer la concentration cellulaire de différentes populations immunitaires qui pourrait jouer un rôle dans le développement et l'exacerbation de la dysfonction cardiaque des souris iEC-Pdzrn3.

L'utilisation de marqueurs spécifiques nous a permis d'identifier les leucocytes (cellules CD45⁺) ainsi que les lymphocytes T (cellules CD3 ϵ ⁺), les lymphocytes B (cellules CD19⁺) et les cellules myéloïdes (CD11b⁺) qui découlent tous de cette population. La stratégie d'analyse hiérarchique des échantillons pour la cytométrie en flux avec les différents marqueurs cellulaires est détaillée (**FIGURE 42**).

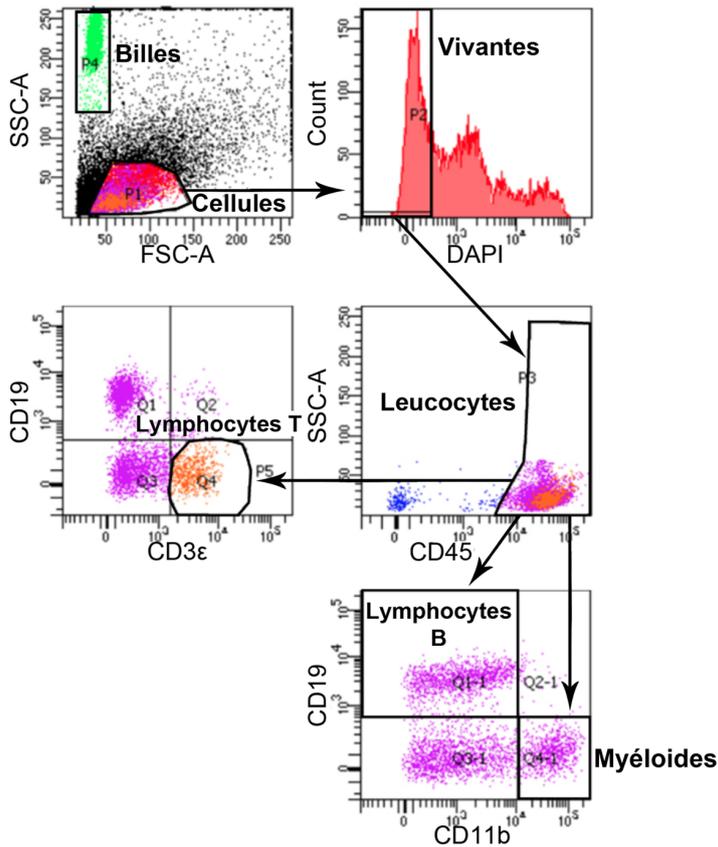


Figure 42. Stratégie de gating pour la cytométrie en flux du contenu inflammatoire cardiaque.

Seules les cellules viables sont analysées. Les différentes populations de cellules immunitaires découlent toutes des cellules CD45+. Anticorps CD45 = leucocytes, CD3ε (CD45+CD3ε+=Lymphocytes T), CD11b (CD45+CD11b+ = cellules myéloïdes), CD19 (CD45+CD19+ = lymphocytes B). Le compte de billes (en haut à gauche) permet le comptage absolu du nombre de cellules des différentes populations analysées.

L'analyse de cette expérience ne montre pas de différence significative dans la concentration cellulaire des leucocytes, cellules myéloïdes, lymphocytes B ou T présents dans les cœurs des souris iEC-Pdzn3 par rapport à leurs littermates (FIGURE 43).

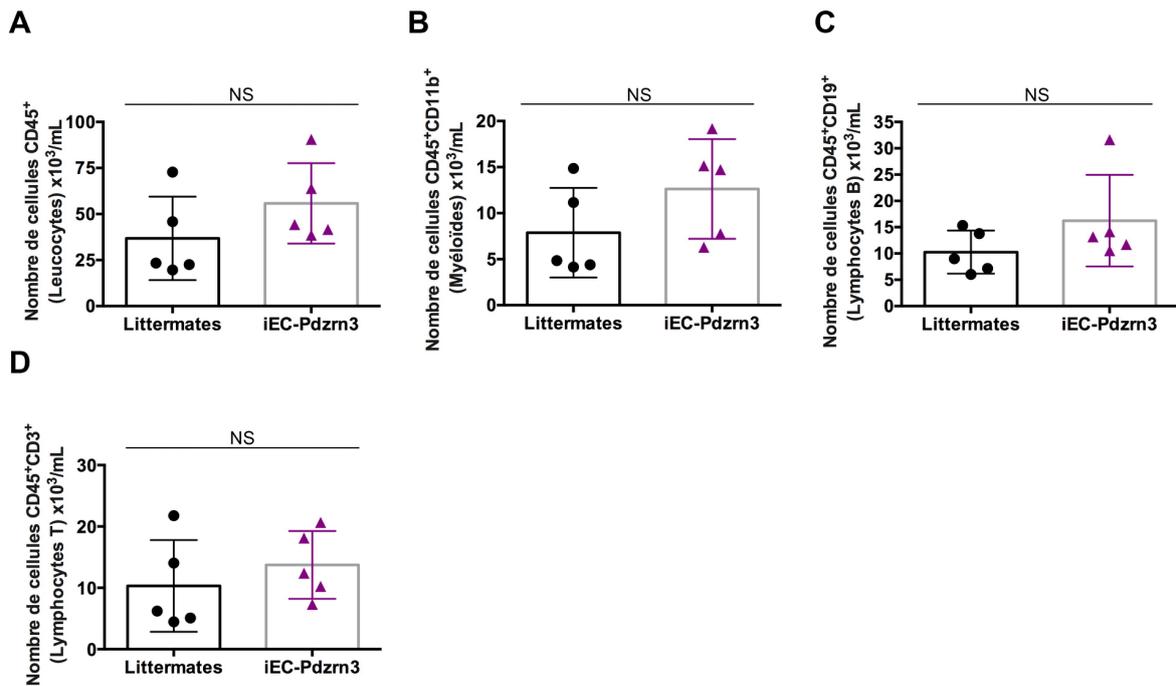


Figure 43. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium ne présentent pas d'augmentation de l'infiltration de cellules inflammatoires dans le parenchyme cardiaque.

Concentration de (A) leucocytes (CD45⁺), (B) Cellules myéloïdes (CD45⁺CD11b⁺), (C) Lymphocytes B (CD45⁺CD19⁺) et (D) Lymphocytes T (CD45⁺CD3⁺) présents dans les cœurs de souris. Littermates n=5, iEC-Pdzn3 n=5). Analyse statistique : Mann-Whitney. NS=non significatif.

Ces résultats démontrent l'absence d'une modification du contenu inflammatoire cardiaque chez les souris iEC-Pdzn3. Ces données confortent l'idée que les souris iEC-Pdzn3 ne sont pas dans un état d'inflammation systémique et/ou cardiaque, ce qui expliquerait l'absence de la synthèse de facteur d'adhésion par les cellules endothéliales.

Au vu de ces résultats, nous avons par la suite voulu approfondir le *type* de cellules immunitaires présentes, en particulier des monocytes. En effet, comme expliqué antérieurement, il est observé dans l'ICFEp la mobilisation et l'infiltration de monocytes dans le parenchyme cardiaque. S'ensuit une différenciation des macrophages en type M1 (pro-inflammatoire) puis plus tardivement, et par la sécrétion de cytokine et de chimiokine, la différenciation des macrophages en type M2 (anti-inflammatoire) (Brenes-Castro *et al.*, 2018). La réponse inflammatoire permet initialement, la réparation tissulaire mais favorise le remodelage et la dysfonction cardiaque lorsqu'elle

est persistante. Les macrophages M2, par exemple, peuvent conduire à la formation de fibrose réactive stimulée par la sécrétion de TGF β .

L'idée de cette deuxième expérience de cytométrie en flux était de rechercher la présence éventuelle d'un déséquilibre dans le type de macrophages présents au sein de leurs tissus cardiaques, et notamment les proportions de macrophages de types M1 (pro-inflammatoire) et M2 (anti-inflammatoire). Grâce à un panel d'anticorps nous avons pu séparer différentes populations : leucocytes (cellules CD45⁺), cellules myéloïdes (cellules CD11B⁺) et neutrophiles (cellules LY6G⁺). Les deux populations de macrophage découlent toutes deux des cellules myéloïdes (CD45⁺CD11b⁺) et ont été identifiées par des marqueurs spécifiques : macrophages M1 (LY6C⁺CCR2⁺CD206⁻) et macrophages M2 (LY6C⁻CCR2⁻CD206⁺). La stratégie d'analyse hiérarchique des échantillons pour la cytométrie en flux avec les différents marqueurs cellulaires est détaillée (**FIGURE 44**).

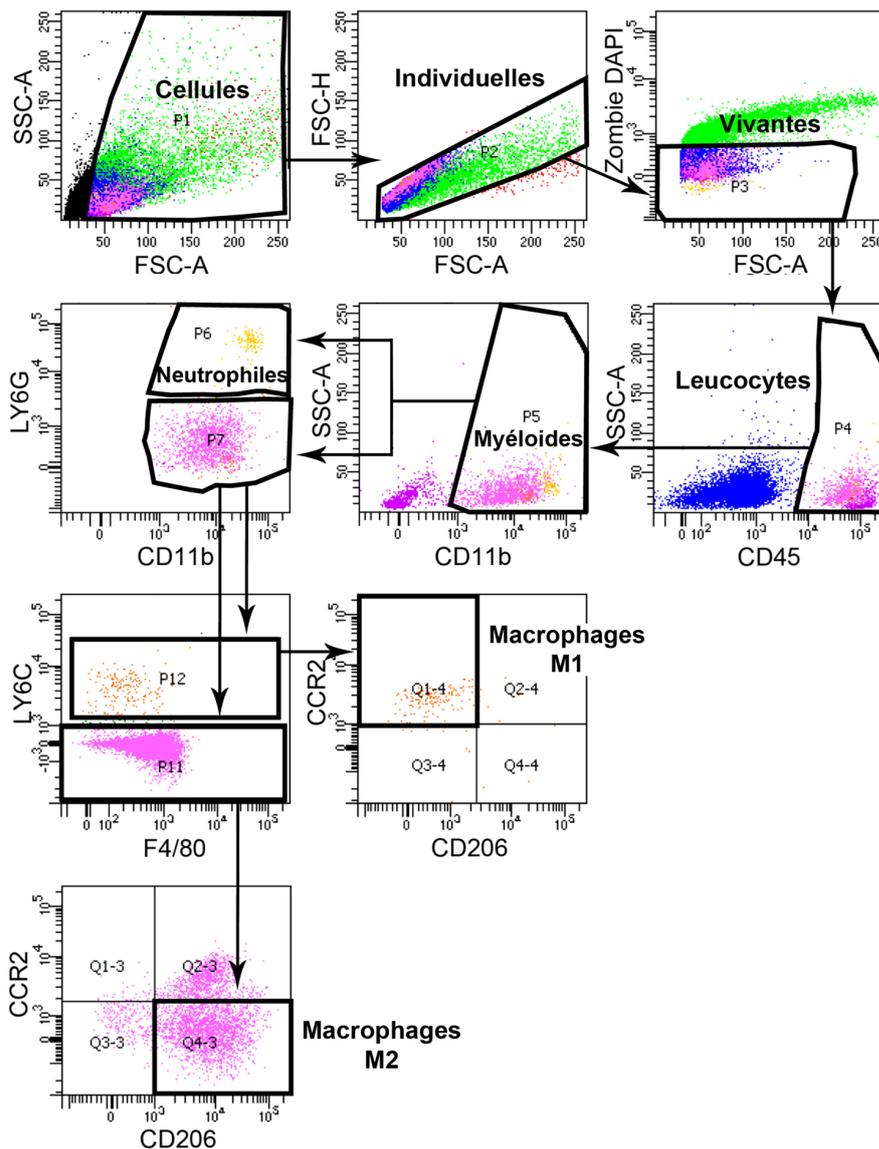


Figure 44. Stratégie de gating pour la cytométrie en flux du type de macrophages cardiaque.

Seules les cellules individuelles et viables sont analysées. Les différentes populations de cellules immunitaires découlent toutes des cellules CD45+. Anticorps CD45= leucocytes, CD11b (CD45⁺CD11b⁺= cellules myéloïdes), LY6G (CD45⁺CD11b⁺=Neutrophiles), CCR2 (CD45⁺CD11b⁺LY6G⁻LY6C⁺CCR2⁺= Macrophages de type M1), CD206 (CD45⁺CD11b⁺LY6G⁻LY6C⁺CCR2⁺= Macrophages de type M2).

Les résultats de cette expérience ne révèlent pas de différence dans le type de macrophages présents dans les tissus cardiaques des souris iEC-Pdzrn3 par rapport à leurs littermates. Les deux groupes de souris arborent une majorité de macrophages anti-inflammatoires de type M2 dans les cœurs (FIGURE 45).

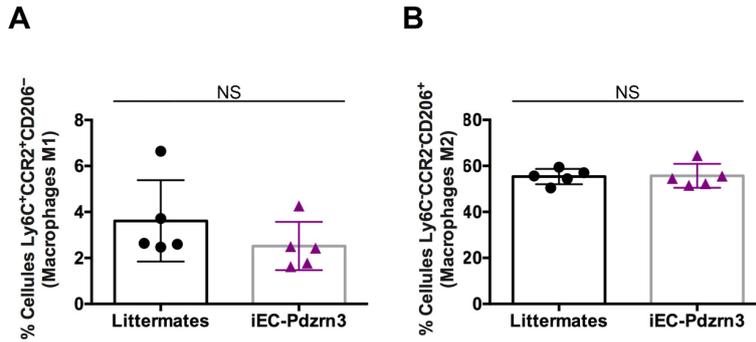


Figure 45. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium ne présentent pas de déséquilibre des types de macrophages présents dans le parenchyme cardiaque.

Répartition (A) des macrophages de type M1 (CD45⁺CD11b⁺LY6G⁻LY6C⁺CCR2⁺) et (B) des macrophages de type M2 (CD45⁺CD11b⁺LY6G⁻LY6C⁺CCR2⁺) au sein des cœurs de souris. Littermates n=5, iEC-Pdzrn3 n=5. Analyse statistique : Mann-Whitney. NS=non significatif.

4. Évaluation de la matrice extracellulaire

La fibrose cardiaque ainsi que les modifications de la matrice extracellulaire sont souvent associées à l'ICFep et seraient fortement en lien avec l'inflammation (Westermann *et al.*, 2011). Nous avons donc évalué la fibrose périvasculaire chez nos souris.

La coloration au Rouge Sirius s'est avérée être comparable entre les cœurs des souris iEC-Pdzrn3 par rapport à leurs littermates (FIGURE 46A-B). Ces résultats semblent être confortés par l'analyse en RTqPCR de biopsies de cœur de l'expression de la chaîne de collagène alpha 1 de type I (Col1a1) et de type III (Col3a1) qui sont comparables entre les souris iEC-Pdzrn3 et leurs littermates (FIGURE 46C-D). Il en est de même pour l'expression de l'enzyme Lysyl-oxydase (LOX) qui favorise le pontage du collagène et de l'élastine et dont l'expression joue un rôle sur la rigidité myocardique (Kasner *et al.*, 2011) (FIGURE 46E). Nous avons également analysé par RTqPCR l'expression de marqueurs de remodelage de la matrice extracellulaire qui jouent eux aussi un rôle la

rigidité cardiaque mais aucune différence n'a été observée dans l'expression de *Tgfb1*, *MMP2* ou encore de *MMP9* (FIGURE 46F-H).

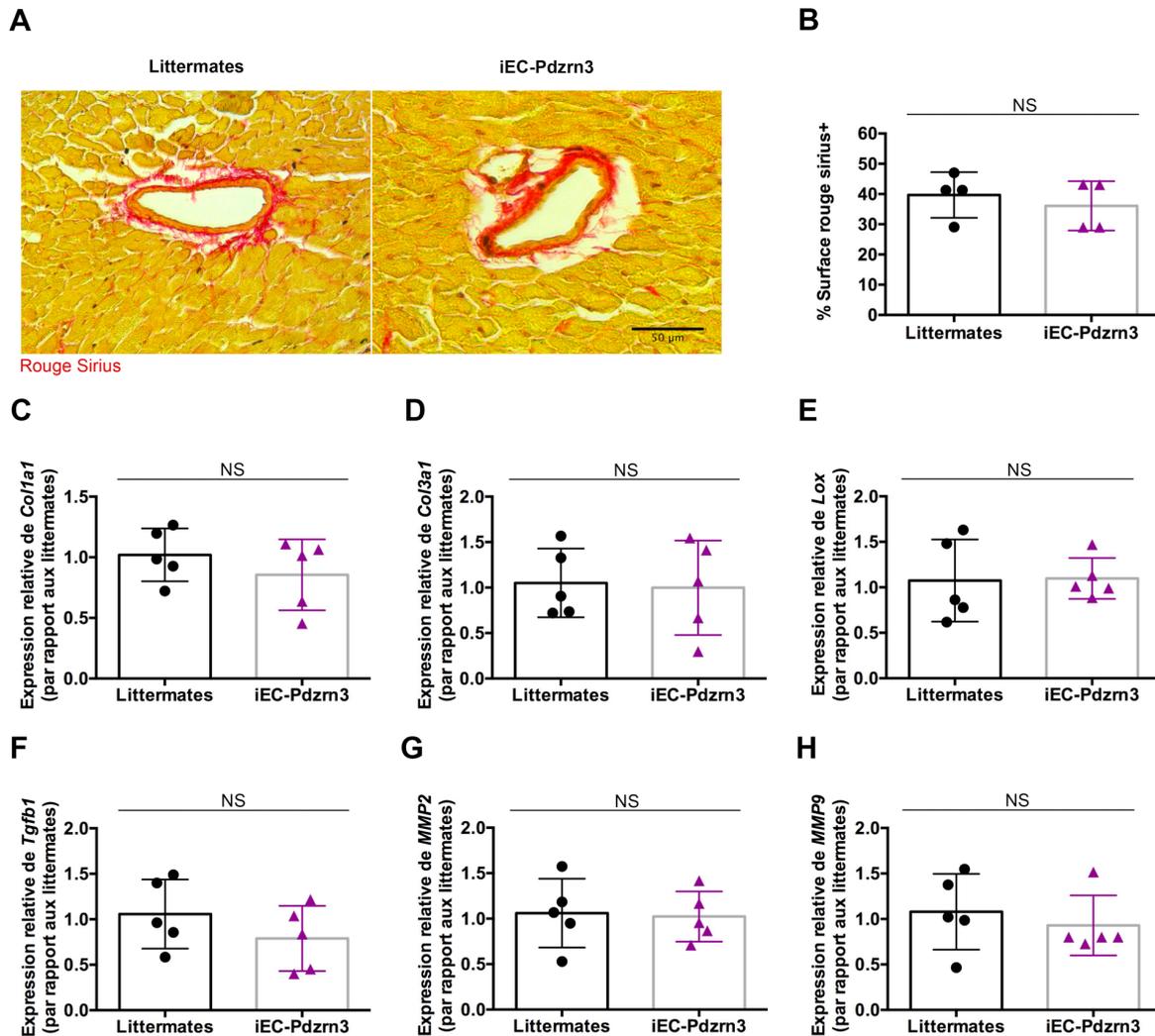


Figure 46. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium ne présentent pas d'augmentation de la fibrose périvasculaire ou de remodelage de la matrice extracellulaire.

(A) Images représentatives de coupes de cœurs colorées avec du rouge Sirius pour identifier le collagène. (B) Quantification de la fibrose périvasculaire. Littermates n=4, iEC-Pdzm3 n=4. Analyse de l'expression de (C) *Col1a1*, (D) *Col3a1*, (E) *Lox*, (F) *Tgfb1*, (G) *MMP2*, (H) *MMP9* sur des biopsies de cœurs. Littermates n=5, iEC-Pdzm3 n=5. Analyse statistique : Mann-Whitney. NS=non significatif.

Ces résultats nous indiquent que les cœurs des souris iEC-Pdzm3 présentant des signes d'ICFÉp ne semblent pas évoluer dans un contexte inflammatoire que ce soit en termes de nombre de cellules ou de type de macrophages. Ces éléments pourraient expliquer l'absence de remodelage de la matrice extracellulaire couramment observée dans cette pathologie.

D. Phénotypes cardiomyocytaires

Les cardiomyocytes, cellules essentielles au fonctionnement cardiaque, semblent impliqués dans le développement de l'ICFEP. Pour rappel, en 2013 Paulus et Tschöpe ont récemment proposé un paradigme décrivant la dysfonction diastolique retrouvée dans l'ICFEP comme étant, entre autres, le résultat d'une augmentation de la taille et de la rigidité des cardiomyocytes. Nous avons donc décidé d'explorer le phénotype des cardiomyocytes par imagerie et RT-qPCR afin de rechercher un éventuel impact direct de la surexpression de PDZRN3 sur l'intégrité des cellules contractiles.

1. Analyses morphologiques en histologie

Nous avons analysé par immunofluorescence les dimensions myocytaires. Pour ce faire, un marquage des lectines membranaires couplé à un fluorochrome vert a été effectué sur des coupes de cœurs. Ce marquage nous permet d'obtenir la surface des myocytes sur des sections transversales. Il apparaît que les cardiomyocytes des souris iEC-Pdzrn3 sont légèrement plus étendus par rapport à ceux de leurs littermates (FIGURE 47).

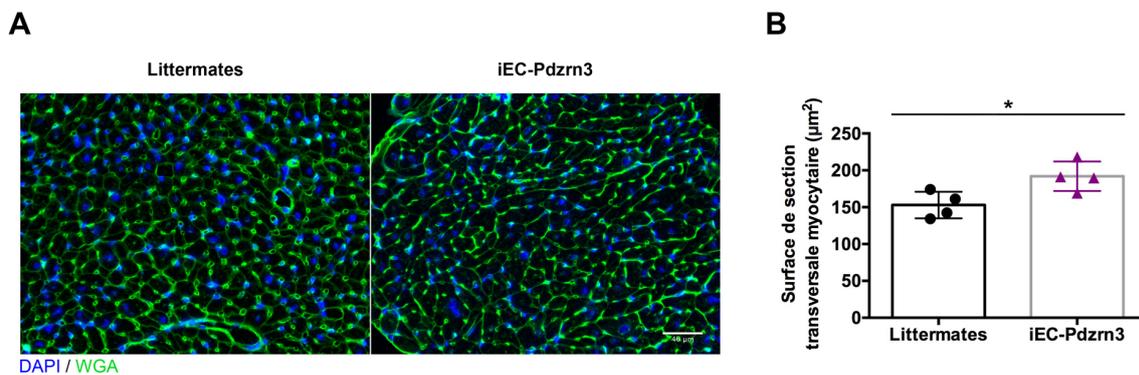


Figure 47. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium affichent une légère augmentation de la taille des cardiomyocytes.

(A) Images représentatives de coupes de cœurs immunomarquées avec de la lectine Wheat Germ Agglutinin WGA (en vert) pour identifier les membranes des cardiomyocytes. (B) Quantification de la surface myocytaire. Littermates n=4, iEC-Pdzrn3 n=4. Analyse statistique : Mann-Whitney. *p<0,05.

Par la suite, afin d'approfondir le phénotype des myocytes, nous avons analysé des coupes de cœurs par microscopie électronique. Dans l'ensemble, les cardiomyocytes

au sein du tissu cardiaque des souris iEC-Pdzn3 présentent une architecture classique avec la présence de myofibrilles composées de sarcomères délimités par des stries Z ainsi que des mitochondries interfibrillaires (FIGURE 48). Aucune anomalie structurelle n'a donc été décelée au niveau des myocytes par cette technique d'imagerie.

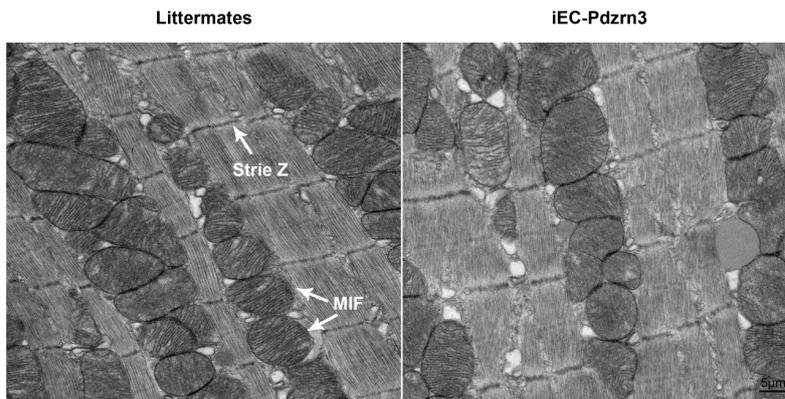


Figure 48. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium ne présentent pas d'anomalie structurelle dans l'organisation et l'architecture des cardiomyocytes.

Images représentatives de sarcomères longitudinaux visualisés en microscopie électronique. MIF : mitochondries interfibrillaires.

Nous nous sommes ensuite attelés à étudier les jonctions cardiomyocytaires. Celles-ci sont indispensables au lien des cardiomyocytes les uns aux autres, et permettent également un renforcement du couplage excitation-contraction. Nous avons choisi d'analyser la connexine 43 (Cx43) qui fait partie des jonctions transmembranaires les plus fréquentes au niveau des ventricules cardiaques. La quantité globale et la distribution spécifique de cette protéine sont deux paramètres indispensables au bon fonctionnement ventriculaire et à la propagation des impulsions (Gourdie *et al.*, 1993). Ces jonctions sont assemblées au niveau des disques intercalaires, situés aux extrémités des cardiomyocytes en coupe longitudinale.

L'analyse de la Cx43 sur des coupes de cœurs ne montre pas de différence significative entre les deux groupes de souris, que ce soit en termes de localisation cellulaire ou dans la mesure de la taille des jonctions (FIGURE 49).

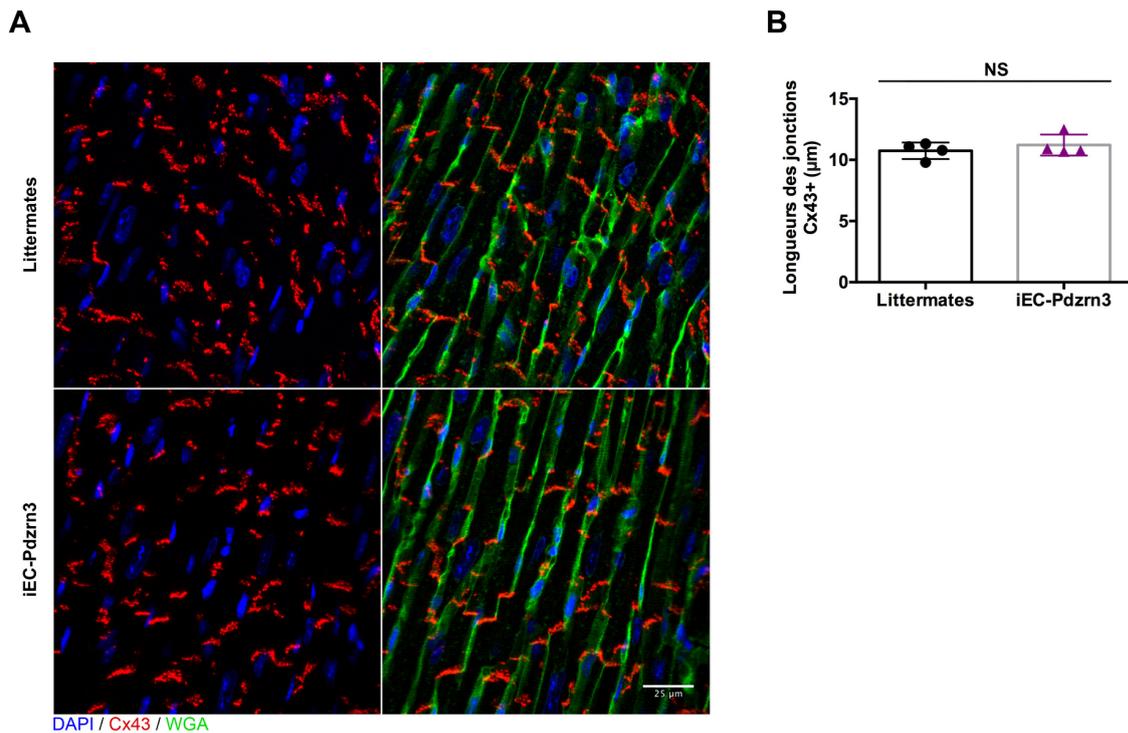


Figure 49. Les souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium ne présentent de modifications de la taille des jonctions cardiomyocytaires structurales.

(A) Images représentatives de coupes de cœurs immunomarquées pour la Cx43 (en rouge) pour identifier les jonctions entre les cardiomyocytes (B) Quantification des longueurs des jonctions Cx43+. Littermates n=4, iEC-Pdzrn3 n=4. Analyse statistique : Mann-Whitney. NS=non significatif.

2. Analyses transcriptomiques

Enfin, pour compléter le phénotypage des cardiomyocytes, nous avons mesuré le niveau d'expression de différents marqueurs y étant associés. Nous avons regardé l'expression de la Cx 43 (**FIGURE 50A**), dont, comme expliqué précédemment, l'abondance est indispensable au bon fonctionnement cardiaque. Les différentes isoformes de la titine ont aussi été analysées du fait de la régulation à la hausse de l'isoforme N2B observée chez des patients atteints d'ICFEP (**FIGURE 50B-C**). Cette augmentation aurait, par ailleurs, un rôle dans l'augmentation de la rigidité cardiomyocytaire. Les gènes Serca2 et Pln (phospholamban) (**FIGURE 50D-E**) ont eux aussi été étudiés car ils sont directement impliqués dans la régulation des cycles de contraction/relaxation des cardiomyocytes ; tout comme le gène Mef2C (Myocyte Enhancer Factor 2C) (**FIGURE 50F**) qui œuvre dans la morphogenèse et la myogenèse cardiaque. L'analyse par RT-qPCR sur des biopsies cardiaques ne montre aucune

différence d'expression de ces marqueurs entre les souris iEC-Pdzrn3 et leurs littermates.

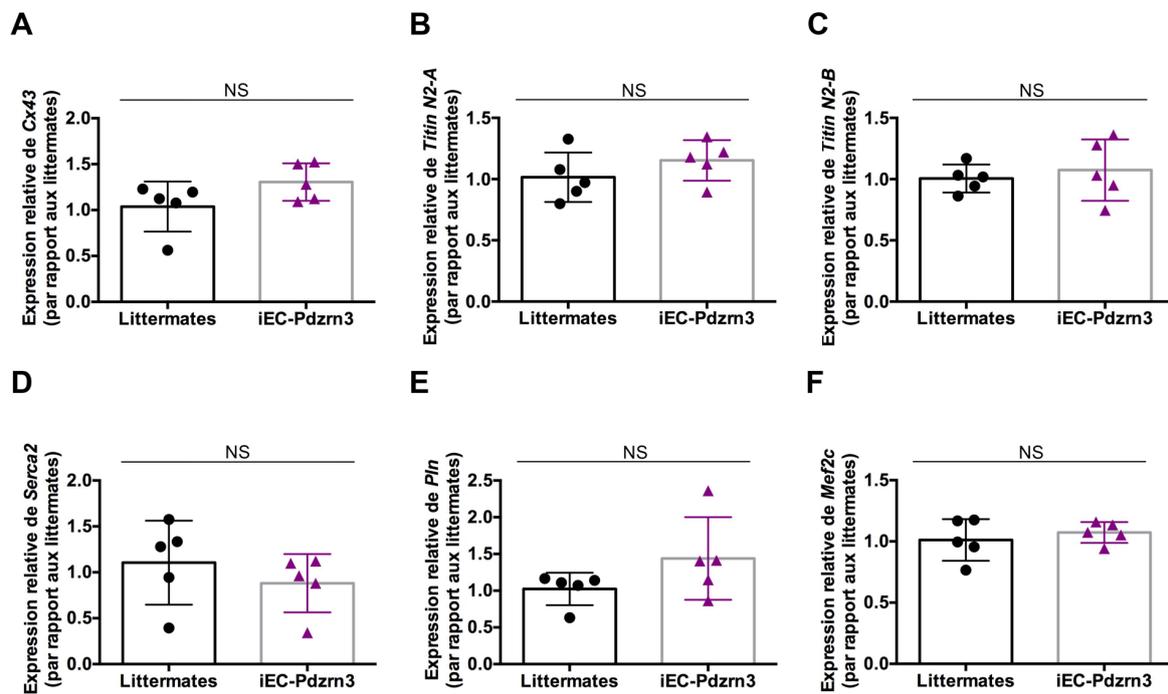


Figure 50. L'analyse par RT-qPCR de biopsies cardiaques des souris qui surexpriment PDZRN3 dans l'endothélium ne montre pas de différence d'expression des marqueurs cardiomyocytaires étudiés.

Analyse de l'expression par RT-qPCR (A) de *Cx43*, (B) de *Titin N2-A*, (C) de *Titin N2-B*, (D) de *Serca2*, (E) de *Pln*, et (H) de *Mef2C* sur des biopsies de cœurs. Littermates n=5, iEC-Pdzrn3 n=5. Analyse statistique : Mann-Whitney. NS=non significatif.

Mise à part une légère augmentation de la taille des cardiomyocytes, aucune anomalie de ces cellules n'a pu être observée. L'ensemble de ces données montre que la dysfonction diastolique observée chez les souris iEC-Pdzrn3 ne semble pas être inhérente à une dysfonction intrinsèque des cardiomyocytes.

E. Phénotype vasculaire

La description de « dysfonction endothéliale » dans la littérature en rapport avec l'ICFep se réfère principalement à des altérations dépendantes du NO et à l'acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire. Les patients atteints d'ICFep font également état d'une raréfaction microvasculaire coronaire (Mohammed *et al.*, 2015b). Cependant, la

notion de dysfonction endothéliale est en fait plus vaste, et peu impliquer d'autres phénomènes. Une altération des systèmes de vasodilatation peut par exemple conduire à une perfusion cardiaque déficiente. Une déstabilisation de la barrière endothéliale peut, quant à elle, conduire à une perméabilité vasculaire accrue, favorisant ainsi l'apparition d'un œdème cardiaque (Dongaonkar *et al.*, 2010). Nous avons donc exploré le phénotype vasculaire de nos souris afin d'appréhender l'impact de la surexpression de Pdzn3 sur l'endothélium.

1. Caractérisation du réseau vasculaire

Pour commencer, nous avons quantifié la densité vasculaire, mais aucune différence significative n'a pu être constatée entre les souris iEC-Pdzn3 et leurs littermates (FIGURE 51).

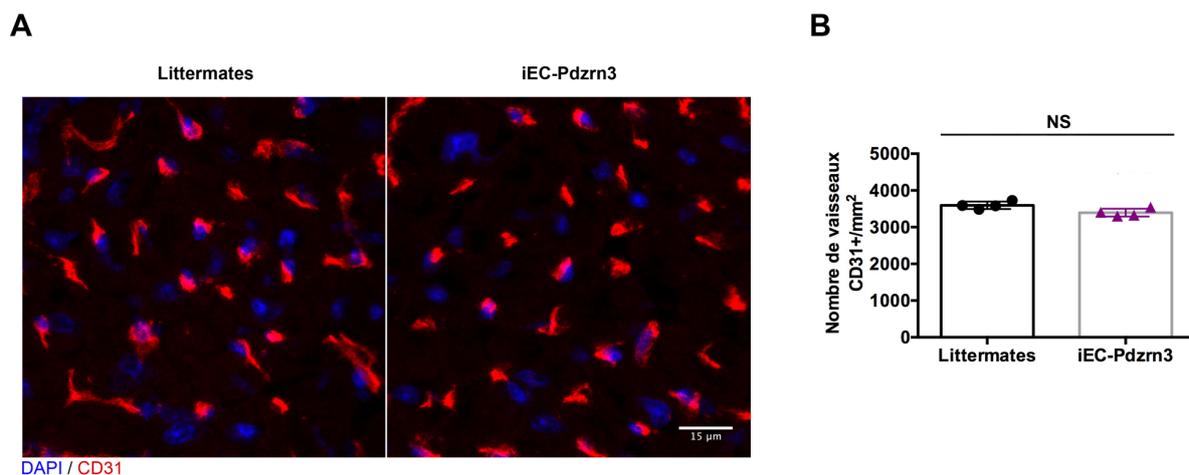


Figure 51. La surexpression de PDZRN3 dans l'endothélium n'entraîne pas de modification de vascularisation cardiaque.

(A) Images représentatives de coupes de cœurs immunomarquées pour le CD31 pour identifier les vaisseaux. (B) Quantification du nombre de vaisseaux par mm². Littermates n=4, iEC-Pdzn3 n=4. Analyse statistique : Mann-Whitney. NS=non significatif.

Contrairement à ce que l'on peut observer chez des patients atteints d'ICFEP, la surexpression de Pdzn3 dans l'endothélium ne paraît donc pas affecter la densité vasculaire.

Nous avons par la suite caractérisé le réseau vasculaire cardiaque par imagerie tridimensionnelle.

Des cœurs préalablement transparisés ont été observés par microscopie à nappe de lumière. Cette étape de transparisation consiste à rendre un organe transparent, permettant ainsi l'exploration des tissus en entier et en profondeur. Cette technique, plus puissante que l'histologie classique sur coupe, nous a permis non seulement d'observer le réseau capillaire dans son ensemble, mais nous a également donné accès à des informations comme la longueur moyenne des capillaires ainsi que leur diamètre moyen. Ce protocole complexe correspond, pour simplifier, au marquage endothélial de l'ensemble des cœurs avec une lectine, elle-même couplée à un fluorochrome (*Lycopersicon esculentum*). Secondairement, une transparisation est réalisée sur ces échantillons. Celle-ci permet d'extraire des clichés détaillés de la structure cardiaque en profondeur. Enfin ces images sont reconstituées en 3 dimensions (**FIGURE 52A**), puis segmentées, filtrées, squelettisées (**FIGURE 52B**) et cartographiées.

L'analyse de la distribution des longueurs et des diamètres du réseaux capillaire montre que les souris iEC-Pdzrn3 présentent un réseau microvasculaire cardiaque semblable à celui de leurs littermates (**FIGURE 52C-D**).

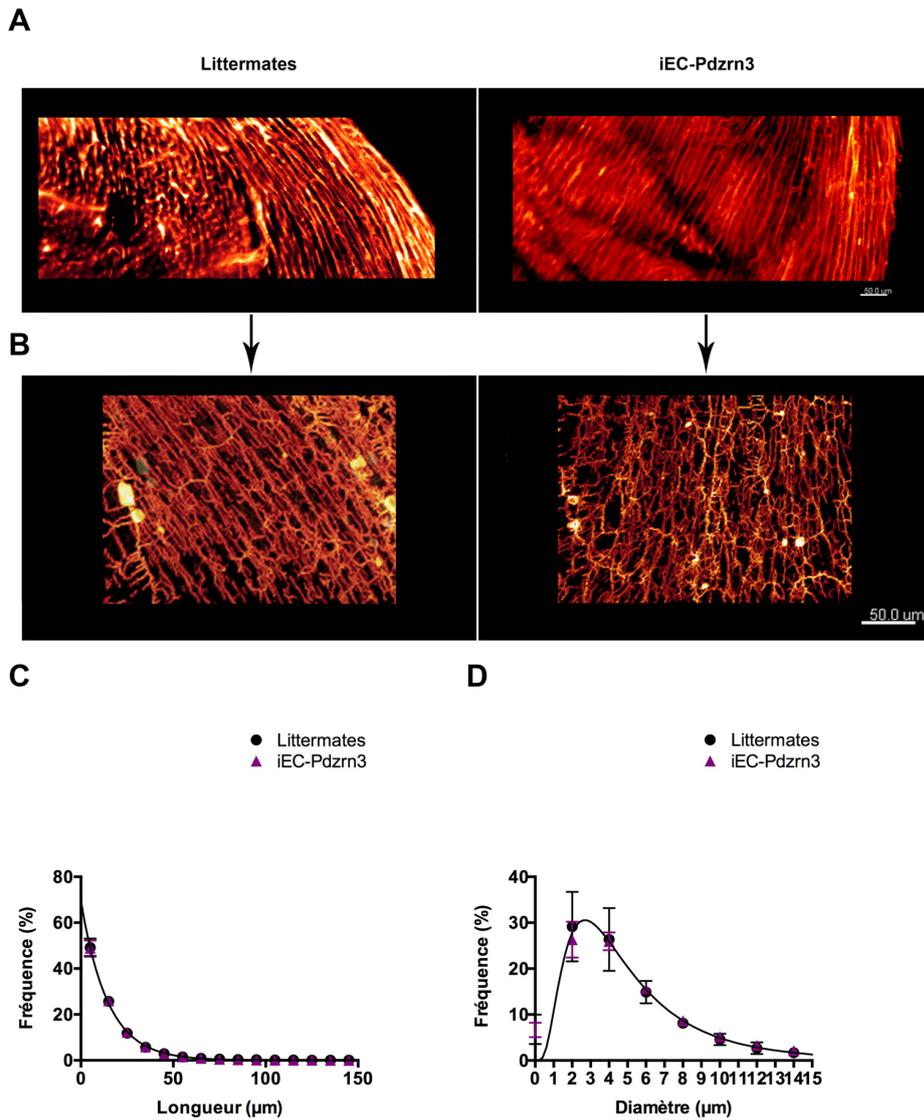


Figure 52. La surexpression de PDZRN3 dans l'endothélium n'entraîne pas de modification des paramètres architecturaux du réseau capillaire coronaire.

(A) Images représentatives de coupes de cœurs transparisés immunomarquées avec des anticorps anti-podocalyxine pour identifier les vaisseaux (B) Images représentatives de squelettisation et de branchement à partir de cœurs transparisés. Quantification (C) des fréquences moyennes de branches de vaisseaux sanguins en fonction de leur longueur représentée par des courbes exponentielles décroissantes d'ordre 1 et (D) des fréquences moyennes des branches de vaisseaux sanguins en fonction de leur diamètre représentées par une courbe gaussienne. Littermates n=4, iEC-Pdzn3 n=4. Analyse statistique : régression non linéaire.

Ces données indiquent que la surexpression de Pdzn3 dans l'endothélium ne semble pas modifier l'architecture générale du réseau capillaire cardiaque.

2. Évaluation de la perméabilité vasculaire

Les résultats antérieurs obtenus au laboratoire décrivent que la surexpression embryonnaire de *Pdzn3* dans l'endothélium entraîne des dysfonctions vasculaires avec la présence d'hémorragies et de perméabilité vasculaire (Sewduth *et al.*, 2017). Chez l'adulte, nous avons mis en évidence des signes de perméabilité périphérique en effectuant un test de miles (FIGURE 30). Nous avons émis l'hypothèse que la surexpression de *Pdzn3* dans l'endothélium provoquerait une augmentation de la perméabilité vasculaire qui aurait un impact direct sur le fonctionnement cardiaque. Pour éprouver cette théorie, nous avons recherché des signes de perméabilité vasculaire par immunofluorescence.

La VE-cadhérine (VECAD) est une protéine de jonction adhérente qui joue un rôle important dans la cohésion et l'organisation des jonctions intercellulaires. Elle est indispensable au développement vasculaire et apparaît comme un acteur important dans le maintien de l'intégrité de la barrière endothéliale. En effet, il a été décrit qu'une déstabilisation des jonctions intercellulaires pouvait aboutir à une dysfonction endothéliale, notamment par le biais d'une augmentation de la perméabilité vasculaire (Gavard, 2014).

L'analyse de la VECAD sur des coupes de cœurs ne montre pas de différence significative entre les deux groupes de souris, que ce soit en termes de localisation ou de surface (FIGURE 53).

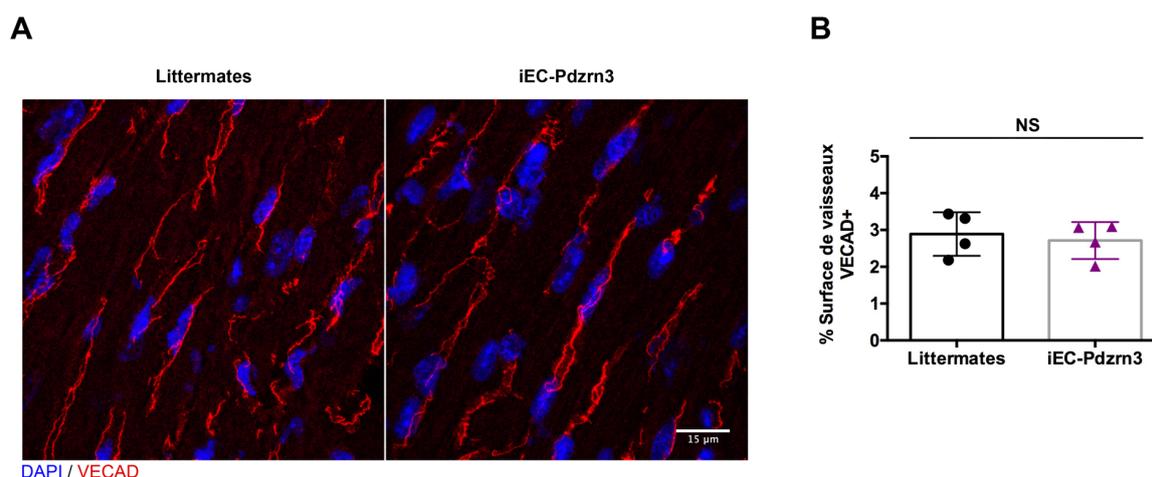


Figure 53. La surexpression de PDZRN3 dans l'endothélium n'entraîne pas de modification dans la localisation ou la surface de la VE-Cadhérine.

(A) Images représentatives de coupes de cœurs immunomarquées par la VECAD pour identifier les jonctions adhérentes (B) Quantification de la surface des vaisseaux VECAD+ par mm². Littermates n=4, iEC-Pdzn3 n=4. Analyse statistique : Mann-Whitney. NS=non significatif.

Nous avons par la suite recherché des signes de diffusion extravasculaire en marquant, sur des coupes de cœurs, des protéines sériques de tailles moléculaires croissantes. Ces éléments sont, à l'état physiologique, exclusivement intravasculaires, et ne devraient donc pas être retrouvés lors d'une étude du secteur parenchymateux. Tout d'abord, nous avons examiné l'albumine, une protéine plasmatique produite par le foie d'environ 65 kDa. Nous observons une diffusion de l'Albumine dans le parenchyme cardiaque dans nos deux populations étudiées. En revanche, cette diffusion est significativement plus importante chez les souris iEC-Pdzn3 par rapport à leurs littermates (FIGURE 54).

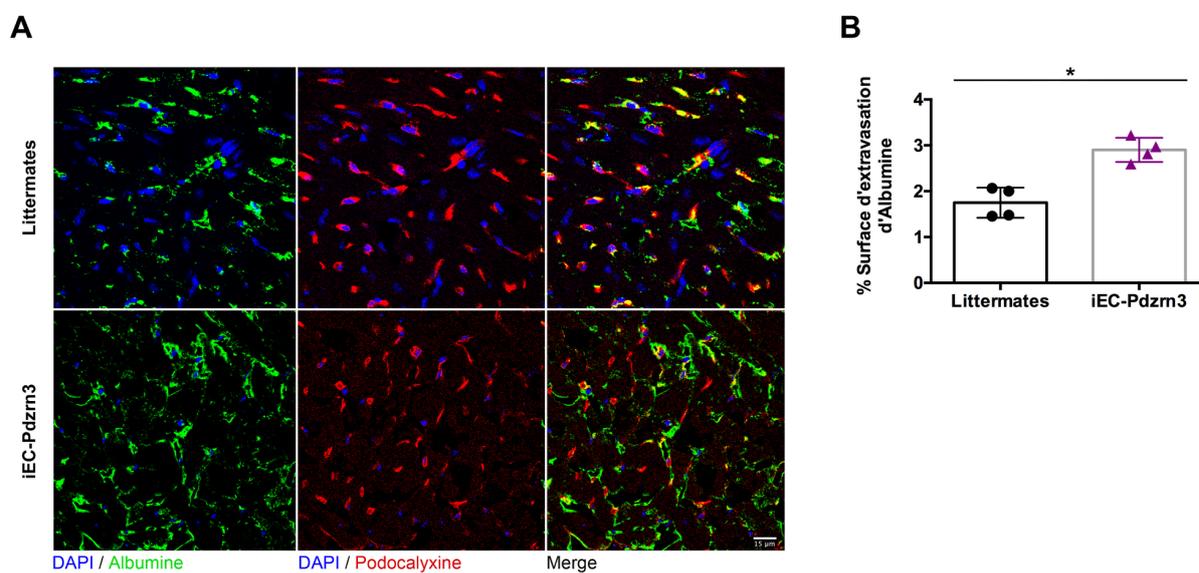


Figure 54. La surexpression de Pdzn3 dans l'endothélium entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire à l'albumine

(A) Images représentatives de coupes de cœurs immunomarquées pour l'albumine (en vert) et la podocalyxine (en rouge) montrant la diffusion de l'albumine à l'extérieur des vaisseaux. (B) Quantification de la surface d'extravasation de l'albumine. Littermates n=4, iEC-Pdzn3 n=4. Analyse statistique : Mann-Whitney. * = p < 0,05.

Nous avons ensuite examiné les immunoglobuline G (IgG), des protéines fortement représentées dans le sérum et qui possèdent une masse relative d'environ 145 kDa. A l'instar de l'albumine, nous observons une diffusion des IgG à travers les vaisseaux statistiquement plus importants chez les souris iEC-Pdzn3 par rapport à leurs littermates (FIGURE 55).

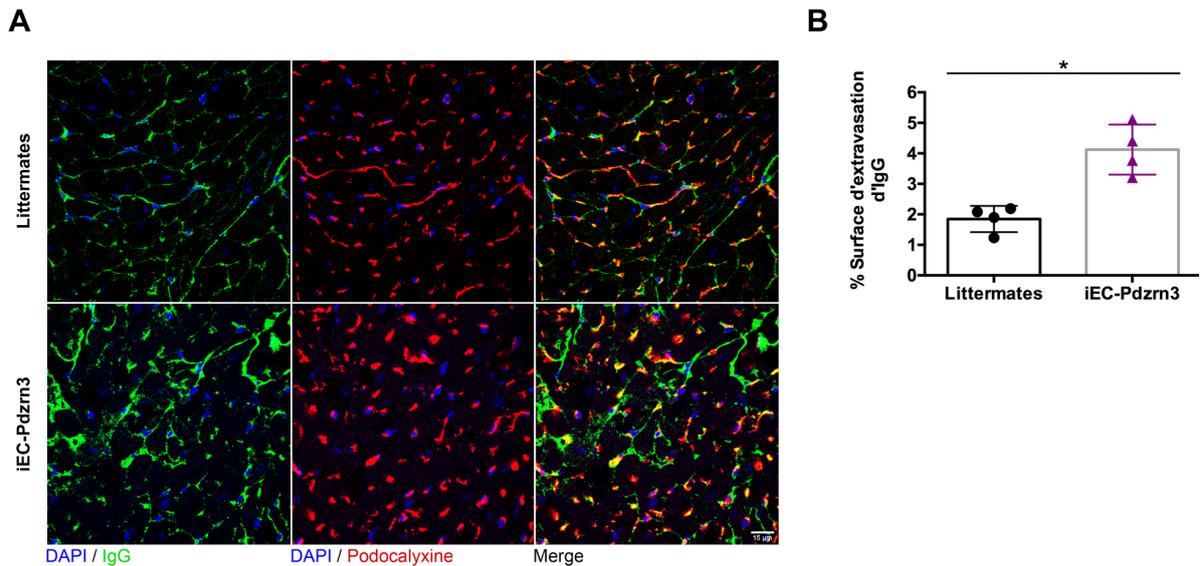


Figure 55. La surexpression de Pdzn3 dans l'endothélium entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire aux IgG

(A) Images représentatives de coupes de cœurs immunomarquées pour les IgG de souris (en vert) et la podocalyxine (en rouge) montrant la diffusion d'IgG à l'extérieur des vaisseaux. (B) Quantification de la surface d'extravasation des IgG. Littermates n=4, iEC-Pdzn3 n=4. Analyse statistique : Mann-Whitney. $*=p<0,05$.

Enfin, nous avons examiné le fibrinogène qui est une protéine de 330kDa présente dans le plasma sanguin. Comme pour l'albumine et les IgG, nous observons une extravasation du fibrinogène qui, est statistiquement plus importante chez les souris iEC-Pdzn3 par rapport à leurs littermates (**FIGURE 56**).

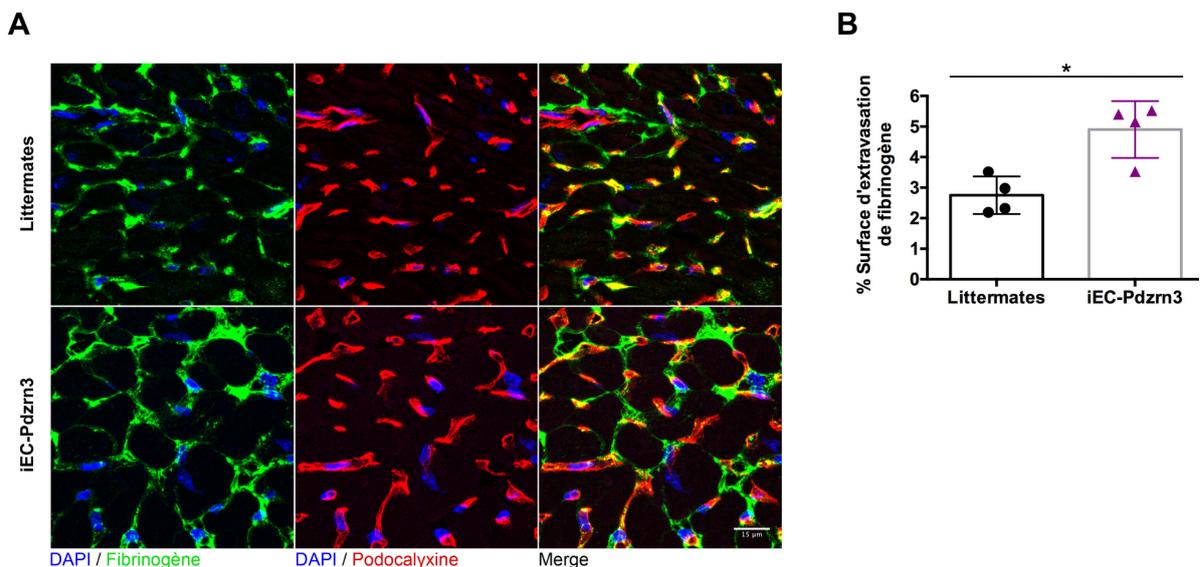


Figure 56. La surexpression de Pdzn3 dans l'endothélium entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire au fibrinogène.

(A) Images représentatives de coupes de cœurs immunomarquées pour le fibrinogène (en vert) et la podocalyxine (en rouge) montrant la diffusion de fibrinogène à l'extérieur des vaisseaux. (B) Quantification de la surface d'extravasation du fibrinogène. Littermates n=4, iEC-Pdzn3 n=4. Analyse statistique : Mann-Whitney. $*=p<0,05$.

Ces résultats montrent que la surexpression de Pdzn3 dans l'endothélium provoque une augmentation massive de la perméabilité vasculaire entraînant la diffusion de différentes protéines sériques masse moléculaire allant jusqu'à 330 kDa dans le parenchyme cardiaque.

De plus, la diffusion occasionnelle de globules rouges dans le parenchyme cardiaque mise en évidence par immunofluorescence ou imagerie électronique représente à nouveau un signe de dysfonction vasculaire (**FIGURE 57**).

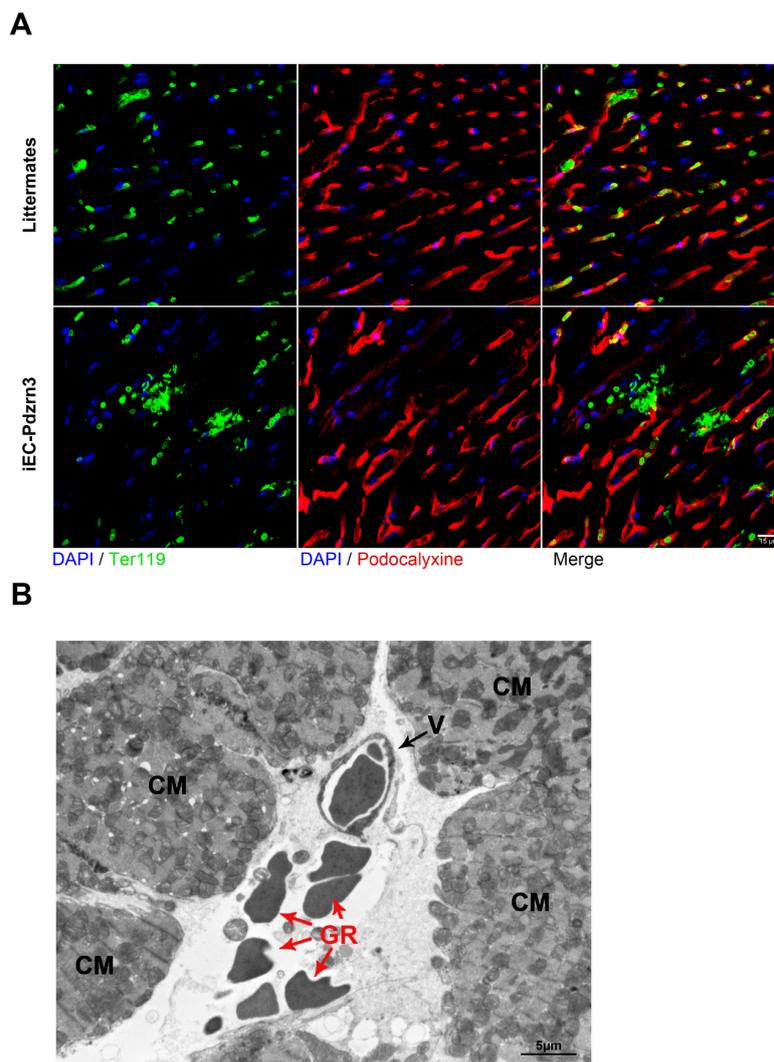


Figure 57. Les souris qui surexpriment Pdzn3 dans l'endothélium présentent une fragilité des vaisseaux

(A) Images représentatives de coupes de cœurs immunomarquées pour le ter119 (en vert) pour identifier les globules rouges. (B) Images représentatives de globules rouges présents dans le parenchyme cardiaque visualisés chez des souris iEC-Pdzn3 en microscopie électronique. CM: cardiomyocyte, V : vaisseau, GR : globule rouge.

Au total, ces résultats témoignent donc d'une atteinte de l'intégrité de la barrière endothéliale lorsque *Pdzn3* est surexprimé dans l'endothélium.

Les péricytes sont des cellules murales impliquées dans l'homéostasie vasculaire, et plus particulièrement dans les phénomènes de perméabilité vasculaire. En effet, chez les patients diabétiques, une perte des péricytes de la rétine peut provoquer une rétinopathie diabétique caractérisée par une perméabilité vasculaire rétinienne (Cai and Boulton, 2002; Hammes *et al.*, 2002). Ainsi, devant le phénotype vasculaire perméable retrouvé chez nos souris iEC-*Pdzn3*, nous avons cherché à étudier une éventuelle atteinte des péricytes. Pour cela, nous les avons identifiés à l'aide du marqueur NG2 sur des coupes de cœurs.

L'analyse du recouvrement péricytaire ne montre pas de différence significative entre les souris iEC-*Pdzn3* et leurs littermates (FIGURE 58).

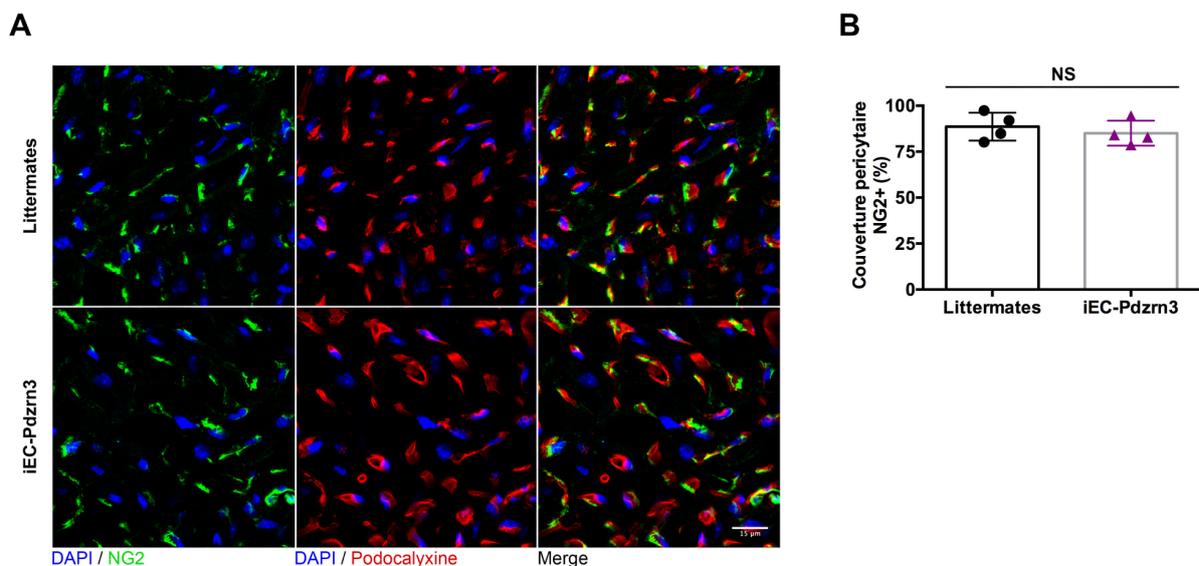


Figure 58. La surexpression de *Pdzn3* dans l'endothélium n'entraîne de perte péricytaire.

(A) Images représentatives de coupes de cœurs immunomarquées avec des anticorps anti-NG2 et double marqué avec la podocalyxine afin d'identifier les vaisseaux. (B) Quantification de la couverture péricytaire. Littermates n=4, iEC-*Pdzn3* n=4. Analyse statistique : Mann-Whitney. NS=non significatif.

La perte de l'intégrité des vaisseaux provoquée par la surexpression de *Pdzn3* dans l'endothélium ne semble donc pas être due à une perte péricytaire.

Comme nous l'avons vu précédemment, la perméabilité vasculaire pathologique peut être causée par l'augmentation des phénomènes de perméabilité

physiologique (passage transcellulaire et/ou paracellulaire) (Goddard and Iruela-Arispe, 2013). Nous avons donc cherché à en distinguer l'origine.

Le phénomène de transcytose a été étudié via microscopie électronique, en caractérisant les vésicules transendothéliales présentes sur les parois vasculaires. Pour cela, nous avons tout d'abord identifié 4 conformations différentes (stade 0 fermées, et stades 1 à 3 selon leur ouverture) permettant un classement fonctionnel de celles-ci. Nous avons ensuite cherché à étudier la densité de vésicules au niveau de la paroi vasculaire. Les résultats ne montrent pas de différence significative entre les souris iEC-Pdzrn3 et leurs littermates concernant la densité de vésicules transendothéliales ou leur répartition selon les 4 conformations sus-citées (FIGURE 59).

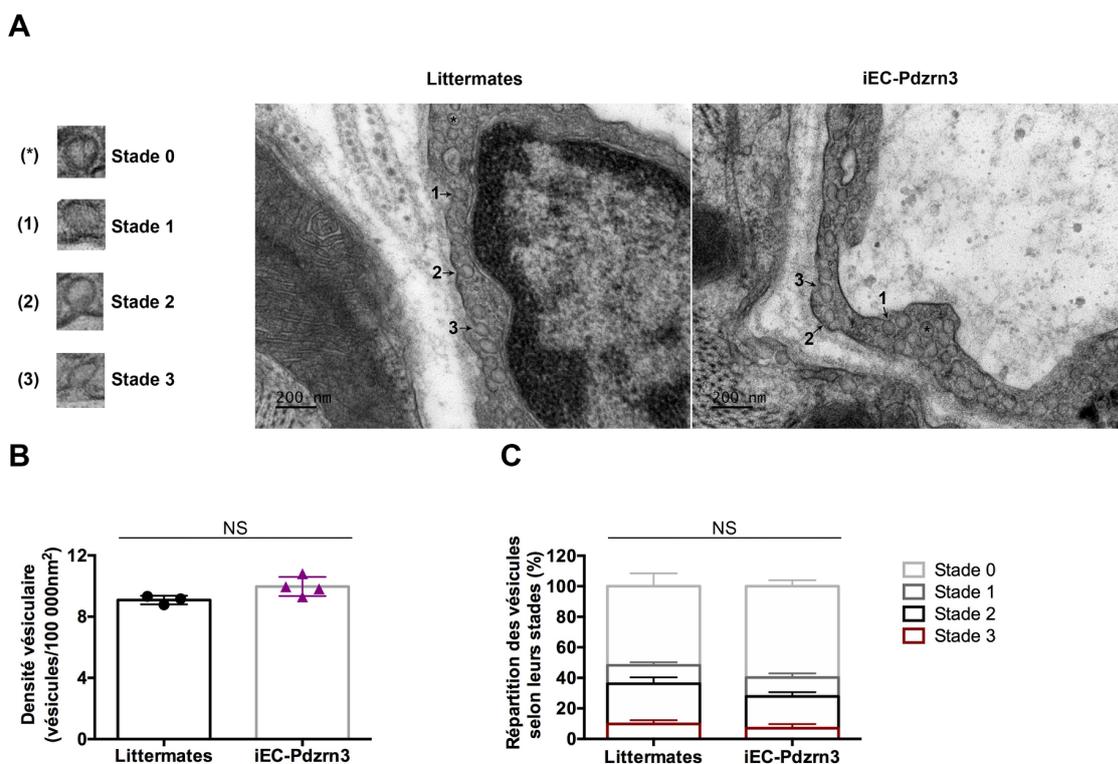


Figure 59. Les souris iEC-Pdzrn3 ne présentent pas de différence vésiculaire au niveau de la paroi de leurs vaisseaux.

(A) Analyse du trafic vésiculaire (transcytose) au niveau des parois vasculaires. Les vésicules ont été classées en trois groupes. (B) Quantification de la densité vésiculaire et (C) répartition selon leurs classes. Littermates n=3, iEC-Pdzrn3 n=4. Analyse statistique : Mann-Whitney. NS=non significatif.

Nous n'avons donc pas, en l'état actuel, d'arguments en faveur d'une participation du phénomène de transcytose aux dysfonctions endothéliales constatées. Néanmoins, d'autres expérimentations seraient nécessaires à des conclusions plus définitives, en particulier la réalisation d'un suivi de l'endocytose par mesure l'internalisation de

peroxydase de raifort (HRP). Cette pratique consiste à la visualisation du phénomène de transcytose par la coloration du substrat colorimétrique HRP 3,3'-diaminobenzidine (dab) en noir sur des tissus d'animaux ayant préalablement subi une injection retro-orbitaire d'HRP.

Afin de comprendre les mécanismes sous-jacents régissant le phénotype vasculaire perméable des souris iEC-Pdzn3 nous avons effectué un séquençage d'ARN provenant d'isolement de cellules endothéliales cardiaque de souris littermates et iEC-Pdzn3. Le but était d'examiner de potentielles modifications de marqueurs impliqués dans la perméabilité vasculaire.

L'analyse du séquençage ARN révèle que les cellules endothéliales des souris iEC-Pdzn3 présentent une diminution de l'expression de gènes composants la matrice extracellulaire (MEC) de la lame basale (FIGURE 60A). La lame basale influence fortement la fonction des cellules endothéliales et est essentielle pour l'homéostasie des tissus. En effet, des altérations des composants mais aussi des modifications de la taille de cette dernière sont retrouvés dans des vaisseaux tumoraux ou dans des états pathologiques tels que le diabète (Siperstein, Unger and Madison, 1968; Baluk *et al.*, 2003). Une augmentation de la perméabilité de la BHE a d'ailleurs été rapportée en lien avec des perturbations de la lame basale microvasculaire (Goto *et al.*, 2007). En RT-qPCR, seules les diminutions de l'expression de *Col4a1* et *Col4a2* ont été confirmées chez les souris iEC-Pdzn3 sur des isollements de cellules endothéliales (FIGURE 60B).

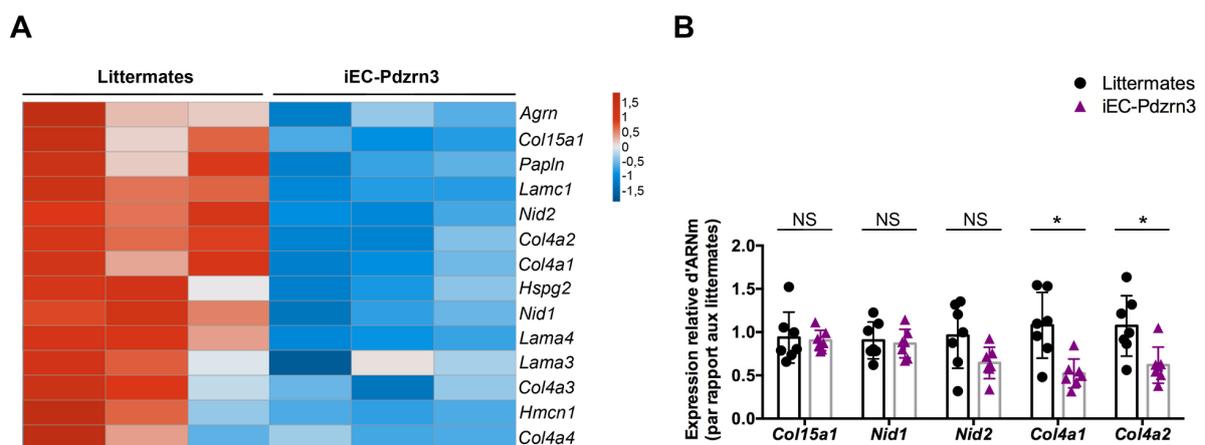


Figure 60. Les souris iEC-Pdzn3 présentent une diminution de l'expression de marqueurs de la MEC.

(A) L'analyse du séquençage ARN des CE révèle des modifications dans l'expression de marqueurs de la MEC. Littermates n=3, iEC-Pdzn3 n=3. (B) Analyse par RTqPCR de l'expression de marqueurs de MEC. Littermates n=7, iEC-Pdzn3 n=7. Analyse statistique : Mann-Whitney. *p<0,05 NS=non significatif.

Ces résultats suggèrent la présence de modification de la lame basale endothéliale. Nous observons notamment une diminution de l'expression des chaînes alpha 1 et 2 du collagène IV qui ont été impliquées dans des maladies des petits vaisseaux cérébraux ainsi que de la perméabilité vasculaire (Rannikmäe *et al.*, 2015; Trouillet *et al.*, 2017). Une déstabilisation de la lame basale endothéliale pourrait donc participer au phénotype perméable des vaisseaux des souris iEC-Pdzn3.

3. Évaluation de l'œdème cardiaque

Notre hypothèse suppose que le phénotype perméable des vaisseaux sanguins que présentent les souris iEC-Pdzn3 pourrait aboutir à l'accumulation de protéines/fluides dans l'interstitium myocardique. Bien que peu étudiée dans le cadre de l'ICFep, la formation d'un œdème cardiaque affecte la fonction cardiaque par la diminution de la contractilité myocardique et l'augmentation de la rigidité de la chambre diastolique (Dongaonkar *et al.*, 2012). Chez l'homme, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) semble être le meilleur outil pour détecter la présence d'un œdème cardiaque mais en raison de son coût élevé son application est limitée. Dans les modèles murins, des mesures gravimétriques sont largement utilisées pour mettre en évidence la teneur en eau myocardique.

Nos mesures gravimétriques n'ont pas révélé de différence de teneur en eau des myocardiés des souris iEC-Pdzn3 par rapport à leurs littermates (**FIGURE 35B**). De façon intéressante, l'analyse de la structure cardiaque par microscopie électronique a révélé une augmentation significative de l'interstitium myocardique chez les souris iEC-Pdzn3 (**FIGURE 61**). Nous observons donc la présence d'un œdème myocardique chez les souris iEC-Pdzn3.

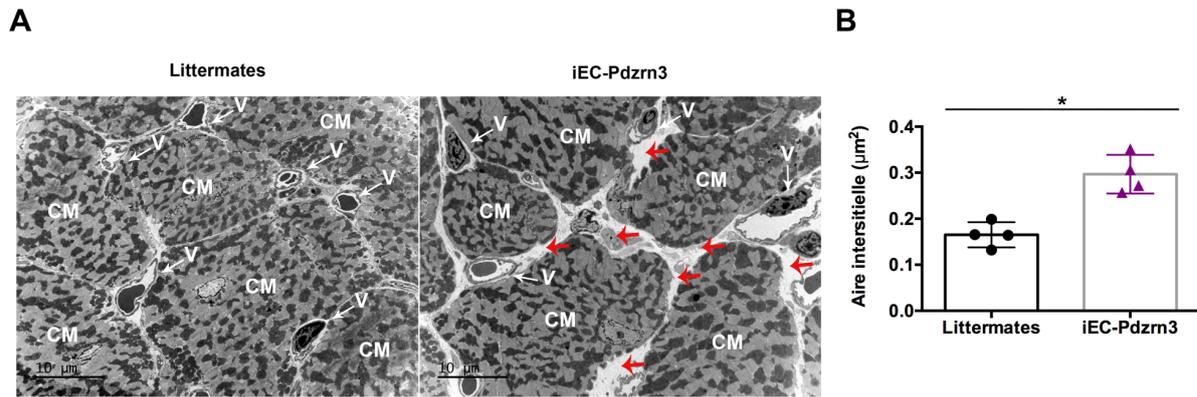


Figure 61. Les souris iEC-Pdzn3 présentent une augmentation de l'espace interstitiel.

(A) Images représentatives de coupes de cœurs visualisées en microscopie électronique. (B) Quantification de l'air interstitielle cardiaque. Littermates n=4, iEC-Pdzn3 n=4. Analyse statistique : Mann-Whitney. $*=p<0,05$. CM : cardiomyocyte, V : vaisseau.

La formation d'un œdème myocardique peut résulter de la modification de la filtration microvasculaire et/ou du drainage lymphatique. En effet, le cœur dispose d'un réseau lymphatique qui régule activement l'homéostasie des fluides tissulaires. Il permet l'acheminement de macromolécules, de liquide interstitiel ainsi que de cellules immunitaires vers la circulation systémique (Aspelund Aleksanteri *et al.*, 2016). Dans des conditions physiologiques, le réseau lymphatique permet le drainage de l'excès de liquide interstitiel des tissus, et donc la résorption d'un œdème. Dans la littérature, il a été démontré qu'un dysfonctionnement ainsi qu'un remodelage lymphatique se produit dans des modèles animaux d'ICFÉp. Les atteintes du réseau lymphatique peuvent se caractériser par une réduction de la densité lymphatique, la dilatation des capillaires lymphatiques initiaux, une réduction du taux de pompage des vaisseaux collecteurs ou encore à une perméabilité lymphatique (Cuijpers *et al.*, 2020).

4. Analyse morphologique du réseau lymphatique

Une augmentation de l'espace interstitiel cardiaque étant observée chez les souris iEC-Pdzn3, nous avons analysé le réseau lymphatique dans sa globalité sur des cœurs transparisés. De la même façon que pour la caractérisation des capillaires cardiaque, le réseau lymphatique a été observé, après son marquage spécifique grâce au marqueur Lyves-1, en microscopie à nappe de lumière.

L'aspect général du système lymphatique est comparable entre les souris iEC-Pdzn3 et leurs littermates. La quantification du volume lymphatique confirme ces observations puisqu'aucune différence significative n'a été rapportée pour cette mesure (FIGURE 62).

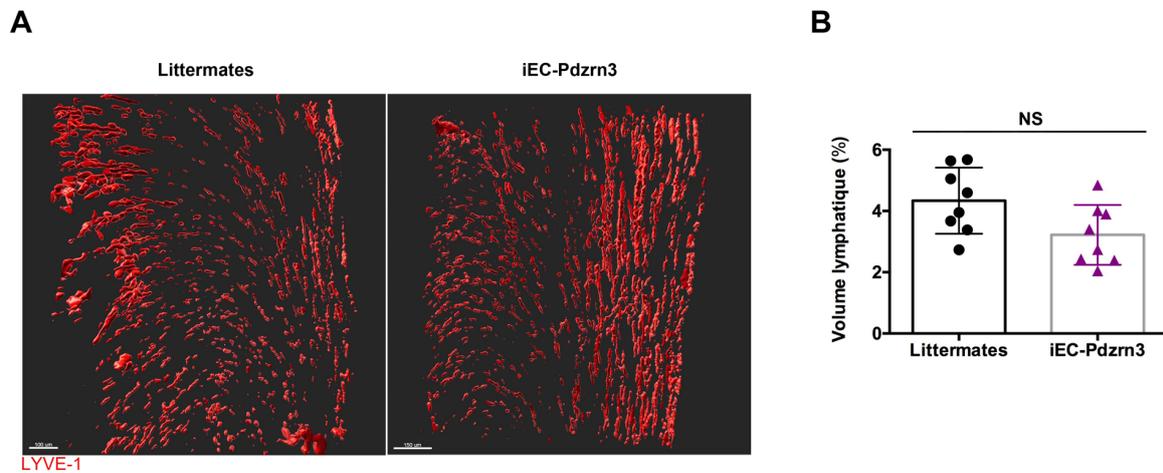


Figure 62 : Les souris iEC-Pdzn3 présentent un volume lymphatique comparable à celui des littermates.

(A) Images représentatives du réseau lymphatique marqué avec Lyve-1 et visualisé par microscopie à feuille de lumière sur des cœurs transparisés. (B) Quantification du volume lymphatique cardiaque. Littermates n=4, iEC-Pdzn3 n=4. Analyse statistique : Mann-Whitney. NS=non significatif.

Ces résultats indiquent que le volume lymphatique est le même entre souris iEC-Pdzn3 et littermates. Néanmoins cette analyse ne nous permet pas de juger du bon fonctionnement du réseau lymphatique. En effet une atteinte fonctionnelle pourrait expliquer la présence d'un œdème cardiaque. Il serait dans ce contexte intéressant de réaliser des tests fonctionnels.

F. Analyse cardiaque chez des sujets jeunes

Nous avons vu précédemment que nos souris âgées (8 mois) présentent des signes de dysfonction diastolique ainsi qu'un phénotype de perméabilité vasculaire. Nous avons cherché à déterminer la présence de ces caractéristiques chez des souris plus jeunes (3 mois), afin d'explorer un éventuel effet âge.

1. Analyses hémodynamiques et échocardiographiques

Nous avons donc étudié la fonction cardiaque par le biais d'échographies et d'explorations hémodynamiques par cathétérisme. Dès l'âge de 3 mois, les souris iEC-

Pdzrn3 présentent des signes de dysfonction diastolique attestés par une augmentation significative des pressions télédiastoliques associées à une fraction d'éjection normale (>50%) au repos (FIGURE 63).

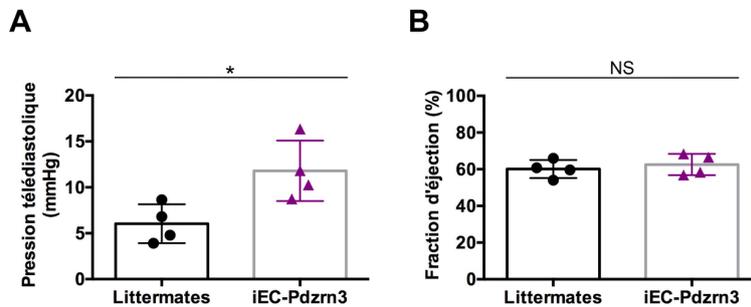


Figure 63 : Les souris iEC-Pdzrn3 manifestent des signes de dysfonction diastolique dès l'âge de 3 mois.

(A) Mesure des pressions télédiastoliques par cathétérisme (B) Évaluation de la fraction d'éjection par échocardiographie. Littermates n=4, iEC-Pdzrn3 n=4. Analyse statistique : Mann-Whitney. *= $p < 0,05$, NS=non significatif.

A l'instar des résultats observés chez les souris âgées de 8 mois, nous n'avons pas relevé de différence dans l'analyse d'autres marqueurs hémodynamiques indicateurs de dysfonction diastolique chez les sujets âgées de 3 mois (FIGURE 64).

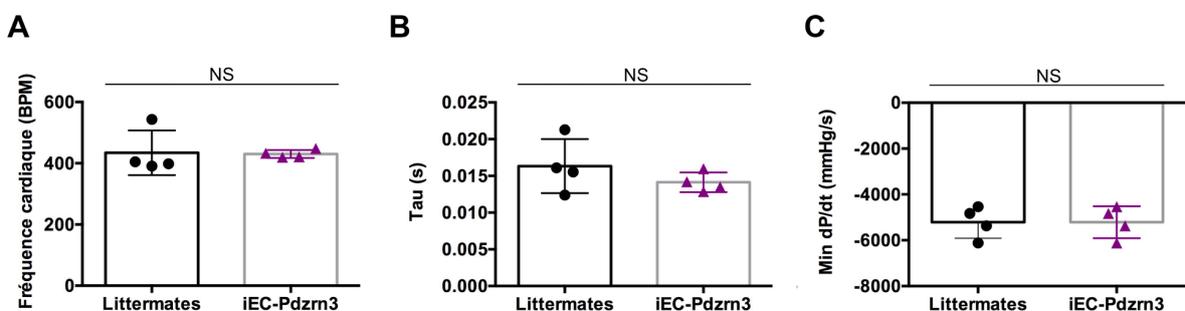


Figure 64 : Les souris iEC-Pdzrn3 âgées de 3 mois ne présentent pas d'autres signes de dysfonction cardiaque après exploration par cathétérisme.

Évaluation par cathétérisme (A) de la fréquence cardiaque, (B) de la constante de temps de la relaxation isovolumique (Tau), et (C) la vitesse de relaxation isovolumique (min dP/dt) au repos. Littermates n=4, iEC-Pdzrn3 n=4. Analyse statistique : Mann-Whitney. NS=non significatif.

De la même façon, aucune anomalie structurelle n'a été mise en évidence par échocardiographie chez les souris âgées de 3 mois (FIGURE 65).

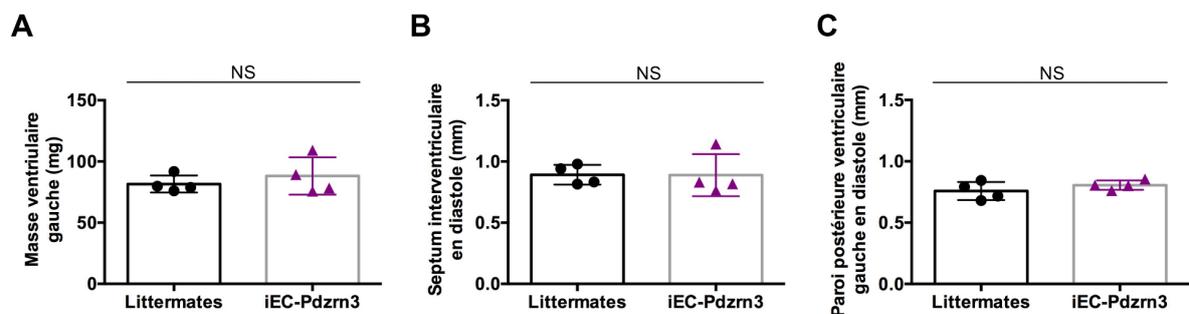


Figure 65 : Les souris iEC-Pdzrn3 ne présentent pas de signes de remodelage myocardique à l'âge de 3 mois.

Mesures échographiques (A) de la masse ventriculaire gauche, (B) du septum interventriculaire en diastole, et (C) de la paroi postérieure ventriculaire gauche en diastole. Littermates n=4, iEC-Pdzrn3 n=4. Analyse statistique : Mann-Whitney. NS=non significatif.

2. Évaluation de la perméabilité vasculaire

Enfin, nous avons évalué la perméabilité des vaisseaux des souris âgées de 3 mois. L'analyse de l'extravasation du fibrinogène nous a permis d'observer une perméabilité vasculaire statistiquement plus importante chez les souris iEC-Pdzrn3 par rapport aux littermates (FIGURE 66). Les souris iEC-Pdzrn3 présentent donc des signes de dysfonction vasculaire dès 3 mois. Il est intéressant de noter que cette perméabilité semble aller en augmentant avec l'âge puisque les valeurs de pourcentage de surface d'extravasation de fibrinogène doublent entre 3 et 8 mois pour les deux groupes.

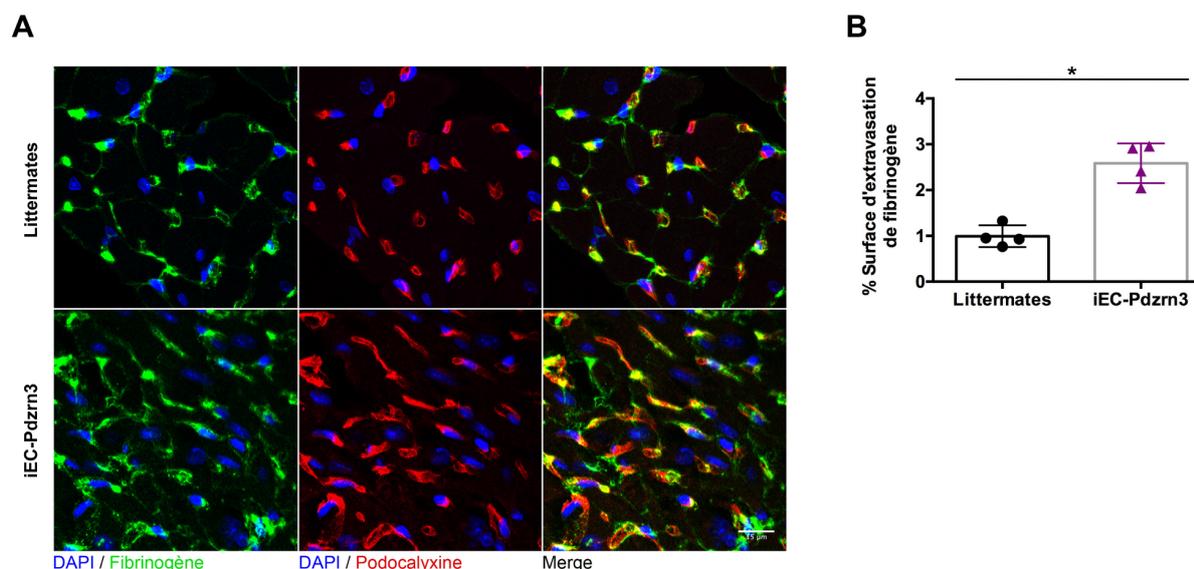


Figure 66 : La surexpression de Pdzrn3 dans l'endothélium entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire au fibrinogène dès 3 mois d'âge.

(A) Images représentatives de coupes de cœurs immunomarquées pour le fibrinogène (en vert) et la podocalyxine (en rouge) montrant la diffusion de fibrinogène à l'extérieur des vaisseaux. (B) Quantification de la surface d'extravasation du fibrinogène. Littermates n=4, iEC-Pdzrn3 n=4. Analyse statistique : Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

Ces résultats nous informent que les souris iEC-Pdzrn3 présentent des signes de dysfonction diastolique dès 3 mois d'âge. La perméabilité vasculaire est aussi présente dès cet âge, mais reste plus modeste qu'à 8 mois d'âge. On observe donc un effet âge, avec une évolution marquée de notre phénotype entre les deux périodes étudiées. A noter que celui-ci reste plus prononcé chez les souris surexprimant Pdzrn3.

Nous nous sommes ensuite demandé si nous pouvions empirer le phénotype cardiaque de nos souris en aggravant la dysfonction endothéliale. Pour cela, nous avons décidé d'étudier des souris à 8 mois d'âge ayant été nourries avec du régime gras.

G. Répercussions d'un régime Western

Nous avons nourri nos souris iEC-Pdrn3 ainsi que leur littermates avec un régime riche en lipides pendant 12 semaines. Ce régime avait pour but de potentialiser la dysfonction endothéliale chez nos animaux afin d'étudier une éventuelle aggravation des différents phénotypes cardiaques observés. En effet, ces régimes sont fréquemment utilisés dans des modèles animaux d'ICFep car ils accélèrent le développement de dysfonction cardiaque en augmentant notamment la vulnérabilité aux ROS (Ballal *et al.*, 2010). Les régimes riches en lipides peuvent avoir une teneur en graisse allant de 20 à 60% (Howarth *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2007; Thakker *et al.*, 2008; Schiattarella *et al.*, 2019) alors qu'un régime standard en contient environs 12%. En fonction des compositions, ces régimes peuvent entraîner une prise de poids excessive, modérée ou faible en quelques semaines.

Nous avons utilisé un régime dit athérogène, riche en graisses et faible en teneur de saccharose. Ainsi, ces souris ne développent pas de diabète, ne prennent pas de poids mais deviennent sensibles au développement de plaque d'athérosclérose. Pour la suite de notre travail, nous appellerons ce régime : régime western.

1. Analyses physiologiques

Tout d'abord, nous avons vérifié l'effet de 12 semaines de régime western sur la physiologie des souris âgées de 8 mois. Les mesures glycémiques témoignent de l'absence de diabète dans les deux groupes de souris sous régime (FIGURE 67A). De même, nous n'avons pas observé de modification du poids du corps et du cœur après 12 semaines de cette alimentation (FIGURE 67B-C).

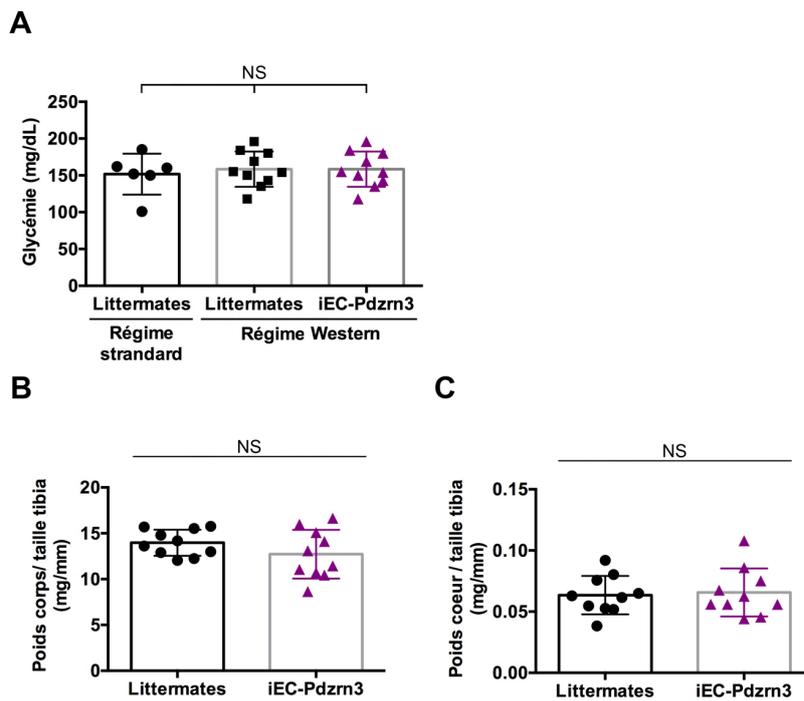


Figure 67. Le régime western ne provoque pas de diabète ni de modification de poids du corps ou du cœur chez les souris iEC-Pdzrn3 et leurs littermates.

(A) Mesures glycémiques des souris à partir de sang. Littermates régime standard n=6. (B) Analyse du poids des souris rapporté à leur taille de tibia. (C) Analyse du poids du cœur de souris rapporté à leur taille de tibia. Littermates n=10, iEC-Pdzrn3 n=10. Analyse statistique : Mann-Whitney. NS=non significatif.

À un âge donné, la physiologie des souris sous régime western est donc similaire à celle de souris sous régime standard.

2. Analyses hémodynamiques et échocardiographiques

Nous avons par la suite étudié la fonction cardiaque chez nos souris soumises aux différents régimes. Nous avons donc procédé à des échographies accompagnées d'explorations hémodynamiques par cathétérisme.

De la même manière que sur nos souris sous régime standard au même âge, les souris iEC-Pdzn3 sous régime western présentent un dysfonctionnement diastolique attesté par une augmentation significative des pressions télédiastoliques associées à une fraction d'éjection normale (>50%) au repos (**FIGURE 68**) par rapport aux littermates. Il est à noter que les valeurs des pressions télédiastoliques des souris sous régime western sont foncièrement comparables à celles des souris sous régime standard, aussi bien chez nos souris iEC-Pdzn3 que chez les littermates.

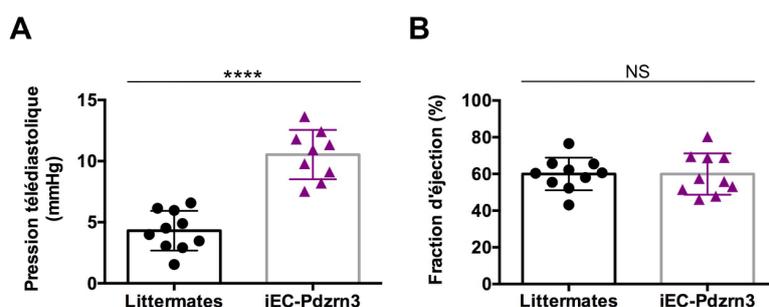


Figure 68. Les souris iEC-Pdzn3 nourries au régime western manifestent des signes de dysfonction diastolique comparées à leurs littermates soumises au même régime.

(A) Mesure des pressions télédiastoliques par cathétérisme (B) Evaluation de la fraction d'éjection par échocardiographie. Littermates n=10, iEC-Pdzn3 n=10. Analyse statistique : Mann-Whitney. ****= $p < 0,001$, NS=non significatif.

L'analyse d'autres marqueurs hémodynamiques indicateurs de dysfonction diastolique n'a, en revanche, pas relevé de différence entre les souris iEC-Pdzn3 et leurs littermates sous régime western (**FIGURE 69**).

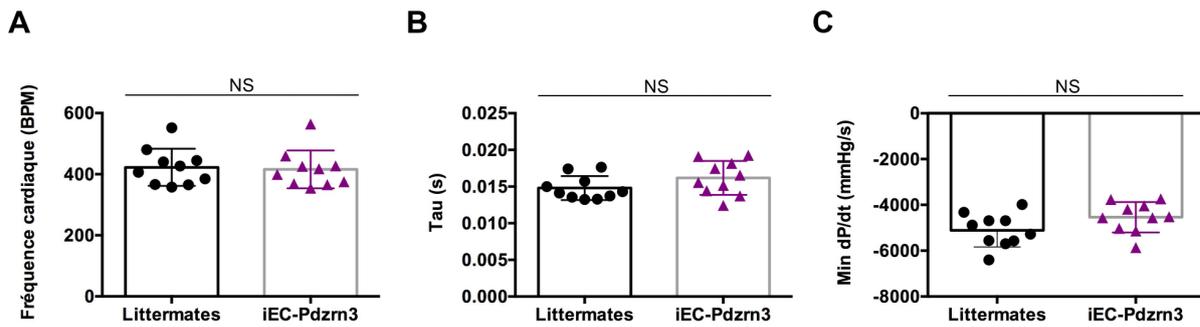


Figure 69. Les souris iEC-Pdzrn3 nourries au régime western ne présentent pas d'autres signes de dysfonction cardiaque après explorations par cathétérisme comparées à leurs littermates soumises au même régime.

Évaluation par cathétérisme (A) de la fréquence cardiaque, (B) de la constante de temps de la relaxation isovolumique (Tau), et (C) la vitesse de relaxation isovolumique (min dP/dt) au repos. Littermates n=10, iEC-Pdzrn3 n=10. Analyse statistique : Mann-Whitney. NS=non significatif.

Enfin, malgré l'augmentation des pressions télédiastoliques, aucune anomalie structurelle n'a pu être mise en évidence après l'examen échographique des cœurs des souris sous régime western, qu'il s'agisse des individus iEC-Pdzrn3 ou de leurs littermates (FIGURE 70).

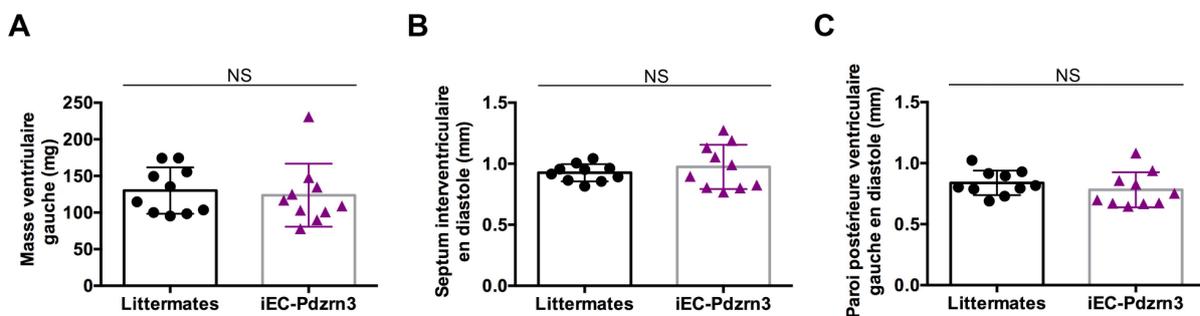


Figure 70. Les souris iEC-Pdzrn3 nourries au régime western ne présentent pas de signes de remodelage myocardique comparées à leurs littermates soumises au même régime.

Mesures échographiques (A) de la masse ventriculaire gauche, (B) du septum interventriculaire en diastole, et (C) de la paroi postérieure ventriculaire gauche en diastole. Littermates n=10, iEC-Pdzrn3 n=10. Analyse statistique : Mann-Whitney. NS=non significatif.

Toutes ces données étant comparables à celles des souris sous régime standard à un âge donné, le régime western ne semble donc pas avoir d'effet sur les paramètres de dysfonction diastolique. Nous avons malgré tout investigué différents paramètres clés comme l'inflammation, la fibrose, la raréfaction capillaire et la perméabilité vasculaire.

3. Mesures de la numération de la formule sanguine

De la même manière que pour nos souris régime standard, nous avons effectué une numération de la formule sanguine. Il apparaît que les souris iEC-Pdzrn3 présentent un nombre de cellules inflammatoires circulantes similaire à celui des littermates (**FIGURE 71**). En revanche, il est à noter que les souris sous régime western présentent, à un âge donné, près du double de globules blancs circulant en comparaison aux souris soumises au régime standard. Le régime western semble donc augmenter la quantité de cellules inflammatoire circulantes.

Paramètres	Littermates (n=10)	iEC-Pdzrn3 (n=10)
GB ($10^3/\text{mm}^3$)	11,49 ± 3,50	12,07 ± 3,63
LYM (%)	72,29 ± 8,28	71,27 ± 9,33
MON (%)	4,28 ± 0,71	4,37 ± 1,15
GRA (%)	24,43 ± 7,75	23,43 ± 6,83
EOS (%)	2,42 ± 1,40	1,88 ± 1,14
HT (%)	34,66 ± 5,74	34,1 ± 4,38
GR ($10^6/\text{mm}^3$)	6,29 ± 2,36	6,242 ± 2,13
PLA ($10^3/\text{mm}^3$)	783,8 ± 491,62	792,4 ± 387,93

Figure 71. Les souris iEC-Pdzrn3 nourries au régime western ne présentent pas de modification de la numération de la formule sanguine comparées à leurs littermates soumises au même régime.

Numération des éléments figurés du sang. GB : globules blancs, LYM : lymphocytes, MON : monocytes, GRA : granulocytes, EOS : éosinophiles, HT : hématoците, GR : globules rouges, PLA : plaquettes. Littermates n=4, iEC-Pdzrn3 n=4. Analyse statistique : Student t-test.

4. Analyse du contenu inflammatoire cardiaque

Par la suite, nous avons étudié le contenu inflammatoire cardiaque, notamment dans ce contexte d'augmentation de cellules inflammatoires circulantes chez les souris sous régime western par rapport au régime standard. Nous avons donc procédé à l'immunomarquage des coupes de cœurs pour les macrophages avec le marqueur conventionnel CD68. Nous observons une augmentation significative du nombre de macrophages présents dans le parenchyme cardiaque entre des souris iEC-Pdzrn3 par rapport à leurs littermates (**FIGURE 72**). De plus, après comparaison aux souris sous régime standard, les souris sous régime western présentent une augmentation considérable de macrophages infiltrés au sein des tissus cardiaques.

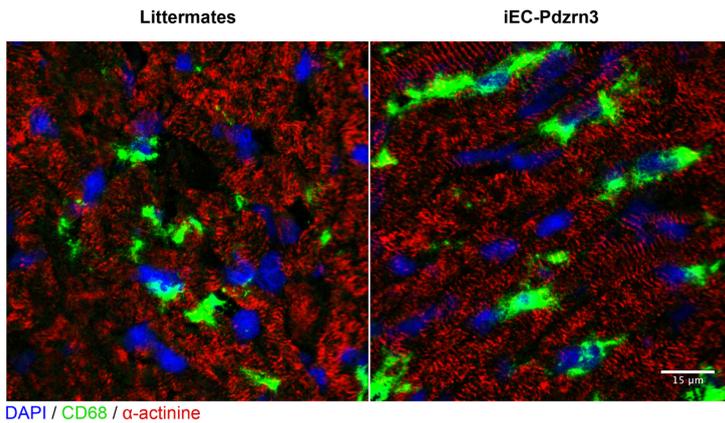
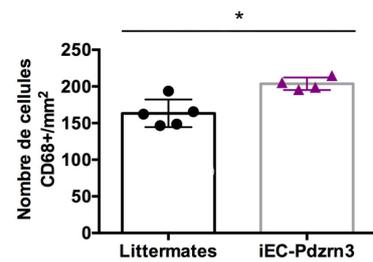
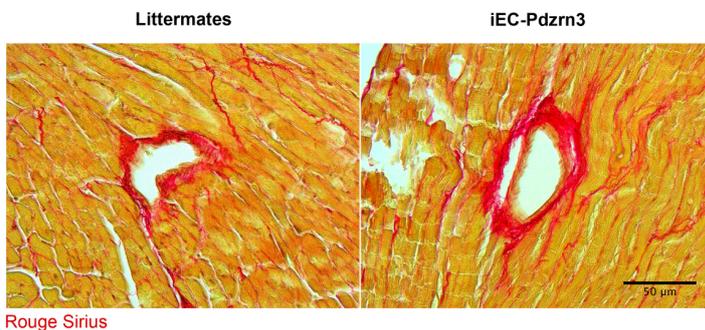
ADAPI / CD68 / α -actinine**B**

Figure 72. Les souris iEC-Pdzrn3 nourries au régime western présentent une augmentation du nombre de macrophages dans le parenchyme cardiaque comparées à leurs littermates soumises au même régime.

(A) Images représentatives de coupes de cœurs immunomarquées pour le marqueur de la lignée macrophagique CD68 (en vert) pour identifier les macrophages. (B) Quantification de l'infiltration des macrophages. Littermates n=5, iEC-Pdzrn3 n=5. Analyse statistique : Mann-Whitney. *= $p < 0,05$.

5. Évaluation de la fibrose

Nous avons ensuite examiné la fibrose (phénomène étroitement liée à l'inflammation) chez ces animaux, notamment dans sa forme périvasculaire. La coloration au Rouge Sirius s'est avérée comparable entre les cœurs des souris iEC-Pdzrn3 et leurs littermates (**FIGURE 73**). Nous observons malgré tout une augmentation globale de la fibrose périvasculaire chez les souris sous régime western comparées à celles des souris sous régime standard.

A

Rouge Sirius

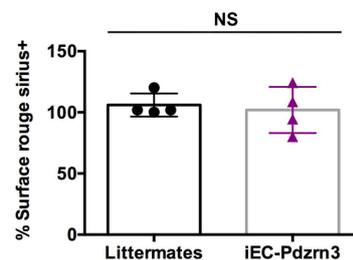
B

Figure 73. Les souris iEC-Pdzrn3 nourries au régime western ne présentent pas d'augmentation de la fibrose périvasculaire ou de remodelage de la matrice extracellulaire comparées à leurs littermates soumises au même régime.

(A) Images représentatives de coupes de cœurs colorées avec du rouge Sirius pour identifier le collagène. (B) Quantification de la fibrose périvasculaire. Littermates n=4, iEC-Pdzrn3 n=4. Analyse statistique : Mann-Whitney. NS=non significatif.

6. Caractérisation du réseau vasculaire

La quantification de la densité vasculaire n'a en revanche montré aucune différence significative de cette mesure entre les souris iEC-Pdzrn3 et leur littermates (**FIGURE 74**). A noter que les densités capillaires moyennes entre les différentes souris et entre les deux régimes sont comparables.

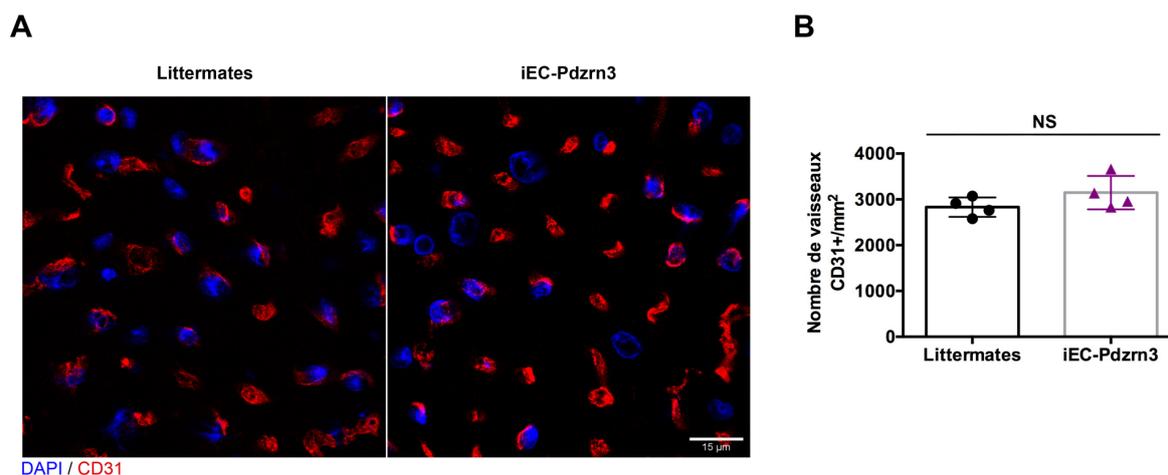


Figure 74. Les souris iEC-Pdzrn3 nourries au régime western ne présentent pas de modification de la vascularisation cardiaque comparées à leurs littermates soumises au même régime.

(A) Images représentatives de coupes de cœurs immunomarquées pour le CD31 pour identifier les vaisseaux. (B) Quantification du nombre de vaisseaux par mm². Littermates n=4, iEC-Pdzrn3 n=4. Analyse statistique : Mann-Whitney. NS=non significatif.

7. Évaluation de la perméabilité vasculaire

Enfin, nous avons évalué le phénotype perméable des vaisseaux des souris sous régime western. L'étude du fibrinogène nous a permis d'observer une extravasation significativement plus importante chez les souris iEC-Pdzrn3 par rapport aux littermates (**FIGURE 75**). Il est, important de noter que les souris sous régime western présentent un phénotype vasculaire nettement plus perméable que les souris sous régime standard.

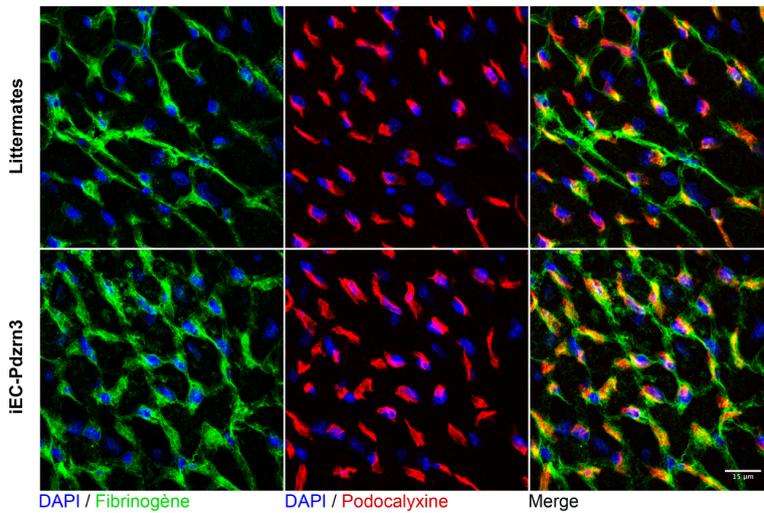
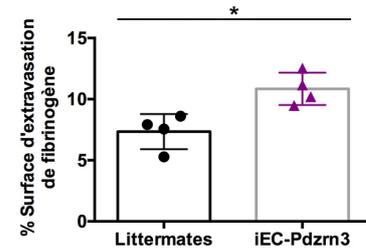
A**B**

Figure 75. Les souris iEC-Pdzrn3 nourries au régime western présentent une augmentation de la perméabilité vasculaire au fibrinogène comparé à leurs littermates soumises au même régime.

(A) Images représentatives de coupes de cœurs immunomarquées pour le fibrinogène (en vert) et la podocalyxine (en rouge) montrant la diffusion de fibrinogène à l'extérieur des vaisseaux. (B) Quantification de la surface d'extravasation du fibrinogène. Littermates n=4, iEC-Pdzrn3 n=4. Analyse statistique : Mann-Whitney. *=p<0,05.

Ces données nous révèlent donc que l'adjonction du régime western affecte de manière franche certains paramètres du phénotype cardiaque (cellules inflammatoires circulantes, infiltration de macrophages, perméabilité et fibrose périvasculaire) des souris iEC-Pdzrn3, mais également des souris littermates, dans une moindre mesure. De manière surprenante, cette aggravation phénotypique ne s'accompagne pas d'une progression des signes de dysfonction diastolique.

Modèle murin $Lpr^{db/db}$

Par ailleurs, un modèle de souris présentant de multiples comorbidités généralement présentes dans l'ICFep a été étudié dans notre laboratoire parallèlement au modèle faisant l'objet de ce travail de thèse. Il s'agit de souris présentant une déficience pour la gène DB codant pour le récepteur de la leptine (protéine responsable de la sensation de satiété), appelées $Lpr^{db/db}$. Celles-ci présentent rapidement une obésité (environ 6 semaines d'âge), suivie d'un diabète de type 2 (environ 12 semaines d'âge). Ce modèle a été développé afin de se rapprocher de la physiopathologie observée chez

l'Homme. Des études ont montré que ces souris présentent des signes de dysfonctions diastoliques, attestées par des augmentations de pression télédiastolique (Alex *et al.*, 2018). Nous avons donc recherché une éventuelle perméabilité vasculaire, telle que décrite dans le modèle iEC-Pdzrn3. Nous avons réalisé l'étude des caractéristiques de perméabilité vasculaire chez les souris $Lpr^{db/db}$ via le même protocole utilisé lors de la caractérisation du modèle iEC-Pdzrn3 au même âge (8 mois).

H. Évaluation de la perméabilité vasculaire

Les résultats montrent que les souris $Lpr^{db/db}$ présentent, à l'instar du modèle précédent, des caractéristiques de perméabilité vasculaire. En effet, nous constatons une augmentation de l'extravasation de l'albumine et des IgG (FIGURE 76A-D). Néanmoins, nous n'avons pas retrouvé de différence significative concernant l'extravasation de fibrinogène (FIGURE 76E-F).

Ces résultats démontrent donc la présence de perméabilité vasculaire au sein d'un modèle approchant les conditions physiopathologiques de l'ICFep.

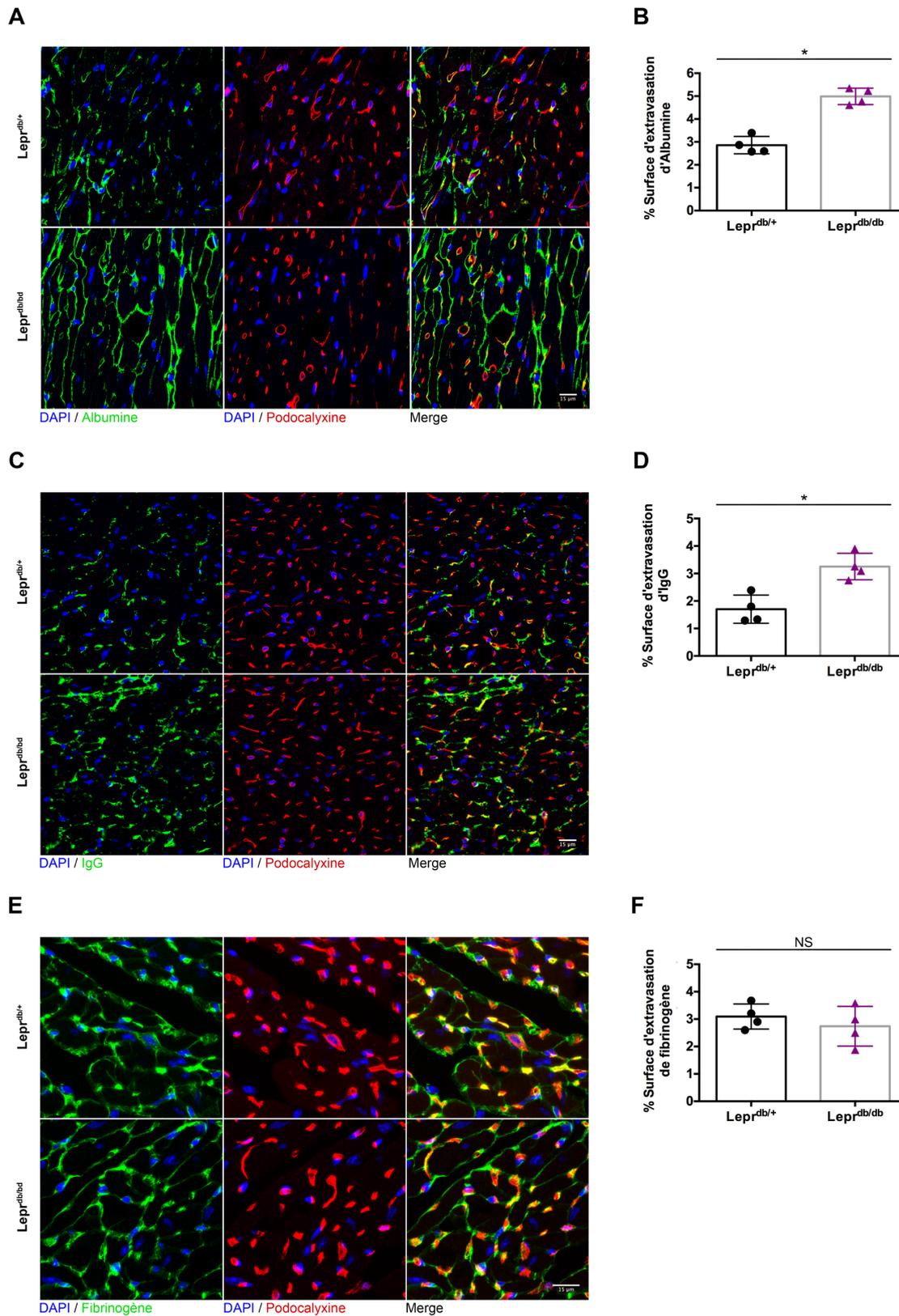


Figure 76. Les souris Lepr^{db/db} présentent une augmentation de la perméabilité vasculaire à l'albumine et aux IgG.

(A) Images représentatives de coupes de cœurs immunomarquées à l'albumine (en vert) et la podocalyxine (en rouge). (B) Quantification de la surface d'extravasation à l'albumine. (C) Images représentatives de coupes de cœurs immunomarquées aux IgG (en vert) et la podocalyxine (en rouge). (D) Quantification de la surface d'extravasation aux IgG. (E) Images représentatives de coupes de cœurs immunomarquées au fibrinogène (en vert) et la podocalyxine (en rouge). (F) Quantification de la surface d'extravasation au fibrinogène. littermates n=4, iEC-Pdzm3 n=4. Analyse statistique : Mann-Whitney. *=p<0,05.

DISCUSSION

L'ICFEP est un syndrome complexe avec une morbidité et une mortalité importante dans le monde. Ces dernières années, la communauté scientifique a eu un regain d'intérêt pour le rôle que pourrait jouer la cellule endothéliale dans le développement et la progression de cette pathologie. En effet, le dysfonctionnement des cellules endothéliales dans le myocarde est suggéré comme étant un mécanisme central dans la physiopathologie de l'ICFEP. L'endothélium des patients présente, à cause de comorbidités telles que le diabète, l'obésité ou l'hypertension, une inflammation systémique qui provoque un dérèglement de la formation d'oxyde nitrique endothéliale. Ce phénomène est accompagné d'une expression accrue de molécules d'adhésions et un état redox altéré de l'endothélium. Ce dysfonctionnement aurait un impact direct sur les cardiomyocytes adjacents qui présentent une activité réduite de PKG associée à une rigidité myocardique aboutissant au dysfonctionnement diastolique du ventricule gauche retrouvé dans l'ICFEP (Paulus and Tschöpe, 2013). Malheureusement, ce paradigme a été élaboré en se basant sur des données provenant de biopsies humaines du VG de patients atteints d'ICFEP mais ces phénomènes ont peu été étudiés dans des modèles animaux et les mécanismes sous-jacents restent un sujet d'investigation important.

Les modèles murins étudiant l'ICFEP couramment utilisés jusqu'à ce jour sont basés sur les comorbidités associées à la maladie (obésité, diabète, hypertension, fibrillation auriculaire...) et le vieillissement (Valero-Muñoz, Backman and Sam, 2017). Ces modèles animaux permettent d'imiter divers aspects de l'HFpEF et aident à étudier les mécanismes moléculaire et cellulaires de la pathologie. Malheureusement, la dysfonction endothéliale n'est pas actuellement au centre de ces modèles d'ICFEP ; que ce soit en termes de conception du modèle ou des investigations réalisées. De ce fait, peu d'articles se focalisent sur la dysfonction endothéliale en lien avec une dysfonction diastolique (Gomolak and Didion, 2014; Murdoch *et al.*, 2014; Gevaert *et al.*, 2017).

Afin d'étudier la contribution de l'endothélium dans l'ICFEP de manière isolée, nous avons fait le choix d'utiliser un modèle murin dans laquelle la dysfonction endothéliale est provoquée. De cette façon, nous nous affranchissons des autres paramètres

retrouvés dans la physiopathologie, et notamment des comorbidités. Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse démontrent le rôle primordial de la cellule endothéliale dans l'homéostasie cardiaque.

Nous avons utilisé des souris génétiquement modifiées permettant la surexpression d'une ubiquitine ligase, actrice de la voie Wnt non-canonique nommée *Pdzrn3*, spécifiquement dans l'endothélium. L'étude phénotypique de ces souris révèle que ces dernières présentent des signes de dysfonction diastolique dès l'âge de 3 mois. À 8 mois, les souris iEC-Pdzrn3 présentent une capacité à l'exercice réduite qui complète les preuves de dysfonction cardiaque. Néanmoins, ces souris ne présentent pas de signes de remodelage cardiaque ou de congestion pulmonaire. Dans la littérature, une augmentation des pressions télédiastoliques est fréquemment associée à un remodelage cardiaque (Burkhoff, Mirsky and Suga, 2005). Néanmoins, des études d'imagerie épidémiologiques montrent que de nombreux cas de patients atteints d'ICFEP présentent une architecture du VG normal (Shah, 2013). De ce fait, si le remodelage du VG reste fortement associé à la pathologie, il n'en est pour autant pas absolu. La congestion pulmonaire est un phénomène courant chez les patients atteints d'ICFEP. De la même façon que pour le remodelage cardiaque, son apparition est non seulement variable parmi les patients atteints d'ICFEP mais peut également se révéler uniquement à l'effort (Simonovic *et al.*, 2018). Le fait que nous n'observons pas de congestion pulmonaire pourrait s'expliquer par le fait que la mesure par gravimétrie n'est possiblement pas assez sensible pour mettre en évidence des signes de congestions mineurs, et nous permet encore moins d'évaluer ces derniers pendant l'effort.

Ce modèle nous a permis de nous affranchir de la présence d'une inflammation de bas grade, représentant un stress non négligeable pour l'endothélium dans l'ICFEP. En effet, nous n'observons pas d'augmentation du nombre de cellules inflammatoires circulantes ou présentes dans le parenchyme cardiaque chez les souris iEC-Pdzrn3. L'inflammation apparaît comme un facteur aggravant la dysfonction diastolique puisqu'elle participe directement au remodelage de la matrice extracellulaire cardiaque et donc, entre autres, à l'apparition de fibrose qui rigidifie le myocarde (Glezeva and Baugh, 2014). L'absence d'expression de facteurs d'adhésion par les cellules

endothéliales ou de progression de la fibrose au niveau du tissu cardiaque semblent donc cohérentes avec le phénotype inflammatoire observé chez les souris iEC-Pdzn3. Les macrophages sont souvent les cellules inflammatoires de choix étudiées au sein du tissu cardiaque dans le cadre de l'ICFEP car leur présence et activation participent activement à la dysfonction diastolique (Hulsmans *et al.*, 2018). Que ce soit en conditions physiologiques ou pathologiques, les macrophages jouent un rôle déterminant dans l'homéostasie cardiaque. Le myocarde comporte des macrophages résidents avec un phénotype majoritaire de type M2 (anti-inflammatoire) qui permettent l'élimination de cellules sénescents ou endommagées mais participent également à l'accélération de la repolarisation des myocytes et à la conduction électrique (Pinto *et al.*, 2012; Epelman, Lavine and Randolph, 2014; Hulsmans *et al.*, 2017). En cas d'évènement pathologique, la majorité des macrophages présents pendant la phase inflammatoire proviennent de monocytes circulants mobilisés vers la zone inflammée (Swirski, Robbins and Nahrendorf, 2016). Le vieillissement, qui est un facteur de risque de l'ICFEP, est caractérisé par une sénescence immunitaire impliquant une régulation défailante et à la hausse de la réponse immunitaire basale, associée à une augmentation du nombre de macrophages cardiaques (Chiao *et al.*, 2011; Baylis *et al.*, 2013). De plus, le phénotype même des macrophages cardiaques évolue, avec notamment une diminution des macrophages de type M2 au profit des macrophages de type M1 avec l'âge (Ma *et al.*, 2015). Ces évènements participent activement aux changements structurels et fonctionnels cardiaques. De la même façon, une régulation à la hausse de la polarisation des macrophages M1 ainsi qu'une répression de la réponse anti-inflammatoire des macrophages M2 sont observées dans les tissus cardiaques diabétiques (Jia, DeMarco and Sowers, 2016). L'exploration du phénotype des macrophages cardiaques des souris iEC-Pdzn3 n'a pas révélé de modification de la polarisation de ces derniers. Nos souris âgées de 8 mois présentent majoritairement des macrophages cardiaques de type M2, ce qui est en accord avec les résultats de la littérature (Ma, Mouton and Lindsey, 2018). Il pourrait donc être pertinent d'analyser ce phénotype sur des souris plus âgées. Ces résultats démontrent néanmoins que les animaux peuvent développer des dysfonctions cardiaques en l'absence, ou avec très peu, d'intervention de l'inflammation.

Les cardiomyocytes sont des cellules fondamentales au bon fonctionnement cardiaque. L'accès à des tissus myocardiques provenant de patients ICFEp a permis de mettre en lumière certaines altérations structurelles et fonctionnelles. On observe, entre autre, une hypertrophie des cardiomyocytes liée à une régulation négative de la voie de signalisation inhibant l'hypertrophie pathologique GMPc/PKG (Takimoto, 2012b; van Heerebeek *et al.*, 2012). Il s'y associe une rigidité cardiomyocytaire résultant de changements dans l'expression et dans les statuts de phosphorylation des deux isoformes de la titine (N2B, N2BA) (Linke and Hamdani, 2014). Malheureusement, la compréhension de la physiopathologie des cardiomyocytes dans l'ICFEp reste modeste. Mise à part une modeste hypertrophie, nous n'avons pas mis en évidence de dysfonction manifeste des cardiomyocytes. L'architecture de ces derniers, observée par microscopie électronique, est physiologique chez les souris iEC-Pdzrn3. La répartition ainsi que l'expression de la connexine 43 n'est pas modifiée. Il en est de même pour l'expression des deux isoformes de la titine ou encore de certains acteurs de la voie du calcium. Néanmoins le fonctionnement des cardiomyocytes est complexe et ces données ne nous permettent pas d'exclure une dysfonction intrinsèque. Ainsi, des études fonctionnelles plus poussées paraissent indispensables à l'exploration phénotypique des cardiomyocytes de nos souris. Le phénotype vasculaire a été consciencieusement analysé afin de comprendre les répercussions de la surexpression de Pdzrn3 dans l'endothélium et leurs conséquences sur la fonction cardiaque. Tout d'abord, nous avons remarqué que, structurellement, les vaisseaux sont formés correctement et expriment les marqueurs génériques des cellules endothéliales. La densité vasculaire n'est pas non plus impactée puisque cette dernière est similaire dans nos différents groupes de souris. S'ajoute à cela l'analyse de cœurs transparisés, qui ne montre pas de modification de l'architecture générale du réseau capillaire cardiaque des souris iEC-Pdzrn3. Nos résultats révèlent que la surexpression de Pdzrn3 dans les cellules endothéliales ne semble pas affecter le développement vasculaire, mais est en revanche capable de moduler la perméabilité de l'endothélium. En effet, le phénotype le plus caractéristique des souris iEC-Pdzrn3 est la présence d'une perméabilité accrue de l'endothélium à différentes protéines sériques tels que des IgG, de l'albumine ou encore du fibrinogène dès l'âge de trois mois. On observe une perméabilité basale qui croît avec l'âge chez les littermates mais ce phénotype est exacerbé chez les souris iEC-Pdzrn3 et est renforcée par le régime western. Les protéines sériques extravasées dans le

parenchyme cardiaque pourraient avoir un impact direct sur les cardiomyocytes. En effet, des études *in vitro* ont montré la capacité du fibrinogène à réduire la contractilité des cardiomyocytes (Boyd *et al.*, 2008).

La dysfonction endothéliale est une dénomination vaste qui peut impliquer bon nombre de phénomènes, dont la perméabilité vasculaire. La perméabilité de la barrière endothéliale peut être modulée par divers mécanismes dont la modulation et la rupture des complexes jonctionnels endothéliaux et/ou l'augmentation de la transcytose. Des travaux antérieurs ont montré que *Pdzrn3* entraîne une modulation de la stabilité des jonctions inter-endothéliales (Sewduth *et al.*, 2017). Cette étude a observé des ruptures des jonctions inter-endothéliales sur des embryons mutants en microscopie électronique ; apportant un argument fort quant à l'origine paracellulaire de la perméabilité endothéliale. Néanmoins, afin de n'exclure aucune hypothèse, nous avons également étudié le versant transcellulaire de nos souris iEC-*Pdznr3*.

L'observation en microscopie électronique de vaisseaux fragilisés, voire rompus, avec la présence de globules rouges dans le parenchyme cardiaque renforce l'idée de perméabilité paracellulaire. Néanmoins, nous n'avons pas mis en évidence de modification de l'expression de composants clés des jonctions serrées, comme l'occludine. L'expression et la localisation de la VE-Cadhérine n'est pas non plus altérée au niveau des cellules endothéliales, alors même que des modifications de cette dernière soient fortement associées à l'hyperperméabilité vasculaire (Rho, Ando and Fukuhara, 2017). Enfin, nous n'avons pas observé de rupture visible de jonctions entre les cellules endothéliales en microscopie électronique.

Concernant le mécanisme de perméabilité transcellulaire, nous n'avons pas mis en évidence de modification du trafic vésiculaire présent sur les parois des cellules endothéliales. Ces résultats sont cependant en cours d'approfondissement avec des mesures d'internalisation de traceurs tels que la peroxydase de raifort (HRP) observés en microscopie électronique (Wang, Liu, Huang, Fu, Tomita, Britton, Cho, Chen, Sun, J.-X. Ma, *et al.*, 2020).

Même s'il est difficile d'apporter une conclusion quant aux mécanismes de perméabilité vasculaire induit par la surexpression de *Pdzrn3* dans l'endothélium, les changements d'expression de certaines protéines de la matrice ont attiré notre attention. En effet, les cellules endothéliales des souris iEC-*Pdzrn3* présentent une diminution significative de l'expression transcriptionnelle des chaînes alpha du collagène IV, (*Col4a1* et *Col4a2*). Chez l'humain, des mutations dans ces gènes sont

associées aux maladies des petits vaisseaux cérébraux et provoquent notamment des hémorragies intracérébrales, des espaces périvasculaires dilatés ou encore des anévrismes (Rannikmäe *et al.*, 2015). Chez la souris, des mutations du gène *Col4a1* provoquent des hémorragies cérébrales chez le nouveau-né, ainsi qu'un phénotype vasculaire complexe avec un endothélium dysfonctionnel, un tonus vasculaire diminué et une pression artérielle réduite chez des animaux plus âgés (Van Agtmael *et al.*, 2010). De façon intéressante, une étude démontre un amincissement de la membrane basale vasculaire ainsi qu'une perméabilité vasculaire dans un modèle de souris portant des mutations sur le gène *Col4a1* (Trouillet *et al.*, 2017). Même si aucun mécanisme moléculaire n'a pour l'instant été proposé, une modulation de l'expression des chaînes alpha du collagène IV pourrait expliquer la fragilité et le phénotype perméable de l'endothélium des souris iEC-Pdzn3.

Les péricytes sont des cellules murales impliquées dans l'homéostasie vasculaire, notamment dans la stabilisation structurelle de l'endothélium ainsi que sa perméabilité (Hellström *et al.*, 2001; Enge *et al.*, 2002). La perte péricytaire au niveau du réseau microvasculaire est une caractéristique de la rétinopathie diabétique et est associée à une perméabilité altérée du système vasculaire (Shin, Sorenson and Sheibani, 2014). Nous n'avons pas mis en évidence de changement dans le recouvrement péricytaire des capillaires cardiaques des souris iEC-Pdzn3. Ce phénomène ne semble donc pas participer à la modulation des propriétés de la barrière endothéliale observée chez ces souris.

Une augmentation significative de l'espace interstitielle des myocardes a été observée chez les souris iEC-Pdzn3. L'œdème cardiaque, même mineur, peut aboutir à des perturbations systoliques et diastoliques importantes (Laine and Allen, 1991) et pourrait être à l'origine des dysfonctions cardiaques observées chez nos souris. Dans un contexte de perméabilité vasculaire accrue, la formation d'un œdème cardiaque ne paraît pas irrationnelle. Néanmoins, en condition physiologique, l'afflux de liquide dans l'interstitium est finement régulé par le réseau lymphatique. Récemment, diverses études ont mis en évidence la présence de dysfonction lymphatique dans des modèles murins présentant des facteurs de risque typiques d'ICFep comme le diabète, l'obésité ou encore le vieillissement (Conway *et al.*, 2009; Nitti *et al.*, 2016; Zawieja *et al.*, 2016). Bien qu'à ce jour le réseau lymphatique cardiaque n'ait jamais fait la preuve d'une implication directe dans l'ICFep, la présence d'œdèmes généralisés oriente vers un

potentiel dysfonctionnement généralisé de ce réseau (Cuijpers *et al.*, 2020). Une récente étude a d'ailleurs pour la première fois mis en évidence des modifications morphologiques et fonctionnelles de la vascularisation lymphatique provenant de biopsies de peau de patients atteints d'ICFEP (Rossitto Giacomo *et al.*, 2020).

Chez les souris iEC-Pdzn3, aucune altération structurelle du réseau lymphatique n'a pu être mise en évidence. Malheureusement, l'aspect fonctionnel de ce réseau n'a pas été étudié. Ainsi, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées, comme le dépassement des capacités de drainage lymphatique face à la perméabilité vasculaire accrue observée chez les souris iEC-Pdzn3, un drainage inadapté ou encore une hyperperméabilité du réseau lymphatique lui-même. En effet, le promoteur endothélial spécifique *Cdh5* utilisé pour déclencher la surexpression de Pdzn3 dans nos souris est aussi exprimé dans les cellules endothéliales lymphatiques (LEC) (Alva *et al.*, 2006). Devant le phénotype perméable du réseau vasculaire, il paraît donc légitime de s'interroger quant à une éventuelle perméabilité du réseau lymphatique. Nous ne pouvons malheureusement pas apporter d'éléments de réponse à cette question pour le moment. Le phénotype cardiaque de souris surexprimant Pdzn3 sous le contrôle du promoteur *pdgfb* (*pour Platelet Derived Growth Factor subunit B*) qui est spécifique de l'endothélium vasculaire et dont l'expression dans le réseau lymphatique n'a pas été rapportée (Payne, De Val and Neal, 2018) est en cours d'investigation. Ces expériences apporteront des éléments de réponse concernant le rôle du réseau lymphatique dans le développement de l'œdème cardiaque observé chez les souris iEC-Pdzn3, mais aussi sur l'implication directe de cet œdème sur la fonction cardiaque. En effet, il est à l'heure actuelle impossible de déterminer si l'œdème myocardique retrouvé chez les souris iEC-Pdzn3 provoque la dysfonction diastolique, ou ne fait que l'exacerber. L'augmentation de l'espace interstitiel peut en effet avoir des conséquences multiples et non exclusives sur l'homéostasie cardiaque. Par exemple, ce phénomène peut altérer les communications entre les différentes structures cardiaques (cellules endothéliales/cardiomyocytes ou cardiomyocytes/cardiomyocytes), décrites dans la littérature comme essentielles au développement et au bon fonctionnement du myocarde (Hsieh *et al.*, 2006; Tirziu, Giordano and Simons, 2010; Talman and Kivelä, 2018). De même l'œdème cardiaque peut également augmenter les pressions des fluides interstitiels, ce qui a pour conséquence de diminuer la contractilité et augmenter la rigidité du VG (Desai *et al.*, 2008).

Il serait intéressant d'étudier plus en détail le phénotype cardiaque des souris jeunes sans augmentation des pressions télédiastoliques, afin de déterminer si la formation de l'œdème cardiaque précède la dysfonction myocardique. L'augmentation du drainage lymphatique par la stimulation de la lymphangiogenèse pourrait aussi être envisagée. En effet, celle-ci permet une récupération fonctionnelle dans des modèles post-infarctus du myocarde (MI) présentant des œdèmes myocardiques (Henri *et al.*, 2016; Trincot *et al.*, 2019).

Certains régimes alimentaires favorisent le développement de l'obésité, du diabète, de l'hypertension et d'autres facteurs de risque de maladies cardiovasculaires. C'est le cas notamment des aliments occidentaux, ou régime western, qui sont riches en sucre et/ou en acides gras saturés (Anand *et al.*, 2015; Oikonomou *et al.*, 2018; Kopp, 2019). Dans la littérature, le recours au régime western est largement utilisé dans l'exploration de modèles animaux d'ICFEP. En effet, les régimes gras (entre 40-60% de gras) induisent une obésité et un diabète de type 2 chez les souris (Heydemann, 2016). Ces régimes sont souvent utilisés afin d'ajouter des facteurs de risque dans les modèles d'ICFEP et favoriser l'apparition de dysfonction cardiaque (Meng *et al.*, 2017; Schiattarella *et al.*, 2019). Dans le but d'exacerber la dysfonction endothéliale observée chez nos souris, nous les avons nourries avec un régime western qui n'induit pas d'obésité mais une hypercholestérolémie associée à des dysfonctions microvasculaires (Stapleton *et al.*, 2010). En comparaison avec le régime standard, les souris sous régime western présentent une augmentation du nombre de cellules inflammatoires circulantes. On observe également une augmentation du nombre de macrophages présents dans le parenchyme cardiaque, et a fortiori chez les souris iEC-Pdzn3. La fibrose périvasculaire est elle aussi augmentée dans nos souris sous régime western par rapport à celles sous régime standard. Néanmoins, aucune différence n'est observée au sein d'un même groupe de souris (iEC-Pdzn3 ou littermates) en fonction des régimes. Sur le plan du phénotype vasculaire, on observe une perméabilité plus marquée chez les souris sous régime western et encore plus chez les souris iEC-Pdzn3. Le régime western semble donc favoriser une inflammation circulante et aggraver le phénotype vasculaire. L'augmentation du nombre de cellules inflammatoires dans le parenchyme cardiaque accompagnée de la progression de la fibrose pourrait être due à la majoration importante de la perméabilité vasculaire.

Néanmoins, l'aggravation de certains paramètres du phénotype cardiaque des souris iEC-Pdzrn3 sous régime western ne s'accompagne pas d'une progression des signes de dysfonctions diastoliques. A lui seul, le régime western exacerbe le phénotype inflammatoire et fibrotique des souris iEC-Pdzrn3 mais également celui des littermates. Néanmoins ce dernier n'apparaît pas comme un acteur majeur à la formation de dysfonction diastolique chez nos souris.

Nous avons comparé le phénotype vasculaire perméable retrouvé chez les souris iEC-Pdzrn3 à celui de souris obèses et diabétiques Lpr^{db/db}. Ces souris ont été décrites comme un modèle pertinent d'ICFEP puisqu'elles additionnent bon nombre des éléments phénotypiques retrouvés chez les patients comme une dysfonction diastolique, une hypertrophie cardiomyocytaire, une fibrose interstitielle ainsi qu'une raréfaction microvasculaire (Alex *et al.*, 2018). A l'instar des souris iEC-Pdzrn3, nous observons une augmentation de la perméabilité vasculaire chez les souris Lpr^{db/db}. Ces résultats révèlent que ce phénomène encore inexploré dans le cadre de l'ICFEP se produit dans deux modèles distincts de dysfonction diastolique. Le phénotype vasculaire induit par la surexpression de Pdzrn3 dans l'endothélium semble donc reproduire des manifestations présentes dans un modèle d'ICFEP basé sur des comorbidités. Ces phénomènes pourraient donc avoir une importance majeure dans la compréhension de la physiopathologie de l'ICFEP.

Pour conclure, les souris iEC-Pdzrn3 présentent une dysfonction diastolique accompagnée d'altérations cardiaques et vasculaires sévères. Ces résultats mettent en évidence une relation de cause à effet entre le dysfonctionnement vasculaire et la physiopathologie de l'ICFEP.

BIBLIOGRAPHIE

Agapitov, A. V. and Haynes, W. G. (2002) 'Role of endothelin in cardiovascular disease', *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system: JRAAS*, 3(1), pp. 1–15. doi: 10.3317/jraas.2002.001.

Aguilar, D. *et al.* (2010) 'Comparison of Patients with Heart Failure and Preserved Left Ventricular Ejection Fraction Among Those With versus Without Diabetes Mellitus', *The American journal of cardiology*, 105(3), p. 373. doi: 10.1016/j.amjcard.2009.09.041.

Aird, W. C. (2007) 'Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms', *Circulation Research*, 100(2), pp. 158–173. doi: 10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a.

Alem, M. M. (2019) 'Endothelial Dysfunction in Chronic Heart Failure: Assessment, Findings, Significance, and Potential Therapeutic Targets', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13). doi: 10.3390/ijms20133198.

Alex, L. *et al.* (2018) 'Characterization of a mouse model of obesity-related fibrotic cardiomyopathy that recapitulates features of human heart failure with preserved ejection fraction', *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 315(4), pp. H934–H949. doi: 10.1152/ajpheart.00238.2018.

Alva, J. A. *et al.* (2006) 'VE-Cadherin-Cre-recombinase transgenic mouse: a tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells', *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 235(3), pp. 759–767. doi: 10.1002/dvdy.20643.

Amano, M., Nakayama, M. and Kaibuchi, K. (2010) 'Rho-Kinase/ROCK: A Key Regulator of the Cytoskeleton and Cell Polarity', *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, 67(9), pp. 545–554. doi: 10.1002/cm.20472.

van Amerongen, R. and Nusse, R. (2009) 'Towards an integrated view of Wnt signaling in development', *Development (Cambridge, England)*, 136(19), pp. 3205–3214. doi: 10.1242/dev.033910.

Anand, S. S. *et al.* (2015) 'Food Consumption and its impact on Cardiovascular Disease: Importance of Solutions focused on the globalized food system', *Journal of the American College of Cardiology*, 66(14), pp. 1590–1614. doi: 10.1016/j.jacc.2015.07.050.

Andreone, B. J. *et al.* (2017) 'Blood-Brain Barrier Permeability Is Regulated by Lipid Transport-Dependent Suppression of Caveolae-Mediated Transcytosis', *Neuron*, 94(3), pp. 581-594.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2017.03.043.

Anversa, P. *et al.* (1980) 'Stereological measurement of cellular and subcellular hypertrophy and hyperplasia in the papillary muscle of adult rat', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 12(8), pp. 781–795. doi: 10.1016/0022-2828(80)90080-2.

- Anyfanti, P. *et al.* (2018) 'Dermal capillary rarefaction as a marker of microvascular damage in patients with rheumatoid arthritis: Association with inflammation and disorders of the macrocirculation', *Microcirculation*, 25(5), p. e12451. doi: 10.1111/micc.12451.
- Archbold, H. C. *et al.* (2012) 'How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/ β -catenin pathway', *Acta Physiologica*, 204(1), pp. 74–109. doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02293.x.
- Artus, C. *et al.* (2014) 'The Wnt/planar cell polarity signaling pathway contributes to the integrity of tight junctions in brain endothelial cells', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 34(3), pp. 433–440. doi: 10.1038/jcbfm.2013.213.
- Aspelund Aleksanteri *et al.* (2016) 'Lymphatic System in Cardiovascular Medicine', *Circulation Research*, 118(3), pp. 515–530. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306544.
- Avogaro, A., de Kreutzenberg, S. V. and Fadini, G. (2008) 'Endothelial dysfunction: causes and consequences in patients with diabetes mellitus', *Diabetes Research and Clinical Practice*, 82 Suppl 2, pp. S94–S101. doi: 10.1016/j.diabres.2008.09.021.
- Ballal, K. *et al.* (2010) 'Obesogenic high fat western diet induces oxidative stress and apoptosis in rat heart', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 344(1–2), pp. 221–230. doi: 10.1007/s11010-010-0546-y.
- Baluk, P. *et al.* (2003) 'Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors', *The American Journal of Pathology*, 163(5), pp. 1801–1815. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63540-7.
- Bátori, R. *et al.* (2017) 'Interplay of myosin phosphatase and protein phosphatase-2A in the regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and nitric oxide production', *Scientific Reports*, 7. doi: 10.1038/srep44698.
- Baylis, D. *et al.* (2013) 'Understanding how we age: insights into inflammaging', *Longevity & Healthspan*, 2, p. 8. doi: 10.1186/2046-2395-2-8.
- Bers, D. M. (2002) 'Cardiac excitation-contraction coupling', *Nature*, 415(6868), pp. 198–205. doi: 10.1038/415198a.
- Bers, D. M. (2014) 'Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction', *Annual Review of Physiology*, 76, pp. 107–127. doi: 10.1146/annurev-physiol-020911-153308.
- Biron, K. E. *et al.* (2011) 'Amyloid triggers extensive cerebral angiogenesis causing blood brain barrier permeability and hypervascularity in Alzheimer's disease', *PLoS One*, 6(8), p. e23789. doi: 10.1371/journal.pone.0023789.
- Bjarnegård, M. *et al.* (2004) 'Endothelium-specific ablation of PDGFB leads to pericyte loss and glomerular, cardiac and placental abnormalities', *Development (Cambridge, England)*, 131(8), pp. 1847–1857. doi: 10.1242/dev.01080.

- Borlaug, B. A. *et al.* (2006) 'Impaired chronotropic and vasodilator reserves limit exercise capacity in patients with heart failure and a preserved ejection fraction', *Circulation*, 114(20), pp. 2138–2147. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.632745.
- Boyd, J. H. *et al.* (2008) 'Fibrinogen decreases cardiomyocyte contractility through an ICAM-1-dependent mechanism', *Critical Care*, 12(1), p. R2. doi: 10.1186/cc6213.
- Brash, J. T., Ruhrberg, C. and Fantin, A. (2018) 'Evaluating Vascular Hyperpermeability-inducing Agents in the Skin with the Miles Assay', *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (136). doi: 10.3791/57524.
- Breemen, V. L. V. (1953) 'Intercalated discs in heart muscle studied with the electron microscope', *The Anatomical Record*, 117(1), pp. 49–63. doi: 10.1002/ar.1091170106.
- Brenes-Castro, D. *et al.* (2018) 'Temporal Frame of Immune Cell Infiltration during Heart Failure Establishment: Lessons from Animal Models', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12). doi: 10.3390/ijms19123719.
- Bruckdorfer, R. (2005) 'The basics about nitric oxide', *Molecular Aspects of Medicine*, 26(1), pp. 3–31. doi: 10.1016/j.mam.2004.09.002.
- Brutsaert, D. L. *et al.* (1996) 'The cardiac endothelium: functional morphology, development, and physiology', *Progress in Cardiovascular Diseases*, 39(3), pp. 239–262. doi: 10.1016/s0033-0620(96)80004-1.
- Brutsaert, D. L. (2003) 'Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity', *Physiological Reviews*, 83(1), pp. 59–115. doi: 10.1152/physrev.00017.2002.
- Burkhoff, D., Mirsky, I. and Suga, H. (2005) 'Assessment of systolic and diastolic ventricular properties via pressure-volume analysis: a guide for clinical, translational, and basic researchers', *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 289(2), pp. H501-512. doi: 10.1152/ajpheart.00138.2005.
- van Buul, J. D. and Timmerman, I. (2016) 'Small Rho GTPase-mediated actin dynamics at endothelial adherens junctions', *Small GTPases*, 7(1), pp. 21–31. doi: 10.1080/21541248.2015.1131802.
- Cadigan, K. M. and Waterman, M. L. (2012) 'TCF/LEFs and Wnt Signaling in the Nucleus', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11). doi: 10.1101/cshperspect.a007906.
- Cai, J. and Boulton, M. (2002) 'The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions', *Eye*, 16(3), pp. 242–260. doi: 10.1038/sj.eye.6700133.
- Calvert, J. W. *et al.* (2011) 'Exercise protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via stimulation of $\beta(3)$ -adrenergic receptors and increased nitric oxide signaling: role of nitrite and nitrosothiols', *Circulation Research*, 108(12), pp. 1448–1458. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.241117.

Cannavo, A. and Koch, W. J. (2017) 'Targeting β 3-Adrenergic Receptors in the Heart: Selective Agonism and β -Blockade', *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 69(2), pp. 71–78. doi: 10.1097/FJC.0000000000000444.

Carreau, A., Kieda, C. and Grillon, C. (2011) 'Nitric oxide modulates the expression of endothelial cell adhesion molecules involved in angiogenesis and leukocyte recruitment', *Experimental Cell Research*, 317(1), pp. 29–41. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.08.011.

Carreño, J. E. *et al.* (2006) '[Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events]', *Revista Espanola De Cardiologia*, 59(5), pp. 473–486.

Chamberlain, A. M. *et al.* (2015) 'Multimorbidity in heart failure: a community perspective', *The American Journal of Medicine*, 128(1), pp. 38–45. doi: 10.1016/j.amjmed.2014.08.024.

Chang, T.-H. *et al.* (2015) 'Structure and functional properties of Norrin mimic Wnt for signalling with Frizzled4, Lrp5/6, and proteoglycan', *eLife*. Edited by J. Kuriyan, 4, p. e06554. doi: 10.7554/eLife.06554.

Chen, C.-J. *et al.* (2014) 'Infection of pericytes in vitro by Japanese encephalitis virus disrupts the integrity of the endothelial barrier', *Journal of Virology*, 88(2), pp. 1150–1161. doi: 10.1128/JVI.02738-13.

Chen, G. and Courey, A. J. (2000) 'Groucho/TLE family proteins and transcriptional repression', *Gene*, 249(1–2), pp. 1–16. doi: 10.1016/S0378-1119(00)00161-x.

Chen, Guoqing and Courey, A. J. (2000) 'Groucho/TLE family proteins and transcriptional repression', *Gene*, 249(1), pp. 1–16. doi: 10.1016/S0378-1119(00)00161-X.

Cheng, C. *et al.* (2008) 'Wnt5a-mediated non-canonical Wnt signalling regulates human endothelial cell proliferation and migration', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 365(2), pp. 285–290. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.10.166.

Cheng, C., Smith, S. K. and Charnock-Jones, D. S. (2003) 'Wnt-1 signaling inhibits human umbilical vein endothelial cell proliferation and alters cell morphology', *Experimental Cell Research*, 291(2), pp. 415–425. doi: 10.1016/j.yexcr.2003.07.006.

Cheng, J. M. *et al.* (2013) 'Biomarkers of heart failure with normal ejection fraction: a systematic review', *European Journal of Heart Failure*, 15(12), pp. 1350–1362. doi: 10.1093/eurjhf/hft106.

Chiao, Y. A. *et al.* (2011) 'Multi-analyte profiling reveals matrix metalloproteinase-9 and monocyte chemoattractant protein-1 as plasma biomarkers of cardiac aging', *Circulation. Cardiovascular Genetics*, 4(4), pp. 455–462. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.111.959981.

Chiao, Y. A. and Rabinovitch, P. S. (2015) 'The Aging Heart', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(9). doi: 10.1101/cshperspect.a025148.

- Chinali, M. *et al.* (2010) 'Risk factors and comorbidities in a community-wide sample of patients hospitalized with acute systolic or diastolic heart failure: the Worcester Heart Failure Study', *Coronary Artery Disease*, 21(3), pp. 137–143. doi: 10.1097/MCA.0b013e328334eb46.
- Choi, K.-S. *et al.* (2016) 'The endothelial E3 ligase HECW2 promotes endothelial cell junctions by increasing AMOTL1 protein stability via K63-linked ubiquitination', *Cellular Signalling*, 28(11), pp. 1642–1651. doi: 10.1016/j.cellsig.2016.07.015.
- Choi, S. H. *et al.* (2013) ' α -Catenin interacts with APC to regulate β -catenin proteolysis and transcriptional repression of Wnt target genes', *Genes & Development*, 27(22), pp. 2473–2488. doi: 10.1101/gad.229062.113.
- Cingolani Horacio E. *et al.* (2006) 'The Positive Inotropic Effect of Angiotensin II', *Hypertension*, 47(4), pp. 727–734. doi: 10.1161/01.HYP.0000208302.62399.68.
- Cleland, J. G. F. *et al.* (2006) 'The perindopril in elderly people with chronic heart failure (PEP-CHF) study', *European Heart Journal*, 27(19), pp. 2338–2345. doi: 10.1093/eurheartj/ehl250.
- Clevers, H. and Nusse, R. (2012) 'Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease', *Cell*, 149(6), pp. 1192–1205. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.012.
- Conway, W. C. *et al.* (2009) 'Age-related lymphatic dysfunction in melanoma patients', *Annals of Surgical Oncology*, 16(6), pp. 1548–1552. doi: 10.1245/s10434-009-0420-x.
- Coppiello Giulia *et al.* (2015) 'Meox2/Tcf15 Heterodimers Program the Heart Capillary Endothelium for Cardiac Fatty Acid Uptake', *Circulation*, 131(9), pp. 815–826. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013721.
- Corada, M. *et al.* (2019) 'Fine-Tuning of Sox17 and Canonical Wnt Coordinates the Permeability Properties of the Blood-Brain Barrier', *Circulation Research*, 124(4), pp. 511–525. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313316.
- Costa, E. C. *et al.* (2019) 'Optical clearing methods: An overview of the techniques used for the imaging of 3D spheroids', *Biotechnology and Bioengineering*, 116(10), pp. 2742–2763. doi: <https://doi.org/10.1002/bit.27105>.
- Cselenyi, C. S. *et al.* (2008) 'LRP6 transduces a canonical Wnt signal independently of Axin degradation by inhibiting GSK3's phosphorylation of beta-catenin', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(23), pp. 8032–8037. doi: 10.1073/pnas.0803025105.
- Cuijpers, I. *et al.* (2020) 'Microvascular and lymphatic dysfunction in HFpEF and its associated comorbidities', *Basic Research in Cardiology*, 115(4). doi: 10.1007/s00395-020-0798-y.
- Deem, T. L. and Cook-Mills, J. M. (2004) 'Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) activation of endothelial cell matrix metalloproteinases: role of reactive oxygen species', *Blood*, 104(8), pp. 2385–2393. doi: 10.1182/blood-2004-02-0665.

Delahaye, F. *et al.* (1998) '[Epidemiology and economic impact of heart failure in France]', *Archives Des Maladies Du Coeur Et Des Vaisseaux*, 91(11), pp. 1307–1314.

Desai, K. V. *et al.* (2008) 'Mechanics of the left ventricular myocardial interstitium: effects of acute and chronic myocardial edema', *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 294(6), pp. H2428-2434. doi: 10.1152/ajpheart.00860.2007.

Dessy, C. and Balligand, J.-L. (2010) 'Beta3-Adrenergic Receptors in Cardiac and Vascular Tissues: Emerging Concepts and Therapeutic Perspectives', in Vanhoutte, P. M. (ed.) *Advances in Pharmacology*. Academic Press (Cardiovascular Pharmacology), pp. 135–163. doi: 10.1016/S1054-3589(10)59005-7.

Dongaonkar, R. M. *et al.* (2010) 'Myocardial microvascular permeability, interstitial oedema, and compromised cardiac function', *Cardiovascular Research*, 87(2), pp. 331–339. doi: 10.1093/cvr/cvq145.

Dongaonkar, R. M. *et al.* (2012) 'TIME COURSE OF MYOCARDIAL INTERSTITIAL EDEMA RESOLUTION AND ASSOCIATED LEFT VENTRICULAR DYSFUNCTION', *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)*, 19(8), pp. 714–722. doi: 10.1111/j.1549-8719.2012.00204.x.

Drab, M. *et al.* (2001) 'Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice', *Science (New York, N.Y.)*, 293(5539), pp. 2449–2452. doi: 10.1126/science.1062688.

Dunlay, S. M., Roger, V. L. and Redfield, M. M. (2017) 'Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction', *Nature Reviews. Cardiology*, 14(10), pp. 591–602. doi: 10.1038/nrcardio.2017.65.

Dunn, K. K. *et al.* (2019) 'Coculture of Endothelial Cells with Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Progenitors Reveals a Differentiation Stage-Specific Enhancement of Cardiomyocyte Maturation', *Biotechnology Journal*, 14(8), p. e1800725. doi: 10.1002/biot.201800725.

Dvorak, A. M. and Feng, D. (2001) 'The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle', *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 49(4), pp. 419–432. doi: 10.1177/002215540104900401.

Dvorak, H. F. (2015) 'Tumors: Wounds that do not heal--Redux', *Cancer immunology research*, 3(1), pp. 1–11. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0209.

Endemann, D. H. and Schiffrin, E. L. (2004) 'Endothelial dysfunction', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 15(8), pp. 1983–1992. doi: 10.1097/01.ASN.0000132474.50966.DA.

Enge, M. *et al.* (2002) 'Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy', *The EMBO journal*, 21(16), pp. 4307–4316. doi: 10.1093/emboj/cdf418.

- Epelman, S., Lavine, K. J. and Randolph, G. J. (2014) 'Origin and Functions of Tissue Macrophages', *Immunity*, 41(1), pp. 21–35. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.013.
- Ferreira Tojais, N. *et al.* (2014) 'Frizzled7 controls vascular permeability through the Wnt-canonical pathway and cross-talk with endothelial cell junction complexes', *Cardiovascular Research*, 103(2), pp. 291–303. doi: 10.1093/cvr/cvu133.
- Ferro, A. *et al.* (1999) 'Activation of nitric oxide synthase by beta 2-adrenoceptors in human umbilical vein endothelium in vitro', *British Journal of Pharmacology*, 126(8), pp. 1872–1880. doi: 10.1038/sj.bjp.0702512.
- Franco, C. A. *et al.* (2015) 'Dynamic Endothelial Cell Rearrangements Drive Developmental Vessel Regression', *PLoS Biology*, 13(4), p. e1002125. doi: 10.1371/journal.pbio.1002125.
- Franco, C. A. *et al.* (2016) 'Non-canonical Wnt signalling modulates the endothelial shear stress flow sensor in vascular remodelling', *eLife*. Edited by E. Paluch, 5, p. e07727. doi: 10.7554/eLife.07727.
- Franssen, C. *et al.* (2016) 'Myocardial Microvascular Inflammatory Endothelial Activation in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction', *JACC: Heart Failure*, 4(4), pp. 312–324. doi: 10.1016/j.jchf.2015.10.007.
- Franzin-Garrec, M. (2013) 'Une maladie chronique en augmentation alarmante', [/data/revues/00380814/v58i774/S0038081413000650/](https://www.em-consulte.com/en/article/800331). Available at: <https://www.em-consulte.com/en/article/800331> (Accessed: 1 April 2020).
- From, A. M. and Borlaug, B. A. (2011) 'Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: Pathophysiology and Emerging Therapies', *Cardiovascular Therapeutics*, 29(4), pp. e6–e21. doi: 10.1111/j.1755-5922.2010.00133.x.
- Fujita, S. and Endoh, M. (1999) 'Influence of a Na⁺-H⁺ exchange inhibitor ethylisopropylamiloride, a Na⁺-Ca²⁺ exchange inhibitor KB-R7943 and their combination on the increases in contractility and Ca²⁺ transient induced by angiotensin II in isolated adult rabbit ventricular myocytes', *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 360(5), pp. 575–584. doi: 10.1007/s002109900123.
- Gabbiani, G., Ryan, G. B. and Majne, G. (1971) 'Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction', *Experientia*, 27(5), pp. 549–550. doi: 10.1007/bf02147594.
- Gao, C. and Chen, Y.-G. (2010) 'Dishevelled: The hub of Wnt signaling', *Cellular Signalling*, 22(5), pp. 717–727. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.11.021.
- Gavard, J. (2014) 'Endothelial permeability and VE-cadherin', *Cell Adhesion & Migration*, 8(2), pp. 158–164. doi: 10.4161/cam.29026.
- Gavard, J. and Gutkind, J. S. (2008) 'VE-cadherin and claudin-5: it takes two to tango', *Nature Cell Biology*, 10(8), pp. 883–885. doi: 10.1038/ncb0808-883.

Gevaert, A. B. *et al.* (2017) 'Endothelial Senescence Contributes to Heart Failure With Preserved Ejection Fraction in an Aging Mouse Model', *Circulation. Heart Failure*, 10(6). doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.116.003806.

Giordano, F. J. *et al.* (2001) 'A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10), pp. 5780–5785. doi: 10.1073/pnas.091415198.

Gladden, J. D., Linke, W. A. and Redfield, M. M. (2014) 'Heart failure with preserved ejection fraction', *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 466(6), pp. 1037–1053. doi: 10.1007/s00424-014-1480-8.

Glezeva, N. *et al.* (2015) 'Exaggerated Inflammation and Monocytosis Associate With Diastolic Dysfunction in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Evidence of M2 Macrophage Activation in Disease Pathogenesis', *Journal of Cardiac Failure*, 21(2), pp. 167–177. doi: 10.1016/j.cardfail.2014.11.004.

Glezeva, N. and Baugh, J. A. (2014) 'Role of inflammation in the pathogenesis of heart failure with preserved ejection fraction and its potential as a therapeutic target', *Heart Failure Reviews*, 19(5), pp. 681–694. doi: 10.1007/s10741-013-9405-8.

Goddard, L. M. *et al.* (2017) 'Hemodynamic Forces Sculpt Developing Heart Valves through a KLF2-WNT9B Paracrine Signaling Axis', *Developmental Cell*, 43(3), pp. 274–289.e5. doi: 10.1016/j.devcel.2017.09.023.

Goddard, L. M. and Iruela-Arispe, M. L. (2013) 'Cellular and molecular regulation of vascular permeability', *Thrombosis and Haemostasis*, 109(3), pp. 407–415. doi: 10.1160/TH12-09-0678.

Gomolak, J. R. and Didion, S. P. (2014) 'Angiotensin II-induced endothelial dysfunction is temporally linked with increases in interleukin-6 and vascular macrophage accumulation', *Frontiers in Physiology*, 5. doi: 10.3389/fphys.2014.00396.

González Arantxa *et al.* (2010) 'Filling Pressures and Collagen Metabolism in Hypertensive Patients With Heart Failure and Normal Ejection Fraction', *Hypertension*, 55(6), pp. 1418–1424. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.149112.

Goto, H. *et al.* (2007) 'Neurotoxic effects of exogenous recombinant tissue-type plasminogen activator on the normal rat brain', *Journal of Neurotrauma*, 24(4), pp. 745–752. doi: 10.1089/neu.2006.0183.

Gottdiener, J. S. (2002) 'Outcome of Congestive Heart Failure in Elderly Persons: Influence of Left Ventricular Systolic Function: The Cardiovascular Health Study', *Annals of Internal Medicine*, 137(8), p. 631. doi: 10.7326/0003-4819-137-8-200210150-00006.

Gourdie, R. G. *et al.* (1993) 'The spatial distribution and relative abundance of gap-junctional connexin40 and connexin43 correlate to functional properties of components of the cardiac atrioventricular conduction system', *Journal of Cell Science*, 105 (Pt 4), pp. 985–991.

- Green, K. J. and Simpson, C. L. (2007) 'Desmosomes: New Perspectives on a Classic', *Journal of Investigative Dermatology*, 127(11), pp. 2499–2515. doi: 10.1038/sj.jid.5701015.
- Grumolato, L. *et al.* (2010) 'Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors', *Genes & Development*, 24(22), pp. 2517–2530. doi: 10.1101/gad.1957710.
- Guazzi, M., Gombert-Maitland, M. and Arena, R. (2015) 'Pulmonary hypertension in heart failure with preserved ejection fraction', *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 34(3), pp. 273–281. doi: 10.1016/j.healun.2014.11.003.
- Guzik, T. J. *et al.* (2002) 'Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase', *Circulation*, 105(14), pp. 1656–1662. doi: 10.1161/01.cir.0000012748.58444.08.
- Ha, N.-C. *et al.* (2004) 'Mechanism of Phosphorylation-Dependent Binding of APC to β -Catenin and Its Role in β -Catenin Degradation', *Molecular Cell*, 15(4), pp. 511–521. doi: 10.1016/j.molcel.2004.08.010.
- Haass, M. *et al.* (2011) 'Body mass index and adverse cardiovascular outcomes in heart failure patients with preserved ejection fraction: results from the Irbesartan in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction (I-PRESERVE) trial', *Circulation. Heart Failure*, 4(3), pp. 324–331. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.959890.
- Habas, R., Dawid, I. B. and He, X. (2003) 'Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation', *Genes & Development*, 17(2), pp. 295–309. doi: 10.1101/gad.1022203.
- Habas, R., Kato, Y. and He, X. (2001) 'Wnt/Frizzled Activation of Rho Regulates Vertebrate Gastrulation and Requires a Novel Formin Homology Protein Daam1', *Cell*, 107(7), pp. 843–854. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00614-6.
- Hamdani, N., Herwig, M. and Linke, W. A. (2017) 'Tampering with springs: phosphorylation of titin affecting the mechanical function of cardiomyocytes', *Biophysical Reviews*, 9(3), pp. 225–237. doi: 10.1007/s12551-017-0263-9.
- Hamilos, M., Petousis, S. and Parthenakis, F. (2018) 'Interaction between platelets and endothelium: from pathophysiology to new therapeutic options', *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*, 8(5), pp. 568–580. doi: 10.21037/cdt.2018.07.01.
- Hammes, H.-P. *et al.* (2002) 'Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy', *Diabetes*, 51(10), pp. 3107–3112. doi: 10.2337/diabetes.51.10.3107.
- Harrison, D. G. *et al.* (2011) 'Inflammation, Immunity and Hypertension', *Hypertension*, 57(2), pp. 132–140. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.163576.
- Hart, M. *et al.* (1998) 'Downregulation of β -catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, β -catenin and GSK3 β ', *Current Biology - CURR BIOL*, 8, pp. 573–581. doi: 10.1016/S0960-9822(98)70226-X.

- He, T. C. *et al.* (1998) 'Identification of c-MYC as a target of the APC pathway', *Science (New York, N.Y.)*, 281(5382), pp. 1509–1512. doi: 10.1126/science.281.5382.1509.
- van Heerebeek, L. *et al.* (2012) 'Low Myocardial Protein Kinase G Activity in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction', *Circulation*, 126(7), pp. 830–839. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.076075.
- Hellström, M. *et al.* (2001) 'Lack of Pericytes Leads to Endothelial Hyperplasia and Abnormal Vascular Morphogenesis', *Journal of Cell Biology*, 153(3), pp. 543–554. doi: 10.1083/jcb.153.3.543.
- Henri, O. *et al.* (2016) 'Selective Stimulation of Cardiac Lymphangiogenesis Reduces Myocardial Edema and Fibrosis Leading to Improved Cardiac Function Following Myocardial Infarction', *Circulation*, 133(15), pp. 1484–1497; discussion 1497. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020143.
- Herrera, M. D. *et al.* (2010) 'Endothelial dysfunction and aging: an update', *Ageing Research Reviews*, 9(2), pp. 142–152. doi: 10.1016/j.arr.2009.07.002.
- Heydemann, A. (2016) *An Overview of Murine High Fat Diet as a Model for Type 2 Diabetes Mellitus*, *Journal of Diabetes Research*. Hindawi. doi: <https://doi.org/10.1155/2016/2902351>.
- Hikasa, H. and Sokol, S. Y. (2013) 'Wnt Signaling in Vertebrate Axis Specification', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(1). doi: 10.1101/cshperspect.a007955.
- Hikita, T. *et al.* (2018) 'PAR-3 controls endothelial planar polarity and vascular inflammation under laminar flow', *EMBO reports*, 19(9). doi: 10.15252/embr.201745253.
- Hodge, R. G. and Ridley, A. J. (2016) 'Regulating Rho GTPases and their regulators', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(8), pp. 496–510. doi: 10.1038/nrm.2016.67.
- Holmes, C. L., Landry, D. W. and Granton, J. T. (2004) 'Science Review: Vasopressin and the cardiovascular system part 2 – clinical physiology', *Critical Care*, 8(1), pp. 15–23. doi: 10.1186/cc2338.
- Horwich, T. B. and Fonarow, G. C. (2010) 'Glucose, obesity, metabolic syndrome, and diabetes relevance to incidence of heart failure', *Journal of the American College of Cardiology*, 55(4), pp. 283–293. doi: 10.1016/j.jacc.2009.07.029.
- Howard, P. A. (2015) 'Treating Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: A Challenge for Clinicians', *Hospital Pharmacy*, 50(6), pp. 454–459. doi: 10.1310/hpj5006-454.
- Howarth, F. C. *et al.* (2005) 'The progressive effects of a fat enriched diet on ventricular myocyte contraction and intracellular Ca²⁺ in the C57BL/6J mouse', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 273(1), pp. 87–95. doi: 10.1007/s11010-005-7758-6.

- Hsieh, P. C. H. *et al.* (2006) 'Endothelial-Cardiomyocyte Interactions in Cardiac Development and Repair', *Annual review of physiology*, 68, pp. 51–66. doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040104.124629.
- Hu, G. *et al.* (2008) 'Intercellular adhesion molecule-1-dependent neutrophil adhesion to endothelial cells induces caveolae-mediated pulmonary vascular hyperpermeability', *Circulation Research*, 102(12), pp. e120-131. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.167486.
- Hulsmans, M. *et al.* (2017) 'Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart', *Cell*, 169(3), pp. 510-522.e20. doi: 10.1016/j.cell.2017.03.050.
- Hulsmans, M. *et al.* (2018) 'Cardiac macrophages promote diastolic dysfunction', *Journal of Experimental Medicine*, 215(2), pp. 423–440. doi: 10.1084/jem.20171274.
- Huveneers, S., Daemen, M. J. A. P. and Hordijk, P. L. (2015) 'Between Rho(k) and a hard place: the relation between vessel wall stiffness, endothelial contractility, and cardiovascular disease', *Circulation Research*, 116(5), pp. 895–908. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305720.
- Hynes, R. O. (2009) 'The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils', *Science*, 326(5957), pp. 1216–1219. doi: 10.1126/science.1176009.
- Ikenouchi, H. *et al.* (1994) 'Effects of angiotensin II on intracellular Ca²⁺ and pH in isolated beating rabbit hearts and myocytes loaded with the indicator indo-1.', *The Journal of Physiology*, 480(Pt 2), pp. 203–215.
- Incalza, M. A. *et al.* (2018) 'Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases', *Vascular Pharmacology*, 100, pp. 1–19. doi: 10.1016/j.vph.2017.05.005.
- Janssen-Heininger, Y. M. W. *et al.* (2008) 'REDOX-BASED REGULATION OF SIGNAL TRANSDUCTION: PRINCIPLES, PITFALLS, AND PROMISES', *Free radical biology & medicine*, 45(1), pp. 1–17. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.011.
- Jennings, B. H. and Ish-Horowicz, D. (2008) 'The Groucho/TLE/Grg family of transcriptional co-repressors', *Genome Biology*, 9(1), p. 205. doi: 10.1186/gb-2008-9-1-205.
- Jia, G., DeMarco, V. G. and Sowers, J. R. (2016) 'Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy', *Nature reviews. Endocrinology*, 12(3), pp. 144–153. doi: 10.1038/nrendo.2015.216.
- Kanisicak, O. *et al.* (2016) 'Genetic lineage tracing defines myofibroblast origin and function in the injured heart', *Nature Communications*, 7, p. 12260. doi: 10.1038/ncomms12260.
- Kannel, W. B., Hjortland, M. and Castelli, W. P. (1974) 'Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study', *The American Journal of Cardiology*, 34(1), pp. 29–34. doi: 10.1016/0002-9149(74)90089-7.

- Kasner, M. *et al.* (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(8), pp. 977–985. doi: 10.1016/j.jacc.2010.10.024.
- Katz Stuart D. *et al.* (2005) 'Vascular Endothelial Dysfunction and Mortality Risk in Patients With Chronic Heart Failure', *Circulation*, 111(3), pp. 310–314. doi: 10.1161/01.CIR.0000153349.77489.CF.
- Khatibzadeh, S. *et al.* (2013) 'Worldwide risk factors for heart failure: a systematic review and pooled analysis', *International journal of cardiology*, 168(2), pp. 1186–1194. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.11.065.
- Kniesel, U., Risau, W. and Wolburg, H. (1996) 'Development of blood-brain barrier tight junctions in the rat cortex', *Developmental Brain Research*, 96(1–2), pp. 229–240. doi: 10.1016/0165-3806(96)00117-4.
- KOMAJDA, (M.) *et al.* (2013) 'Parcours de soins : Insuffisance cardiaque. Encore trop d'hospitalisations pourtant évitables.', *Parcours de soins : Insuffisance cardiaque. Encore trop d'hospitalisations pourtant évitables.*
- Kontrogianni-Konstantopoulos, A. *et al.* (2009) 'Muscle giants: molecular scaffolds in sarcomerogenesis', *Physiological Reviews*, 89(4), pp. 1217–1267. doi: 10.1152/physrev.00017.2009.
- Kopp, W. (2019) 'How Western Diet And Lifestyle Drive The Pandemic Of Obesity And Civilization Diseases', *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 12, pp. 2221–2236. doi: 10.2147/DMSO.S216791.
- Kötter, S. *et al.* (2013) 'Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts', *Cardiovascular Research*, 99(4), pp. 648–656. doi: 10.1093/cvr/cvt144.
- Krüger, M. *et al.* (2009) 'Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs', *BMC Pharmacology*, 9(Suppl 1), p. P37. doi: 10.1186/1471-2210-9-S1-P37.
- Lahtinen, U. *et al.* (2003) 'Involvement of caveolin-2 in caveolar biogenesis in MDCK cells', *FEBS letters*, 538(1–3), pp. 85–88. doi: 10.1016/s0014-5793(03)00135-2.
- Laine, G. A. and Allen, S. J. (1991) 'Left ventricular myocardial edema. Lymph flow, interstitial fibrosis, and cardiac function', *Circulation Research*, 68(6), pp. 1713–1721. doi: 10.1161/01.res.68.6.1713.
- Lakatta, E. G. and Levy, D. (2003) 'Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease', *Circulation*, 107(2), pp. 346–354. doi: 10.1161/01.cir.0000048893.62841.f7.
- Lang, R. E. *et al.* (1985) 'Atrial natriuretic factor--a circulating hormone stimulated by volume loading', *Nature*, 314(6008), pp. 264–266. doi: 10.1038/314264a0.

- Lee, D. S. *et al.* (2009) 'Relation of disease pathogenesis and risk factors to heart failure with preserved or reduced ejection fraction: insights from the framingham heart study of the national heart, lung, and blood institute', *Circulation*, 119(24), pp. 3070–3077. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.815944.
- Lee, E. *et al.* (2003) 'The Roles of APC and Axin Derived from Experimental and Theoretical Analysis of the Wnt Pathway', *PLOS Biology*, 1(1), p. e10. doi: 10.1371/journal.pbio.0000010.
- Lewington, S. *et al.* (2002) 'Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies', *Lancet (London, England)*, 360(9349), pp. 1903–1913. doi: 10.1016/s0140-6736(02)11911-8.
- Li, L. *et al.* (2018) 'SOX17 restrains proliferation and tumor formation by down-regulating activity of the Wnt/ β -catenin signaling pathway via trans-suppressing β -catenin in cervical cancer', *Cell Death & Disease*, 9(7), pp. 1–16. doi: 10.1038/s41419-018-0782-8.
- Li, S. *et al.* (1998) 'Mutational analysis of caveolin-induced vesicle formation. Expression of caveolin-1 recruits caveolin-2 to caveolae membranes', *FEBS letters*, 434(1–2), pp. 127–134. doi: 10.1016/s0014-5793(98)00945-4.
- Li, T. *et al.* (2017) 'The Ubiquitin E3 Ligase TRAF6 Exacerbates Ischemic Stroke by Ubiquitinating and Activating Rac1', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 37(50), pp. 12123–12140. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1751-17.2017.
- Lijnen, P. J., Petrov, V. V. and Fagard, R. H. (2000) 'Induction of Cardiac Fibrosis by Transforming Growth Factor- β 1', *Molecular Genetics and Metabolism*, 71(1), pp. 418–435. doi: 10.1006/mgme.2000.3032.
- Linke, W. A. and Hamdani, N. (2014) 'Gigantic business: titin properties and function through thick and thin', *Circulation Research*, 114(6), pp. 1052–1068. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.301286.
- Liu, X., Rubin, J. S. and Kimmel, A. R. (2005) 'Rapid, Wnt-Induced Changes in GSK3 β Associations that Regulate β -Catenin Stabilization Are Mediated by α Proteins', *Current Biology*, 15(22), pp. 1989–1997. doi: 10.1016/j.cub.2005.10.050.
- Logeart, D. *et al.* (2013) 'Current aspects of the spectrum of acute heart failure syndromes in a real-life setting: the OFICA study', *European Journal of Heart Failure*, 15(4), pp. 465–476. doi: 10.1093/eurjhf/hfs189.
- Lorell, B. H. and Carabello, B. A. (2000) 'Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis', *Circulation*, 102(4), pp. 470–479. doi: 10.1161/01.cir.102.4.470.
- Lu, W. *et al.* (2004) 'Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth', *Cell*, 119(1), pp. 97–108. doi: 10.1016/j.cell.2004.09.019.

- Lu, X. *et al.* (2004) 'PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates', *Nature*, 430(6995), pp. 93–98. doi: 10.1038/nature02677.
- Luo, Y. and Radice, G. L. (2003) 'Cadherin-mediated adhesion is essential for myofibril continuity across the plasma membrane but not for assembly of the contractile apparatus', *Journal of Cell Science*, 116(Pt 8), pp. 1471–1479. doi: 10.1242/jcs.00339.
- Ma, Y. *et al.* (2015) 'Deriving a cardiac ageing signature to reveal MMP-9-dependent inflammatory signalling in senescence', *Cardiovascular Research*, 106(3), pp. 421–431. doi: 10.1093/cvr/cvv128.
- Ma, Y., Mouton, A. J. and Lindsey, M. L. (2018) 'Cardiac macrophage biology in the steady-state heart, the aging heart, and following myocardial infarction', *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 191, pp. 15–28. doi: 10.1016/j.trsl.2017.10.001.
- Macara, I. G. (2004) 'Par Proteins: Partners in Polarization', *Current Biology*, 14(4), pp. R160–R162. doi: 10.1016/j.cub.2004.01.048.
- MacDonald, B. T., Tamai, K. and He, X. (2009) 'Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases', *Developmental cell*, 17(1), pp. 9–26. doi: 10.1016/j.devcel.2009.06.016.
- Mao, J. *et al.* (2001) 'Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-5 Binds to Axin and Regulates the Canonical Wnt Signaling Pathway', *Molecular Cell*, 7(4), pp. 801–809. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00224-6.
- Markovič, R. *et al.* (2017) 'Planar cell polarity genes frizzled4 and frizzled6 exert patterning influence on arterial vessel morphogenesis', *PLoS ONE*, 12(3). doi: 10.1371/journal.pone.0171033.
- McCue Shannon *et al.* (2006) 'Shear Stress Regulates Forward and Reverse Planar Cell Polarity of Vascular Endothelium In Vivo and In Vitro', *Circulation Research*, 98(7), pp. 939–946. doi: 10.1161/01.RES.0000216595.15868.55.
- McGrath, M. F., de Bold, M. L. K. and de Bold, A. J. (2005) 'The endocrine function of the heart', *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 16(10), pp. 469–477. doi: 10.1016/j.tem.2005.10.007.
- Medzhitov, R. (2010) 'Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame', *Cell*, 140(6), pp. 771–776. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.006.
- Meng, Q. *et al.* (2017) 'Development of a Mouse Model of Metabolic Syndrome, Pulmonary Hypertension, and Heart Failure with Preserved Ejection Fraction', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 56(4), pp. 497–505. doi: 10.1165/rcmb.2016-0177OC.
- Meyer, D. and Birchmeier, C. (1995) 'Multiple essential functions of neuregulin in development', *Nature*, 378(6555), pp. 386–390. doi: 10.1038/378386a0.

- Meyer-Schwesinger, C. (2019) 'The ubiquitin-proteasome system in kidney physiology and disease', *Nature Reviews. Nephrology*, 15(7), pp. 393–411. doi: 10.1038/s41581-019-0148-1.
- Mezzano, V., Pellman, J. and Sheikh, F. (2014) 'Cell Junctions in the Specialized Conduction System of the Heart', *Cell communication & adhesion*, 21(3), pp. 149–159. doi: 10.3109/15419061.2014.905928.
- Minamino, N. *et al.* (1988) 'The presence of brain natriuretic peptide of 12,000 daltons in porcine heart', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 155(2), pp. 740–746. doi: 10.1016/s0006-291x(88)80557-6.
- Mohammed, S. F. *et al.* (2015a) 'Coronary Microvascular Rarefaction and Myocardial Fibrosis in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction', *Circulation*, 131(6), pp. 550–559. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.009625.
- Mohammed, S. F. *et al.* (2015b) 'Coronary Microvascular Rarefaction and Myocardial Fibrosis in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction', *Circulation*, 131(6), pp. 550–559. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.009625.
- Mohammed, S. F., Majure, D. T. and Redfield, M. M. (2016) 'Zooming in on the Microvasculature in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction', *Circulation. Heart failure*, 9(7). doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.116.003272.
- Moravec, C. S. *et al.* (1989) 'Endothelin is a positive inotropic agent in human and rat heart in vitro', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 159(1), pp. 14–18. doi: 10.1016/0006-291x(89)92397-8.
- Murdoch, C. E. *et al.* (2014) 'Endothelial NADPH oxidase-2 promotes interstitial cardiac fibrosis and diastolic dysfunction through proinflammatory effects and endothelial-mesenchymal transition', *Journal of the American College of Cardiology*, 63(24), pp. 2734–2741. doi: 10.1016/j.jacc.2014.02.572.
- Myagmar, B.-E. *et al.* (2017) 'Adrenergic Receptors in Individual Ventricular Myocytes: The Beta-1 and Alpha-1B Are in All Cells, the Alpha-1A Is in a Subpopulation, and the Beta-2 and Beta-3 Are Mostly Absent', *Circulation research*, 120(7), pp. 1103–1115. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310520.
- Nabel, E. G. and Braunwald, E. (2012) 'A Tale of Coronary Artery Disease and Myocardial Infarction', *New England Journal of Medicine*, 366(1), pp. 54–63. doi: 10.1056/NEJMra1112570.
- Nagy, A. (2000) 'Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring', *genesis*, 26(2), pp. 99–109. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-968X\(200002\)26:2<99::AID-GENE1>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-968X(200002)26:2<99::AID-GENE1>3.0.CO;2-B).
- Nahirney, P. C., Reeson, P. and Brown, C. E. (2016) 'Ultrastructural analysis of blood–brain barrier breakdown in the peri-infarct zone in young adult and aged mice', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 36(2), pp. 413–425. doi: 10.1177/0271678X15608396.

- Narmoneva, D. A. *et al.* (2004) 'Endothelial Cells Promote Cardiac Myocyte Survival and Spatial Reorganization', *Circulation*, 110(8), pp. 962–968. doi: 10.1161/01.CIR.0000140667.37070.07.
- Nelson, W. J. and Nusse, R. (2004) 'Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways', *Science (New York, N.Y.)*, 303(5663), pp. 1483–1487. doi: 10.1126/science.1094291.
- Nishita, M. *et al.* (2006) 'Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase Ror2 is required for Wnt5a-induced cell migration', *The Journal of Cell Biology*, 175(4), pp. 555–562. doi: 10.1083/jcb.200607127.
- Nitti, M. D. *et al.* (2016) 'Obesity-induced lymphatic dysfunction is reversible with weight loss', *The Journal of Physiology*, 594(23), pp. 7073–7087. doi: 10.1113/JP273061.
- Nomachi, A. *et al.* (2008) 'Receptor tyrosine kinase Ror2 mediates Wnt5a-induced polarized cell migration by activating c-Jun N-terminal kinase via actin-binding protein filamin A', *The Journal of Biological Chemistry*, 283(41), pp. 27973–27981. doi: 10.1074/jbc.M802325200.
- Oh, P. *et al.* (2007) 'Live dynamic imaging of caveolae pumping targeted antibody rapidly and specifically across endothelium in the lung', *Nature Biotechnology*, 25(3), pp. 327–337. doi: 10.1038/nbt1292.
- Oikonomou, E. *et al.* (2018) 'Western Dietary Pattern Is Associated With Severe Coronary Artery Disease', *Angiology*, 69(4), pp. 339–346. doi: 10.1177/0003319717721603.
- Owan, T. E. *et al.* (2006) 'Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction', *The New England Journal of Medicine*, 355(3), pp. 251–259. doi: 10.1056/NEJMoa052256.
- Parton, R. G. and Simons, K. (2007) 'The multiple faces of caveolae', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(3), pp. 185–194. doi: 10.1038/nrm2122.
- 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', *Journal of the American College of Cardiology*, 62(4), pp. 263–271. doi: 10.1016/j.jacc.2013.02.092.
- Payne, S., De Val, S. and Neal, A. (2018) 'Endothelial-Specific Cre Mouse Models', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38(11), pp. 2550–2561. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.309669.
- Penicka, M. *et al.* (2010) 'Heart Failure With Preserved Ejection Fraction in Outpatients With Unexplained Dyspnea', *Journal of the American College of Cardiology*, 55(16), pp. 1701–1710. doi: 10.1016/j.jacc.2009.11.076.
- Pereira, L. *et al.* (2017) ' β -Adrenergic induced SR Ca²⁺ leak is mediated by an Epac-NOS pathway', *Journal of molecular and cellular cardiology*, 108, pp. 8–16. doi: 10.1016/j.yjmcc.2017.04.005.

Pereira, S. S. and Alvarez-Leite, J. I. (2014) 'Low-Grade Inflammation, Obesity, and Diabetes', *Current Obesity Reports*, 3(4), pp. 422–431. doi: 10.1007/s13679-014-0124-9.

Perrine, A.-L. *et al.* (2018) Article - *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*. Available at: http://beh.santepubliquefrance.fr/beh/2018/10/2018_10_1.html (Accessed: 6 April 2020).

Pieske, B. *et al.* (2014) 'Rationale and design of the SOLuble guanylate Cyclase stimulator in heArT failurE Studies (SOCRATES)', *European Journal of Heart Failure*, 16(9), pp. 1026–1038. doi: 10.1002/ejhf.135.

Pieske, B. *et al.* (2019) 'How to diagnose heart failure with preserved ejection fraction: the HFA–PEFF diagnostic algorithm: a consensus recommendation from the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC)', *European Heart Journal*, 40(40), pp. 3297–3317. doi: 10.1093/eurheartj/ehz641.

Pinto, A. R. *et al.* (2012) 'An abundant tissue macrophage population in the adult murine heart with a distinct alternatively-activated macrophage profile', *PloS One*, 7(5), p. e36814. doi: 10.1371/journal.pone.0036814.

Ponikowski, P. *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', *European Heart Journal*, 37(27), pp. 2129–2200. doi: 10.1093/eurheartj/ehw128.

Primessnig, U. *et al.* (2016) 'Novel pathomechanisms of cardiomyocyte dysfunction in a model of heart failure with preserved ejection fraction', *European Journal of Heart Failure*, 18(8), pp. 987–997. doi: 10.1002/ejhf.524.

Pronk, M. C. A. *et al.* (2019) 'FBXW7 regulates endothelial barrier function by suppression of the cholesterol synthesis pathway and prenylation of RhoB', *Molecular Biology of the Cell*, 30(5), pp. 607–621. doi: 10.1091/mbc.E18-04-0259.

Pronobis, M. I., Rusan, N. M. and Peifer, M. (2015) 'A novel GSK3-regulated APC:Axin interaction regulates Wnt signaling by driving a catalytic cycle of efficient β catenin destruction', *eLife*, 4, p. e08022. doi: 10.7554/eLife.08022.

Rajagopal, S. and Shenoy, S. K. (2018) 'GPCR Desensitization: Acute and Prolonged Phases', *Cellular signalling*, 41, pp. 9–16. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.01.024.

Rannikmäe, K. *et al.* (2015) 'Common variation in COL4A1/COL4A2 is associated with sporadic cerebral small vessel disease', *Neurology*, 84(9), pp. 918–926. doi: 10.1212/WNL.0000000000001309.

Rao, Z. *et al.* (2019) ' α -Klotho Expression in Mouse Tissues Following Acute Exhaustive Exercise', *Frontiers in Physiology*, 10. doi: 10.3389/fphys.2019.01498.

Rapsomaniki, E. *et al.* (2014) 'Blood pressure and incidence of twelve cardiovascular diseases: lifetime risks, healthy life-years lost, and age-specific associations in 1·25

million people', *Lancet (London, England)*, 383(9932), pp. 1899–1911. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60685-1.

Rasmusen, C., Cynober, L. and Couderc, R. (2005) '[Arginine and statins: relationship between the nitric oxide pathway and the atherosclerosis development]', *Annales De Biologie Clinique*, 63(5), pp. 443–455.

Razani, B. *et al.* (2001) 'Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(41), pp. 38121–38138. doi: 10.1074/jbc.M105408200.

Reis, M. and Liebner, S. (2013) 'Wnt signaling in the vasculature', *Experimental Cell Research*, 319(9), pp. 1317–1323. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.12.023.

Rho, S.-S., Ando, K. and Fukuhara, S. (2017) 'Dynamic Regulation of Vascular Permeability by Vascular Endothelial Cadherin-Mediated Endothelial Cell-Cell Junctions', *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku Zasshi*, 84(4), pp. 148–159. doi: 10.1272/jnms.84.148.

Rich, S. and McLaughlin, V. V. (2003) 'Endothelin receptor blockers in cardiovascular disease', *Circulation*, 108(18), pp. 2184–2190. doi: 10.1161/01.CIR.0000094397.19932.78.

Roberts, D. M. *et al.* (2011) 'Deconstructing the β catenin destruction complex: mechanistic roles for the tumor suppressor APC in regulating Wnt signaling', *Molecular Biology of the Cell*, 22(11), pp. 1845–1863. doi: 10.1091/mbc.E10-11-0871.

Rossitto Giacomo *et al.* (2020) 'Reduced Lymphatic Reserve in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction', *Journal of the American College of Cardiology*, 76(24), pp. 2817–2829. doi: 10.1016/j.jacc.2020.10.022.

Ruskoaho, H. (1992) 'Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism', *Pharmacological Reviews*, 44(4), pp. 479–602.

Russell, B., Motlagh, D. and Ashley, W. W. (2000) 'Form follows function: how muscle shape is regulated by work', *Journal of Applied Physiology*, 88(3), pp. 1127–1132. doi: 10.1152/jappl.2000.88.3.1127.

Samarzija, I. *et al.* (2009) 'Wnt3a regulates proliferation and migration of HUVEC via canonical and non-canonical Wnt signaling pathways', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 386(3), pp. 449–454. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.06.033.

Sarrazy, V. *et al.* (2011) 'Mechanisms of pathological scarring: Role of myofibroblasts and current developments', *Wound Repair and Regeneration*, 19(s1), pp. s10–s15. doi: 10.1111/j.1524-475X.2011.00708.x.

Sasai, N. *et al.* (2004) 'The neurotrophin-receptor-related protein NRH1 is essential for convergent extension movements', *Nature Cell Biology*, 6(8), pp. 741–748. doi: 10.1038/ncb1158.

- Sato, A. *et al.* (2006) 'Profilin is an effector for Daam1 in non-canonical Wnt signaling and is required for vertebrate gastrulation', *Development (Cambridge, England)*, 133(21), pp. 4219–4231. doi: 10.1242/dev.02590.
- Schiattarella, G. G. *et al.* (2019) 'Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction', *Nature*, 568(7752), pp. 351–356. doi: 10.1038/s41586-019-1100-z.
- Schulz, E. *et al.* (2008) 'Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension', *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(6), pp. 1115–1126. doi: 10.1089/ars.2007.1989.
- Schwarz-Romond, T., Metcalfe, C. and Bienz, M. (2007) 'Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies', *Journal of Cell Science*, 120(Pt 14), pp. 2402–2412. doi: 10.1242/jcs.002956.
- Scridon, A., Șerban, R. C. and Chevalier, P. (2018) 'Atrial fibrillation: Neurogenic or myogenic?', *Archives of Cardiovascular Diseases*, 111(1), pp. 59–69. doi: 10.1016/j.acvd.2017.11.001.
- Segers, V. F. M., Brutsaert, D. L. and De Keulenaer, G. W. (2018) 'Cardiac Remodeling: Endothelial Cells Have More to Say Than Just NO', *Frontiers in Physiology*, 9. doi: 10.3389/fphys.2018.00382.
- Selby, D. E. *et al.* (2011) 'Tachycardia-induced diastolic dysfunction and resting tone in myocardium from patients with a normal ejection fraction', *Journal of the American College of Cardiology*, 58(2), pp. 147–154. doi: 10.1016/j.jacc.2010.10.069.
- Sewduth, R. N. *et al.* (2017) 'PDZRN3 destabilizes endothelial cell-cell junctions through a PKC ζ -containing polarity complex to increase vascular permeability', *Science Signaling*, 10(464), p. eaag3209. doi: 10.1126/scisignal.aag3209.
- Shah, A. M. (2013) 'Ventricular Remodeling in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction', *Current heart failure reports*, 10(4), pp. 341–349. doi: 10.1007/s11897-013-0166-4.
- Shin, E. S., Sorenson, C. M. and Sheibani, N. (2014) 'Diabetes and retinal vascular dysfunction', *Journal of Ophthalmic & Vision Research*, 9(3), pp. 362–373. doi: 10.4103/2008-322X.143378.
- Simmonds, S. J. *et al.* (2020) 'Cellular and Molecular Differences between HFpEF and HFrEF: A Step Ahead in an Improved Pathological Understanding', *Cells*, 9(1). doi: 10.3390/cells9010242.
- Simonovic, D. *et al.* (2018) 'Exercise elicits dynamic changes in extravascular lung water and haemodynamic congestion in heart failure patients with preserved ejection fraction', *European Journal of Heart Failure*, 20(9), pp. 1366–1369. doi: 10.1002/ejhf.1228.
- Siperstein, M. D., Unger, R. H. and Madison, L. L. (1968) 'Studies of muscle capillary basement membranes in normal subjects, diabetic, and prediabetic patients', *Journal of Clinical Investigation*, 47(9), pp. 1973–1999.

- Skeberdis, V. A. (2004) 'Structure and function of beta3-adrenergic receptors', *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 40(5), pp. 407–413.
- Snider, P. *et al.* (2009) 'Origin of Cardiac Fibroblasts and the Role of Periostin', *Circulation research*, 105(10), pp. 934–947. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.201400.
- Souders, C. A., Bowers, S. L. K. and Baudino, T. A. (2009) 'Cardiac fibroblast: the renaissance cell', *Circulation Research*, 105(12), pp. 1164–1176. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.209809.
- Stamos, J. L. *et al.* (2014) 'Structural basis of GSK-3 inhibition by N-terminal phosphorylation and by the Wnt receptor LRP6', *eLife*, 3, p. e01998. doi: 10.7554/eLife.01998.
- Stamos, J. L. and Weis, W. I. (2013) 'The β -Catenin Destruction Complex', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(1), p. a007898. doi: 10.1101/cshperspect.a007898.
- Stapleton, P. A. *et al.* (2010) 'Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: interventional strategies', *Journal of Inflammation (London, England)*, 7, p. 54. doi: 10.1186/1476-9255-7-54.
- Steffen, A. *et al.* (2013) 'Rac function is crucial for cell migration but is not required for spreading and focal adhesion formation', *Journal of Cell Science*, 126(20), pp. 4572–4588. doi: 10.1242/jcs.118232.
- Strijdom, H., Chamane, N. and Lochner, A. (2009) 'Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions', *Cardiovascular Journal of Africa*, 20(5), pp. 303–310.
- Sutton, N. R., Baek, A. and Pinsky, D. J. (2014) 'Endothelial Cells and Inflammation', in Mackay, I. R. *et al.* (eds) *Encyclopedia of Medical Immunology*. New York, NY: Springer New York, pp. 367–381. doi: 10.1007/978-0-387-84828-0_184.
- Sweeney, M. D., Sagare, A. P. and Zlokovic, B. V. (2018) 'Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders', *Nature Reviews Neurology*, 14(3), pp. 133–150. doi: 10.1038/nrneuro.2017.188.
- Swirski, F. K., Robbins, C. S. and Nahrendorf, M. (2016) 'Development and Function of Arterial and Cardiac Macrophages', *Trends in Immunology*, 37(1), pp. 32–40. doi: 10.1016/j.it.2015.11.004.
- Taddei, A. *et al.* (2008) 'Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5', *Nature Cell Biology*, 10(8), pp. 923–934. doi: 10.1038/ncb1752.
- Taelman, V. F. *et al.* (2010) 'Wnt Signaling Requires Sequestration of Glycogen Synthase Kinase 3 inside Multivesicular Endosomes', *Cell*, 143(7), pp. 1136–1148. doi: 10.1016/j.cell.2010.11.034.
- Takimoto, E. (2012a) 'Cyclic GMP-Dependent Signaling in Cardiac Myocytes', *Circulation Journal*, 76(8), pp. 1819–1825. doi: 10.1253/circj.CJ-12-0664.

- Takimoto, E. (2012b) 'Cyclic GMP-Dependent Signaling in Cardiac Myocytes', *Circulation Journal*, 76(8), pp. 1819–1825. doi: 10.1253/circj.CJ-12-0664.
- Talman, V. and Kivelä, R. (2018) 'Cardiomyocyte—Endothelial Cell Interactions in Cardiac Remodeling and Regeneration', *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 5. doi: 10.3389/fcvm.2018.00101.
- Tang, E. H. C. and Vanhoutte, P. M. (2010) 'Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension?', *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 459(6), pp. 995–1004. doi: 10.1007/s00424-010-0786-4.
- Tang, Y. *et al.* (2009) 'The Application of Stereological Methods for Estimating Structural Parameters in the Human Heart', *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 292(10), pp. 1630–1647. doi: 10.1002/ar.20952.
- Tepass, U. (2012) 'The apical polarity protein network in Drosophila epithelial cells: regulation of polarity, junctions, morphogenesis, cell growth, and survival', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, pp. 655–685. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154033.
- Tetsu, O. and McCormick, F. (1999) 'β-Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells', *Nature*, 398(6726), pp. 422–426. doi: 10.1038/18884.
- Thakker, G. D. *et al.* (2008) 'Increased Myocardial Susceptibility to Repetitive Ischemia with High-Fat-Diet-Induced Obesity', *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 16(12), pp. 2593–2600. doi: 10.1038/oby.2008.414.
- Thorn, N. A. (1957) 'A DENSITOMETRIC METHOD FOR ASSAY OF SMALL AMOUNTS OF ANTIDIURETIC HORMONE', *Journal of Experimental Medicine*, 105(6), pp. 585–590. doi: 10.1084/jem.105.6.585.
- Tirziu, D., Giordano, F. J. and Simons, M. (2010) 'Cell communications in the heart', *Circulation*, 122(9), pp. 928–937. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.847731.
- Tran Khiem A. *et al.* (2016) 'Endothelial β-Catenin Signaling Is Required for Maintaining Adult Blood–Brain Barrier Integrity and Central Nervous System Homeostasis', *Circulation*, 133(2), pp. 177–186. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.015982.
- Traweger, A. *et al.* (2002) 'The Tight Junction-specific Protein Occludin Is a Functional Target of the E3 Ubiquitin-protein Ligase Itch', *Journal of Biological Chemistry*, 277(12), pp. 10201–10208. doi: 10.1074/jbc.M111384200.
- Trincot, C. E. *et al.* (2019) 'Adrenomedullin Induces Cardiac Lymphangiogenesis After Myocardial Infarction and Regulates Cardiac Edema Via Connexin 43', *Circulation Research*, 124(1), pp. 101–113. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313835.
- Trombitás, K. *et al.* (2000) 'Extensibility of isoforms of cardiac titin: variation in contour length of molecular subsegments provides a basis for cellular passive stiffness diversity.', *Biophysical Journal*, 79(6), pp. 3226–3234.

Tromp, J. *et al.* (2017) 'Biomarker Profiles in Heart Failure Patients With Preserved and Reduced Ejection Fraction', *Journal of the American Heart Association*, 6(4). doi: 10.1161/JAHA.116.003989.

Trouillet, A. *et al.* (2017) 'Col4a1 mutation generates vascular abnormalities correlated with neuronal damage in a mouse model of HANAC syndrome', *Neurobiology of Disease*, 100, pp. 52–61. doi: 10.1016/j.nbd.2016.12.014.

Tskhovrebova, L. *et al.* (1997) 'Elasticity and unfolding of single molecules of the giant muscle protein titin', *Nature*, 387(6630), pp. 308–312. doi: 10.1038/387308a0.

Upadhyia, B., Haykowsky, M. J., *et al.* (2015) 'Exercise intolerance in heart failure with preserved ejection fraction: more than a heart problem', *Journal of Geriatric Cardiology: JGC*, 12(3), pp. 294–304. doi: 10.11909/j.issn.1671-5411.2015.03.013.

Upadhyia, B., Taffet, G. E., *et al.* (2015) 'Heart failure with preserved ejection fraction in the elderly: scope of the problem', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 83, pp. 73–87. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.02.025.

Valenta, T., Hausmann, G. and Basler, K. (2012) 'The many faces and functions of β -catenin', *The EMBO Journal*, 31(12), pp. 2714–2736. doi: 10.1038/emboj.2012.150.

Valero-Muñoz, M., Backman, W. and Sam, F. (2017) 'Murine Models of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A "Fishing Expedition"', *JACC: Basic to Translational Science*, 2(6), pp. 770–789. doi: 10.1016/j.jacbts.2017.07.013.

Van Agtmael, T. *et al.* (2010) 'Col4a1 mutation in mice causes defects in vascular function and low blood pressure associated with reduced red blood cell volume', *Human Molecular Genetics*, 19(6), pp. 1119–1128. doi: 10.1093/hmg/ddp584.

van Heerebeek Loek *et al.* (2006) 'Myocardial Structure and Function Differ in Systolic and Diastolic Heart Failure', *Circulation*, 113(16), pp. 1966–1973. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.587519.

Vila Petroff, M. G. and Mattiazzi, A. R. (2001) 'Angiotensin II and cardiac excitation-contraction coupling: Questions and controversies', *Heart, Lung and Circulation*, 10(2), pp. 90–98. doi: 10.1046/j.1444-2892.2001.00083.x.

Walker, C. A. and Spinale, F. G. (1999) 'The structure and function of the cardiac myocyte: A review of fundamental concepts', *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 118(2), pp. 375–382. doi: 10.1016/S0022-5223(99)70233-3.

Wallingford, J. B. and Habas, R. (2005) 'The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity', *Development (Cambridge, England)*, 132(20), pp. 4421–4436. doi: 10.1242/dev.02068.

Wang, Y. *et al.* (2010) 'Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis', *Nature*, 465(7297), pp. 483–486. doi: 10.1038/nature09002.

Wang, Z., Liu, C.-H., Huang, S., Fu, Z., Tomita, Y., Britton, W. R., Cho, S. S., Chen, C. T., Sun, Y., Ma, J., *et al.* (2020) 'Wnt signaling activates MFSD2A to suppress

vascular endothelial transcytosis and maintain blood-retinal barrier', *Science Advances*, 6(35), p. eaba7457. doi: 10.1126/sciadv.aba7457.

Wang, Z., Liu, C.-H., Huang, S., Fu, Z., Tomita, Y., Britton, W. R., Cho, S. S., Chen, C. T., Sun, Y., Ma, J.-X., *et al.* (2020) 'Wnt signaling activates MFSD2A to suppress vascular endothelial transcytosis and maintain blood-retinal barrier', *Science Advances*, 6(35), p. eaba7457. doi: 10.1126/sciadv.aba7457.

Ward, N. L. *et al.* (2004) 'Angiopoietin 1 expression levels in the myocardium direct coronary vessel development', *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 229(3), pp. 500–509. doi: 10.1002/dvdy.10479.

Waschke, J. *et al.* (2006) 'Protein kinase C-mediated endothelial barrier regulation is caveolin-1-dependent', *Histochemistry and Cell Biology*, 126(1), pp. 17–26. doi: 10.1007/s00418-005-0140-7.

Weber, K. T. *et al.* (2013) 'Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart', *Nature Reviews. Cardiology*, 10(1), pp. 15–26. doi: 10.1038/nrcardio.2012.158.

Westermann, D. *et al.* (2011) 'Cardiac Inflammation Contributes to Changes in the Extracellular Matrix in Patients With Heart Failure and Normal Ejection Fraction', *Circulation: Heart Failure*, 4(1), pp. 44–52. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.931451.

Wilson, C. R. *et al.* (2007) 'Western diet, but not high fat diet, causes derangements of fatty acid metabolism and contractile dysfunction in the heart of Wistar rats', *Biochemical Journal*, 406(3), pp. 457–467. doi: 10.1042/BJ20070392.

Wong, H. C. *et al.* (2000) 'Structural basis of the recognition of the Dishevelled DEP domain in the Wnt signaling pathway', *Nature structural biology*, 7(12), pp. 1178–1184. doi: 10.1038/82047.

Woo, A. Y. *et al.* (2015) 'Biased β 2-adrenoceptor signalling in heart failure: pathophysiology and drug discovery', *British Journal of Pharmacology*, 172(23), pp. 5444–5456. doi: 10.1111/bph.12965.

Woods, R. L. (2004) 'Cardioprotective functions of atrial natriuretic peptide and B-type natriuretic peptide: a brief review', *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 31(11), pp. 791–794. doi: 10.1111/j.0305-1870.2004.04073.x.

Zahabi, A. *et al.* (2003) 'Expression of constitutively active guanylate cyclase in cardiomyocytes inhibits the hypertrophic effects of isoproterenol and aortic constriction on mouse hearts', *The Journal of Biological Chemistry*, 278(48), pp. 47694–47699. doi: 10.1074/jbc.M309661200.

Zawieja, S. D. *et al.* (2016) 'Macrophage alterations within the mesenteric lymphatic tissue are associated with impairment of lymphatic pump in metabolic syndrome', *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)*, 23(7), pp. 558–570. doi: 10.1111/micc.12307.

Zentilin, L. *et al.* (2010) 'Cardiomyocyte VEGFR-1 activation by VEGF-B induces compensatory hypertrophy and preserves cardiac function after myocardial infarction',

FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 24(5), pp. 1467–1478. doi: 10.1096/fj.09-143180.

Zhang, B. *et al.* (2015) 'Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes enhance angiogenesis through the Wnt4/ β -catenin pathway', *Stem Cells Translational Medicine*, 4(5), pp. 513–522. doi: 10.5966/sctm.2014-0267.

Zhang, P., Su, J. and Mende, U. (2012) 'Cross talk between cardiac myocytes and fibroblasts: from multiscale investigative approaches to mechanisms and functional consequences', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 303(12), pp. H1385–H1396. doi: 10.1152/ajpheart.01167.2011.

Zhao, J. *et al.* (2013) 'SCF E3 ligase F-box protein complex SCF(FBXL19) regulates cell migration by mediating Rac1 ubiquitination and degradation', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(7), pp. 2611–2619. doi: 10.1096/fj.12-223099.

Zhao, Z. *et al.* (2015) 'Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier', *Cell*, 163(5), pp. 1064–1078. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.067.

Zhou, P. and Pu, W. T. (2016) 'Recounting cardiac cellular composition', *Circulation research*, 118(3), pp. 368–370. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308139.

Zile, M. R. *et al.* (2015) 'Myocardial stiffness in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: contributions of collagen and titin', *Circulation*, 131(14), pp. 1247–1259. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013215.

Zolk, O. and Böhm, M. (2000) 'The role of the cardiac endothelin system in heart failure', *Nephrology Dialysis Transplantation*, 15(6), pp. 758–760. doi: 10.1093/ndt/15.6.758.

Zou, M.-H., Shi, C. and Cohen, R. A. (2002) 'Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite', *The Journal of Clinical Investigation*, 109(6), pp. 817–826. doi: 10.1172/JCI14442.