



HAL
open science

Rôle des péricytes et des cellules endothéliales dans l'insuffisance cardiaque

Lauriane Cornuault

► **To cite this version:**

Lauriane Cornuault. Rôle des péricytes et des cellules endothéliales dans l'insuffisance cardiaque. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2022. Français. NNT : 2022BORD0285 . tel-03905942

HAL Id: tel-03905942

<https://theses.hal.science/tel-03905942>

Submitted on 19 Dec 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

Par Lauriane Cornuault

**Rôle des péricytes et des cellules endothéliales dans
l'insuffisance cardiaque**

Sous la direction de : Marie-Ange Renault

Soutenue le 27 octobre 2022

Membres du jury :

M Dos Santos Pierre, Professeur, Université de Bordeaux

Mme Fontaine Coralie, Chargée de recherche, Université de Toulouse

M Mericskay Mathias, Directeur de recherche, Université Paris-Saclay

Mme Renault Marie-Ange, Chargée de recherche, Université de Bordeaux

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Directrice de thèse

Remerciements

Merci...

Au **Professeur Pierre Dos Santos** d'avoir accepté de présider le jury

Aux **Docteurs Coralie Fontaine et Mathias Mericskay** d'avoir évalué mon manuscrit en tant que rapporteurs

A **Thierry** de m'avoir accueillie au sein de l'unité

A mes relecteurs : **Romain B.** pour la partie cardio, **Candice** pour toute la thèse, **Marie et Jula** pour les articles

A toute l'équipe **Cancange** passée et présente :

- A **Aissata**, ma partenaire de M2, d'avoir découvert le labo avec moi puis d'avoir partagé de nombreux repas à Haut-Lévêque et pour toutes tes bonnes adresses
- A **Alain**, pour votre bonne humeur et pour choisir de délicieux traiteurs pour les congrès
- A **Annabel**, pour ton aide et pour tes précieux conseils sur les balades à vélo
- A **Candice**, pour les questions sur les années 80, les anecdotes sur Odile et tout le reste
- A **Célia**, de reprendre le projet péricytes
- A **FX**, d'avoir été un super étudiant de M2 et avoir réalisé un nombre incalculable de manip utiles à cette thèse, mais aussi pour ton calme et pour tes blagues
- A **Margaux**, pour les pauses cafés/thés et les sorties au relais H, ton aide sur Word et sur Photoshop et pour ton expertise en astrologie
- A **Maxime**, pour ta bonne humeur et tes critiques cinématographiques et tes avis bien tranchés (Lyon/Toulouse, épinards/aubergine, sagittaire ces êtres insupportables ...)
- A **Ninon**, pour m'avoir accompagnée dans ma 1^{ère} année de thèse et le 1^{er} confinement, pour les bavardages et pour le chocolat
- A **Paul**, pour tes jeux de mot et d'être mon co-équipier dans la team cœur
- A **Pierre**, pour tes western blots de qualité et tes chansons qui restent dans la tête
- A **Sarah et Pierre-Louis**, de m'avoir intégrée dans l'équipe

A **Marie-Ange**, d'avoir dirigé mon M2 et ma thèse d'une main de maître, de m'avoir appris plein de techniques et de m'avoir encadrée avec brio et de continuer à le faire une année de plus

A **Philippe**, pour les pressions, échographies et autres chirurgies mais aussi de t'être mis en face de moi aux pilates sans te moquer une seule fois de moi malgré mes déséquilibres, et merci de remplir la théière le matin (ce paragraphe est couleur myrtille)

A **Sylvain**, pour les souris et pour toujours apprécier mes gâteaux même les moins réussis

A **mes souris**, d'avoir fait (plus ou moins) ce que je voulais

« Petite souris

Petite amie

Viens par ici

Parle avec mes petits poissons

Et tu auras du saucisson ! »

Pierre Gripari, *La Sorcière du Placard à Balais*

A **Hugo, Maëlle, Maxime** et **Nina** pour les soirées. Merci pour la découverte de nombreux jeux (de société, de rôles, d'extérieur ...), pour les découvertes culinaires (thés, bonbons, glace à la crème ...) et pour la découverte de la trottinette électrique. Merci aussi à **Clélia** pour tout ça et d'être venue non pas une, mais deux fois pour mes 30ans et merci de continuer à me soutenir dans cette thèse, même depuis Brest.

Spéciale cace-dédi à **Laura**, ma co-doctorante pendant 3 ans. Merci pour les discussions gastronomiques, pour m'avoir fait découvrir le bloc et pour avoir partagé tous les soucis de thèse. Je te souhaite une bonne continuation à Strasbourg et te souhaite le meilleur pour tes études.

A **Carole** pour les soirées piscine et pour les petites histoires de rando, sur tes filles et tes voisins

A tout le reste du **laboratoire U1034** pour votre charmante compagnie, votre sympathie et pour toutes les discussions enrichissantes du déjeuner

A tous les autres copains :

Merci aux pharmas : à **Claire, Julie** et **Marine** et **Arthur, PE** et **Vico** d'être toujours présents et de m'accompagner dans les brunchs et les escape games. Quand est-ce que vous venez vous installer à Bordeaux ?! Merci aussi à **Marine** (encore) et **Jérémy** d'être nos sauveurs et de nous avoir prêté leur salle de bain l'hiver dernier, leur piscine et leur barbecue cet été. Merci aussi pour leur bonne humeur communicative.

Merci à **David**, pour tout pareil que tous les autres : les jeux, les weekends, les soirées ...

Merci aussi à tous les copains du collège et du lycée et « +1 » : **Alexis, Camille, Chris, Fanny, Hélène, Kris, Laetitia, Patricio, Rémy** et **Roxane**, de m'avoir divertie pendant cette thèse notamment grâce aux parties de loup garou, aux ti punch et aux danses on the floor qui entraînent au bout de la nuit.

A **ma famille**, en particulier au **chat Mallow**

A **Romain**, TMTC

Table des matières

INTRODUCTION	16
I. Cœur	16
A. Anatomie du cœur	16
1. Morphologie du cœur	16
a) Position du cœur	16
b) Vascularisation	17
c) Innervation cardiaque	17
2. Cavités et valves cardiaques.....	17
a) Cavités du cœur.....	17
b) Valves du cœur	17
(1) Valves auriculo-ventriculaires	17
(2) Valves sigmoïdes	18
c) Circulation du sang à l'intérieur du cœur.....	18
3. Paroi du cœur.....	18
a) Constitution.....	18
b) Structure histologique du myocarde.....	19
(1) Cardiomyocytes indifférenciés	19
(2) Cardiomyocytes nodaux et tissu nodal	20
B. Physiologie de la pompe cardiaque.....	20
1. Automatisme cardiaque	20
a) Naissance des influx cardiaques.....	20
b) Propagation des influx.....	21
2. Contraction du muscle cardiaque	22
a) Courants ioniques.....	22
b) Facteurs de modification de la force de contraction	23
3. Cycle cardiaque	24
a) Relaxation.....	24
b) Remplissage ventriculaire	25
c) Systole ventriculaire	25
4. Débit cardiaque	26
a) Définition.....	26
b) Régulation du débit cardiaque	26
(1) Régulation par le volume d'éjection systolique (VES) et fraction d'éjection	26
(2) Régulation de la fréquence cardiaque	27

C.	Conclusion	27
II.	Insuffisance cardiaque.....	28
A.	À fraction d'éjection réduite	28
1.	Physiopathologie	28
2.	Clinique.....	28
3.	Traitements	29
a)	Médicaments agissant sur le SRAA	29
b)	B-bloquants	30
c)	Antagonistes du récepteur aux minéralocorticoïdes	30
d)	Inhibiteurs du SGLT2	30
B.	À fraction d'éjection préservée	31
1.	Épidémiologie	31
2.	Complications et pronostic.....	31
3.	Diagnostic	31
a)	Clinique.....	33
b)	Biologique.....	33
c)	Imagerie.....	34
(1)	Échocardiographie transthoracique	34
(2)	IRM cardiaque	35
d)	Cathétérisme droit-gauche.....	35
4.	Physiopathologie	36
a)	Dysfonction diastolique.....	36
(1)	Compliance	36
(2)	Relaxation active	37
b)	Hypertrophie ventriculaire	37
c)	Dysfonction endothéliale	38
d)	Inflammation	38
5.	Traitements	39
a)	Traitements actuels.....	39
(1)	Non pharmacologiques	39
(2)	Pharmacologiques	39
b)	Traitements envisagés : thérapies anti-inflammatoires.....	41
(1)	Colchicine	41
(2)	Anakinra, anti-IL-1	42
C.	Conclusion	43
III.	Vasculature cardiaque et fonction vasculaire	44

A.	Organisation	44
1.	Artères coronaires	44
a)	Tunique interne ou intima.....	45
b)	Tunique moyenne intermédiaire ou media	45
(1)	CML.....	45
(2)	MEC	46
c)	La tunique externe ou adventice.....	47
2.	Veines coronaires	48
3.	Capillaires	48
a)	CE.....	48
b)	Péricytes	49
c)	Communication CE-péricytes	50
B.	Formation.....	50
1.	Vasculogenèse.....	50
2.	Angiogenèse	51
3.	Artériogenèse	51
4.	Maturation	51
C.	Fonctions	52
1.	Rôle des CE	52
a)	Perméabilité	52
(1)	Jonctions serrées	53
(2)	Jonctions d'ancrage	53
(3)	Jonctions communicantes ou jonctions gap	54
b)	Tonus et vasomotricité.....	54
c)	Adhésion et transport de cellules inflammatoires	55
d)	Hémostase.....	55
(1)	Hémostase primaire	56
(2)	Coagulation plasmatique.....	56
(3)	Régulation de la coagulation	56
(4)	Fibrinolyse	57
2.	Rôle des péricytes.....	57
a)	Maintien de l'endothélium.....	57
b)	Inflammation	58
c)	Fibrose	58
d)	Cellules souches	58
e)	Thrombose	59

f)	Fonction cardiaque.....	59
g)	Atteinte des péricytes en pathologie	59
h)	Conclusion	60
IV.	Dysfonction vasculaire et rôle dans l'IC	61
A.	Définition.....	61
B.	Mécanismes.....	61
1.	Altération de l'apport en nutriments et O ₂	62
a)	Altération de la vasomotricité.....	62
b)	Raréfaction capillaire et altération de l'angiogenèse.....	62
c)	Thrombose	62
2.	Altération de la communication CE-cardiomyocyte.....	62
a)	NO.....	63
b)	Endothéline (EDN1), Neuréguline 1 (NRG1) et Apéline (APLN)	63
c)	Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	64
3.	Modification du micro-environnement du cardiomyocyte.....	64
a)	Perméabilité capillaire et œdème	64
b)	Fibrose	64
c)	Inflammation	65
4.	Conclusion	66
C.	Preuves expérimentales attestant le rôle essentiel de la CE dans la physiologie cardiaque	66
1.	La modification génétique des propriétés des CE est suffisante pour provoquer une dysfonction cardiaque.....	66
2.	La modification génétique des propriétés des CE peut exacerber l'IC	68
D.	Conclusion	69
V.	Dimorphisme sexuel.....	70
A.	Différences des FRCV.....	70
B.	Ménopause.....	70
C.	Mécanismes.....	71
1.	Effets des œstrogènes sur les cardiomyocytes	71
a)	Contraction et relaxation	71
b)	Remodelage cardiaque.....	72
2.	Effets des œstrogènes sur les CE.....	72
a)	Survie, migration et prolifération.....	72
b)	Activation/Molécules d'adhésion.....	73
c)	Vasomotricité	73
d)	Thrombose	73

3.	Effets des œstrogènes sur l'inflammation	74
4.	Conclusion	74
VI.	Outils	75
A.	Modèles animaux	75
1.	Modèles de rongeurs	75
a)	Modèles à un seul FRCV	75
(1)	Modèles atteints de maladie métabolique	75
(2)	Modèles de vieillissement	76
(3)	Modèles d'hypertension	76
b)	Modèles à 2 composantes.....	77
c)	Modèles à trois composantes	78
2.	Grands modèles animaux.....	79
a)	Chiens hypertendus.....	79
b)	Porcs avec hypertension et hyperlipidémie	79
c)	Porcs avec hypertension, hyperlipidémie et hyperglycémie	79
d)	Porcs présentant une surcharge de pression et une maladie métabolique	80
3.	Conclusion	80
B.	Signalisation Hedgehog, cible moléculaire de la dysfonction endothéliale	81
1.	Synthèse des protéines Hedgehog	81
2.	Signalisation.....	81
a)	Voie canonique Gli-dépendante.....	82
b)	Voies non canoniques Gli-indépendantes.....	82
3.	Rôle dans le système cardiovasculaire adulte.....	83
a)	Dans les vaisseaux	83
(1)	Perméabilité	83
(2)	Activation des CE	84
(3)	Vasomotricité	84
b)	Dans le cœur.....	84
(1)	Développement embryonnaire	84
(2)	Régénération cardiaque	84
(3)	Fonction cardiaque.....	85
4.	Régulation	85
a)	Régulation physiologique par les co-récepteurs	85
(1)	Boc et Cdon	86
(2)	Growth arrest specific 1	86
(3)	Hedgehog interacting protein	86

(4) Hhip1	87
b) Dérégulations pathologiques	87
(1) Dans les maladies ischémiques	87
(2) Dans le diabète	88
(3) Dans le vieillissement	88
(4) Dans les cancers	88
(5) Dans l'inflammation	89
(6) Dans d'autres pathologies	89
c) Stratégies thérapeutiques	89
(1) Antagonistes de Smo	89
(2) Agonistes de Smo	90
(3) Blocage de Cdon	91
5. Conclusion	91
OBJECTIFS	92
MATÉRIEL ET MÉTHODES	94
I. Modèles murins	94
A. Souris HFD+L-NAME	94
B. Souris diabétiques et obèses <i>Lepr^{db/db}</i>	94
C. Souris <i>Cdh5-cre/ERT2 ; Cdon^{F/F}</i>	95
D. Souris <i>Pdgfrb-cre/ERT2 ; RosaDTA</i>	96
E. Hébergement	96
II. Traitements	96
A. Colchicine	96
B. Smoothened Agonist (SAG)	97
RÉSULTATS	98
I. Rôle des péricytes cardiaques	98
A. Mise en place du modèle	98
B. Effets sur les CE <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	98
C. Effets sur les cardiomyocytes et la fonction cardiaque	99
D. Limites du modèle	99
E. Conclusion	99
II. Rôle des cellules endothéliales	138
A. Dimorphisme sexuel	138
B. Prévenir la dysfonction endothéliale et l'inflammation ne prévient pas la dysfonction diastolique dans le modèle HFD+L-NAME	138
C. Conclusion	139

D. Prévenir la dysfonction endothéliale ne prévient pas la dysfonction diastolique dans le modèle <i>Lepr^{db/db}</i>	176
DISCUSSION	179
I. Péricytes cardiaques.....	179
A. Péricytes cardiaques nécessaires à l'intégrité endothéliale	179
B. Péricytes cardiaques nécessaires à la fonction cardiaque	179
C. Renouvellement des péricytes	180
II. Dysfonction endothéliale et ICFEp	180
A. Dimorphisme sexuel.....	180
1. Dysfonction endothéliale	181
2. Inflammation	181
3. Remodelage cardiaque.....	181
4. Mécanismes.....	182
a) Mécanisme commun	182
b) Mécanismes différents	182
B. La dysfonction endothéliale n'est pas suffisante pour induire l'ICFEp	182
C. L'inflammation n'est pas suffisante pour induire l'ICFEp.....	183
D. Mécanismes responsables de la fibrose et de l'hypertrophie inconnus.....	183
E. Conclusion	183
BIBLIOGRAPHIE.....	184
Publications, présentations orales et posters	212
A. Publications	212
B. Présentations orales.....	212
C. Posters.....	213
Résumé.....	216

Table des figures

Figure 1 Représentation du cœur avec les sillons.....	16
Figure 2 Paroi du cœur	18
Figure 3 Structure d'un cardiomyocyte.....	19
Figure 4 Potentiel d'action cardiaque	21
Figure 5 Fibres nerveuses cardiaques	22
Figure 6 Cycle calcique	22
Figure 7 Cycle de liaison myosine-actine	23
Figure 8 Composition d'un sarcomère	24
Figure 9 Cycle cardiaque avec pressions et volumes	25
Figure 10 Organigramme de l'algorithme diagnostique HFA-PEFF.....	32
Figure 11 Système de notation pour le diagnostic.....	33
Figure 12 Influence des pressions de remplissage sur le profil du doppler mitral	34
Figure 13 Courbe pression-volume	36
Figure 14 Recommandations pour la prévention des FRCV des patients avec ICFEp.....	40
Figure 15 Tuniques d'une artère	45
Figure 16 Représentation de la matrice extracellulaire	46
Figure 17 MEC et organisation du cytosquelette.....	47
Figure 18 Structure d'un capillaire	49
Figure 19 Communication CE-Péricytes	50
Figure 20 Les différents types de jonctions.....	52
Figure 21 Jonction d'ancrage ou adhérente.....	53
Figure 22 Recrutement leucocytaire	55
Figure 23 Cascade de la coagulation	57
Figure 24 Effet des CE sur le cardiomyocyte	61
Figure 25 Mécanismes pouvant expliquer l'effet de la dysfonction endothéliale sur les cardiomyocytes	66
Figure 26 Différences entre les femmes et les hommes dans l'IC	70
Figure 27 Voie de signalisation Hedgehog	82
Figure 28 Antagonistes et agonistes de la voie Hedgehog.....	90
Figure 29 Schéma d'administration du régime HFD et du L-NAME	94
Figure 30 Bloquer Cdon protège l'endothélium.....	95
Figure 31 Schéma de l'allèle floxé de Cdon.....	95
Figure 32 Construction génétique des souris PDGFRBCre/ERT2 ; RosaDTA	96
Figure 33 Le SAG réduit l'inflammation chez les souris $Lepr^{db/db}$	176
Figure 34 Le SAG réduit l'activation endothéliale chez les souris $Lepr^{db/db}$	177
Figure 35 Le SAG n'améliore pas la fonction diastolique chez les souris $Lepr^{db/db}$	177
Figure 36 Le SAG n'a pas d'effet sur le remodelage cardiaque chez les souris $Lepr^{db/db}$	178
Tableau 1 Modifications génétiques dans CE induisant une dysfonction cardiaque.....	67
Tableau 2 Modifications génétiques dans les CE exacerbant l'IC	68
Tableau 3 Caractéristiques microvasculaires des modèles rongeurs d'ICFEp	78
Tableau 4 Caractéristiques microvasculaires des modèles grands animaux d'ICFEp	80

Liste des abréviations

ACE2	Angiotensin-Converting Enzyme 2
ACh	Acétylcholine
ADRB3	Beta-3 adrenergic receptor
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AngII	Angiotensine II
Angpt	Angiopoïétine
ANP	Atrial Natriuretic Peptide
APLN	Apéline
ARAI	Antagonistes du récepteur à l'angiotensine II
BHE	Barrière hématoencéphalique
BNP	Brain Natriuretic Peptide
Boc	Brother of Cdon
CamKII	Calmoduline Kinase II
CCL2	Chemokine ligand 2
Cdon	Cell adhesion molecule-related/downregulated by oncogenes
CE	Cellules endothéliales
CML	Cellules musculaires lisses
CRP	C reactive protein
CTGF	Connective tissue growth factor
Cx43	Connexine 43
DFG	Débit de filtration glomérulaire
Dhh	Desert Hedgehog
DOCA	Désoxycorticostérone
DOCP	Pivalate de désoxycorticostérone
ECG	Electrocardiogramme
ECKO	Endothelial cell knock out
EDN1	Endothéline 1
EPCR	Endothelial Protein C Receptor
ER	Estrogen receptor
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FA	Fibrillation atriale/auriculaire
FEVG	Fraction d'éjection du ventricule gauche
FGF	Fibroblast growth factor
FNIII	Fibronectin type III
Foxp1	Forkhead box protein P1
FRCV	Facteurs de risque cardiovasculaire
FSP1	Fibroblast-specific protein-1
GAG	Glycosaminoglycanes
Gas1	Growth arrest specific 1
GC	Guanylate cyclase
GCs	Guanylate cyclase soluble
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique

GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPR30	G protein-coupled receptor 30
HFD	High Fat Diet
Hhip	Hedgehog interacting protein
Hhip1	Hedgehog interacting protein-like 1
Hif1α	Hypoxia-inducible factor 1- α
HTA	Hypertension artérielle
IC	Insuffisance cardiaque
ICAM	Intercellular adhesion molecule
ICFep	Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée
ICFer	Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite
IEC	Inhibiteurs de l'enzyme de conversion
Ig	Immunoglobulines
Ihh	Indian Hedgehog
IL	Interleukine
IL-1RI	Récepteur à l'IL-1
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IVRT	Isovolumic relaxation time
KO	Knock out
L-NAME	N γ -nitro-L-arginine methyl ester
LDL	Low density lipoprotein
LOX	Lysyl oxidase
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	Métalloprotinases matricielles
MYH7	Myosin heavy chain 7
NCX	Échangeur Na ⁺ /Ca ⁺
NFS	Numération formule sanguine
NG2	Neural glial antigen 2
NRG1	Neuréguline 1
NHE1	Sodium-hydrogen antiporter 1
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric Oxyde Synthase
NOX	NADPH oxidase
NT pro-BNP	N-terminal pro-brain natriuretic peptide
NYHA	New York Heart Association
OD	Oreillette droite
OG	Oreillette gauche
PAF	Platelet activating factor
PAI	Plasminogen activator inhibitor
PDGFRB	Platelet derived growth factor receptor β
PDGFB	Platelet derived growth factor β
Pdx1	Pancreatic and duodenal homeobox 1
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PKA	Protéine kinase A
PKG	Protéine kinase G
PRKG1	cGMP-dependent protein kinase 1
PTCH1	Patched 1

RyR2	Récepteur à la ryanodine
S1pr1	Sphingosine-1-phosphate receptor 1
SAG	Smoothened agonist
SAMP8	Senescence accelerated prone mice
SELE	E-selectin
SERCA2a	Sarcoréticulum endoplasmique Ca ²⁺ ATPase
SGLT2	Cotransporteur 2 du sodium-glucose
SHBG	Sex Hormon Binding Globuline
Shh	Sonic hedgehog
Sirt	Sirtuine
SMO	Smoothened
SRAA	Système rénine-angiotensine-aldostérone
SRP	Signal recognition particle
SUFU	Supressor of fused homolog
TAC	Constriction aortique transverse
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TNFα	Tumor necrosis factor α
tPA	Tissue plasminogen activator
uPA	Urokinase plasminogen activator
USPIO	Ultra small particle of iron oxide
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule
VD	Ventricule droit
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
VES	Volume d'éjection systolique
VG	Ventricule gauche
VTD	Volume télédiastolique
VTS	Volume télésystolique
vWF	von Willebrand factor
ZO	Zonula occludens

INTRODUCTION

I. Cœur

Le cœur est le moteur du système cardiovasculaire et correspond à une pompe qui propulse le sang (environ 5L/min) dans la totalité des vaisseaux pour alimenter les différents tissus et cellules de l'organisme en nutriments (glucose essentiellement) et en O₂. Il récupère aussi les déchets (CO₂ et chaleur). Il est important de comprendre son anatomie pour ensuite comprendre comment il fonctionne.

A. Anatomie du cœur

1. Morphologie du cœur

a) Position du cœur

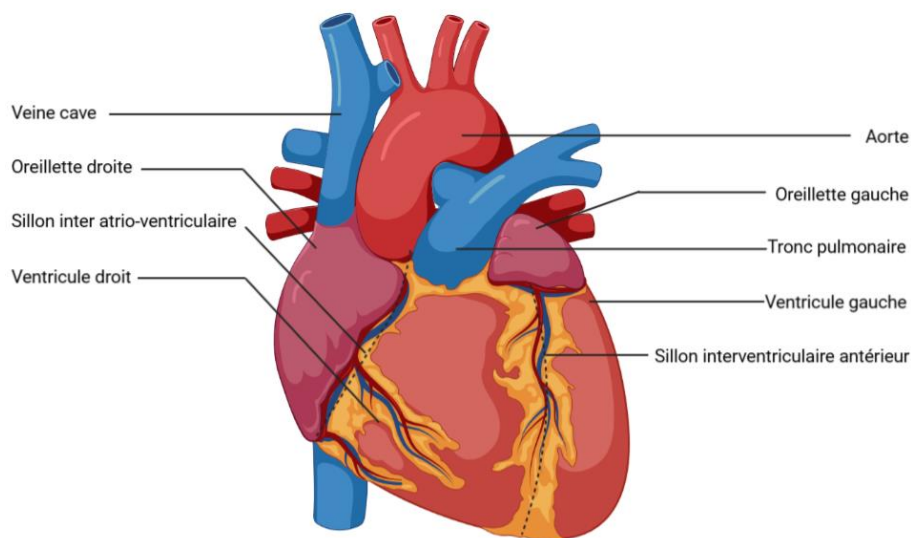


Figure 1 Représentation du cœur avec les sillons

Le cœur est un muscle creux, conique, voire pyramidal. Chez l'Homme, il mesure 12 cm de haut sur 9 cm et pèse 250 à 300 g. Ces mesures peuvent varier en fonction de la surface corporelle. Il est posé sur le diaphragme et est situé dans le médiastin. Le médiastin est une cavité qui s'étend entre le sternum en avant, la colonne vertébrale en arrière et qui est compris entre les poumons. L'apex repose sur le diaphragme et est projeté en avant, vers le bas et la gauche. La base, partie la plus large du cœur, est en haut, vers l'arrière.

De l'extérieur, des sillons sont visibles (Fig 1) :

- Le sillon coronarien ou sillon interatrio-ventriculaire se situe à la base en faisant le tour du cœur, il sépare les oreillettes des ventricules.
- Le sillon interventriculaire est un sillon vertical qui sépare le ventricule droit du gauche.

b) Vascularisation

La vasculature cardiaque sera décrite en détail dans le chapitre III.

c) Innervation cardiaque

Le cœur n'a pas d'innervation motrice volontaire, mais une double innervation par le système nerveux végétatif ou autonome :

- Par le sympathique pour l'innervation des oreillettes et des ventricules
- Par le parasympathique pour l'innervation des oreillettes seulement.

2. Cavités et valves cardiaques

a) Cavités du cœur

Le cœur est composé de 4 cavités : l'oreillette droite (OD), l'oreillette gauche (OG), le ventricule droit (VD) et le ventricule gauche (VG). Ces cavités vont former le cœur droit et le cœur gauche. Ces deux cœurs fonctionnent de manière synchrone.

Les différentes cavités sont séparées par des septums constitués de tissu conjonctif isolant ne permettant pas de conduire le courant électrique. Le septum interauriculaire sépare les oreillettes, le septum interventriculaire sépare les ventricules et le septum non continu se situe entre les oreillettes et les ventricules.

Au niveau des oreillettes, l'épaisseur de la paroi est fine alors qu'au niveau des ventricules, elle est beaucoup plus épaisse, d'autant plus à gauche qu'à droite. À gauche, le VG doit, en effet, exercer une force importante pour éjecter le sang dans un système vasculaire à haute pression. Tandis qu'à droite, le travail sera moins important pour lutter contre la pression qui existe dans le réseau pulmonaire.

b) Valves du cœur

Les valves sont situées entre les oreillettes et les ventricules d'une part, et à la base des gros vaisseaux qui partent du cœur, l'aorte à gauche et le tronc pulmonaire à droite, d'autre part. Elles sont faites de tissu conjonctif dense entouré d'endocarde. Ce sont des clapets anti-reflux sanguin qui fonctionnent mécaniquement et passivement en fonction des différences des pressions qui entraînent leur ouverture et leur fermeture.

(1) Valves auriculo-ventriculaires

À droite, la valve tricuspide est constituée d'au moins trois feuillets et, à gauche, la valve mitrale est constituée de deux feuillets.

L'oreillette commence à se remplir pendant la systole ventriculaire, la pression augmente dans l'oreillette au cours du remplissage. La pression pousse alors les feuillets des valves vers le bas, vers le ventricule, pour qu'il puisse se remplir de sang. Le ventricule va alors se contracter et la pression à l'intérieur va augmenter. De manière synchrone, les feuillets des valves deviennent parfaitement

jointifs pour que le sang ne puisse s'échapper que par les gros vaisseaux (aorte ou tronc pulmonaire) et pour éviter le reflux vers les oreillettes.

Les valves s'ouvrent quand le ventricule se relâche activement de façon isovolumétrique, jusqu'à ce que la pression soit en dessous de la pression de l'oreillette.

(2) Valves sigmoïdes

Les valves sigmoïdes aortiques ou pulmonaires sont plus petites que la valve tricuspide et que la valve mitrale. Elles sont faites de godets formés de trois feuillets semi-circulaires en cupule ou semi-lunaires. Lors de la systole ventriculaire, les valves sigmoïdes vont s'ouvrir pour laisser passer le sang dans les vaisseaux. Lors de la diastole ventriculaire, les valves se ferment et empêchent un retour en arrière.

c) Circulation du sang à l'intérieur du cœur

L'OD récupère le sang de la veine cave supérieure et de la veine cave inférieure. Le sang passe dans le VD. Quand il va se contracter, le sang sera éjecté dans le tronc pulmonaire. Le tronc pulmonaire donne deux artères pulmonaires qui vont distribuer le sang dans les poumons. Le sang va s'enrichir en O₂ puis va être dirigé vers les quatre veines pulmonaires qui débouchent dans l'OG. Le sang passe de l'OG au VG. Ce dernier se contracte pendant la systole ventriculaire et éjecte le sang dans l'aorte qui va distribuer le sang aux organes.

3. Paroi du cœur

a) Constitution

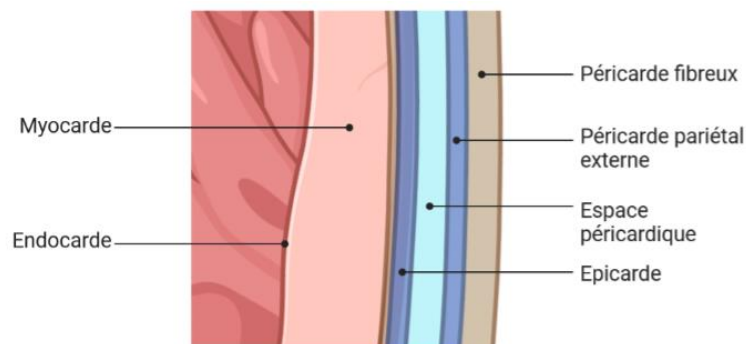


Figure 2 Paroi du cœur

La paroi du cœur est constituée de trois couches (Fig 2), de l'extérieur à l'intérieur :

- Le péricarde est un sac membraneux étanche qui permet de maintenir le cœur en place. Il comprend une partie fibreuse externe non élastique et solide qui attache le cœur au diaphragme et aux gros vaisseaux, une partie séreuse interne constituée d'un feuillet pariétal externe sous la partie fibreuse et d'un feuillet viscéral interne ou épicarde. Entre les deux feuillets se trouve l'espace péricardique où le liquide péricardique est sécrété permettant de diminuer les frottements entre les deux membranes lors de la diastole et de la systole.

- Le myocarde est un tissu musculaire constitué de deux types de cardiomyocytes. On distingue les cardiomyocytes indifférenciés ressemblant à des cellules musculaires et qui assurent la contraction du cœur et les cardiomyocytes nodaux, cellules nerveuses qui génèrent les influx électriques ou potentiels d'actions pour contracter le cœur. L'ensemble des cardiomyocytes correspond uniquement à 50 % des cellules cardiaques. Le reste est composé de cellules endothéliales, de cellules murales et de fibroblastes. Les cardiomyocytes représentent 80 % du volume du cœur.
- L'endocarde est une couche constituée de cellules endothéliales qui recouvre l'intérieur du cœur, y compris les valves, les piliers et qui va se prolonger dans les vaisseaux.

b) Structure histologique du myocarde

(1) Cardiomyocytes indifférenciés

L'origine des cardiomyocytes est mésodermique, ils dérivent du tube cardiaque primitif. Ils proviennent de trois tuniques : de l'endocarde (épithélium), de la gelée cardiaque et du péricarde (cavité cœlomique) et sont contractiles à J23.

Les cardiomyocytes indifférenciés sont des cellules musculaires allongées de grande taille (120 μm de long sur 90 μm de large) qui contiennent une membrane, un réticulum sarcoplasmique, un cytoplasme ainsi qu'un noyau unique. La membrane possède des stries scalariformes ou disques intercalaires qui sont constitués de nexuses avec des gap junctions (jonctions communicantes composées de connexines) permettant les échanges ioniques. Elle possède également des desmosomes et des fascias adhérents où vont être localisés les sarcomères c'est-à-dire les filaments épais de myosine auxquels vont être associés des filaments fins d'actine comme dans le muscle strié squelettique. De nombreux tubules transversaux dits tubules T se situent aussi au niveau de la membrane permettant de rapprocher l'extérieur et l'intérieur de la cellule (Fig 3).

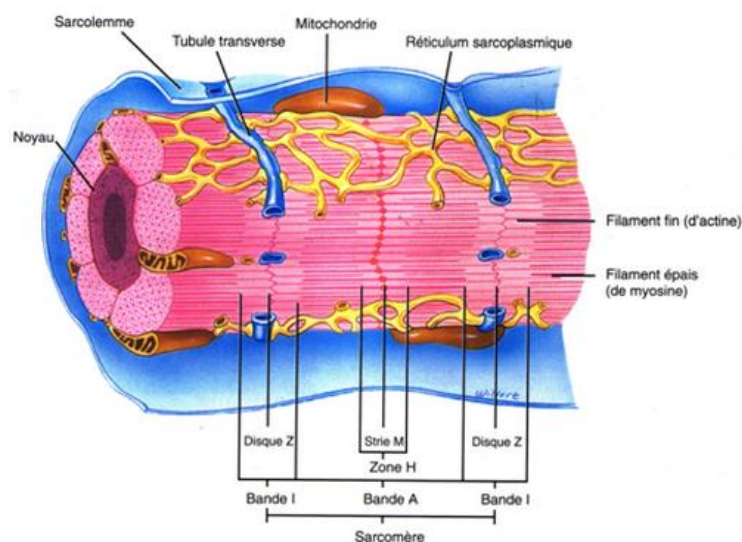


Figure 3 Structure d'un cardiomyocyte

Le réticulum sarcoplasmique, quant à lui, présente des renflements qui constituent des citernes à proximité du tubule T. Une citerne et un tubule T forment ainsi une diade. Les citernes permettent de rapprocher le stock de calcium constitué dans le réticulum sarcoplasmique des tubules T. Enfin, le

cytoplasme contient beaucoup de mitochondries ainsi que des myofibrilles faites de filaments fins et d'épais.

(2) Cardiomyocytes nodaux et tissu nodal

Les cardiomyocytes nodaux sont des cellules avec un caractère musculaire extrêmement atténué. Ils sont, en effet, très pauvres en myofibrilles, mais sont très riches en nexus qui leur donne le nom de cellules cardionectrices. Les cellules cardionectrices sont des cellules auto excitables et pacemakers, capables de produire spontanément et rythmiquement des potentiels d'action ou influx nerveux. Elles génèrent ainsi le rythme cardiaque.

Elles se regroupent pour former le tissu nodal qui comprend le nœud sinusal de Keith et Flack, le nœud auriculo-ventriculaire d'Aschoff et Tawara, le faisceau de His avec ses deux branches et le réseau terminal de Purkinje.

Les cellules cardionectrices entraînent la dépolarisation des autres cardiomyocytes de proche en proche grâce aux jonctions communicantes.

B. Physiologie de la pompe cardiaque

La fonction principale du cœur est la contraction automatique fondée sur la transformation du signal électrique généré par le nœud sinusal en activité mécanique. Cette transformation de potentiel d'action en une activité mécanique se fait grâce au calcium.

1. Automatisme cardiaque

a) Naissance des influx cardiaques

À l'état normal, l'influx électrique cardiaque est généré au niveau du nœud sinusal qui est le centre pacemaker cardiaque. Son rôle est de faire battre et contracter le cœur. Cette capacité d'auto-excitation existe dans toutes les cellules du tissu nodal, mais les cellules ne se dépolarisent pas à la même vitesse dans toutes les parties du tissu. Cette différence de vitesse de dépolarisation crée un rythme sinusal chez l'Homme. Le nœud sinusal, où les cellules se dépolarisent le plus vite, impose ainsi le rythme du cœur. Le nœud sinusal génère un potentiel d'action qui se propage via le tissu nodal dans l'ensemble du cœur. Il se déplace à grande vitesse grâce aux gap junctions pour distribuer le potentiel d'action dans les cardiomyocytes indifférenciés, en particulier ceux du ventricule pour générer la contraction.

Le potentiel d'action dépend des canaux ioniques. Il est représenté par une dépolarisation brutale suivie d'un plateau de dépolarisation (Fig 4). Il se décompose en plusieurs phases :

- La phase 0 correspond à l'ouverture rapide des canaux sodiques voltage-dépendants entraînant une entrée de sodium pour provoquer très rapidement la dépolarisation.
- La phase 1 représente l'ouverture précoce des canaux potassiques qui vont s'ouvrir de façon transitoire et qui sont responsables de la repolarisation transitoire.
- La phase 2 correspond à l'ouverture des canaux calciques lents situés au niveau des tubules T.

- Le plateau qui suit dure environ 250 ms ce qui correspond au temps de la contraction des cardiomyocytes. À la fin du plateau, la repolarisation a lieu.
- La phase 3 équivaut à la fermeture des canaux calciques et à l'ouverture tardive des canaux potassiques voltage-dépendants dont l'ouverture a été déclenchée par l'arrivée du potentiel d'action.
- La phase 4 correspond à l'activation de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ qui permet de ramener les concentrations de sodium et de potassium à l'état initial.

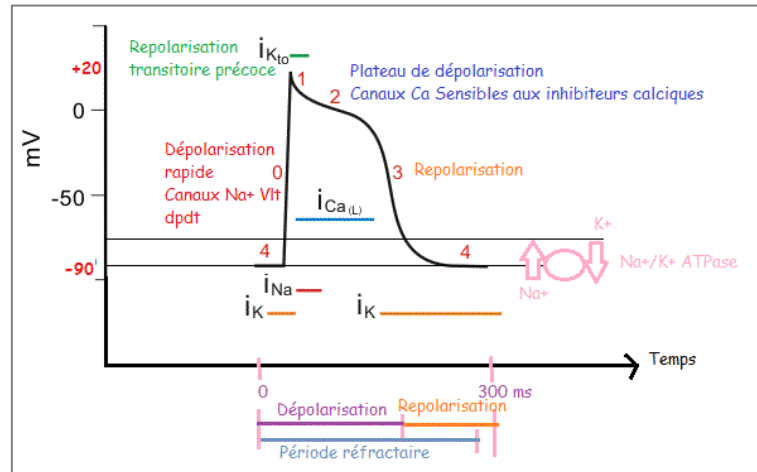


Figure 4 Potentiel d'action cardiaque

Une dépolarisation spontanée peut aussi être observée. Elle est due à l'existence d'un courant I_f qui s'opère en dehors des potentiels d'action. Le courant I_f est lié aux canaux du même nom faisant entrer du sodium et sortir du potassium. L'entrée de sodium étant supérieure à la sortie de potassium, elle entraîne un bilan net de dépolarisation. Ce courant est activé par la diastole. Les canaux I_f vont être régulés par le système nerveux végétatif via une augmentation ou une diminution de la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) qui se fixe sur l'extrémité C-terminale des canaux I_f .

b) Propagation des influx

Le potentiel d'action naît donc au niveau du nœud sinusal appelé aussi sinoatrial et va se propager dans l'ensemble des fibres des oreillettes. Le nœud auriculo-ventriculaire va ensuite prendre le relais. Les fibres y ont un diamètre plus petit qu'ailleurs et répondent donc plus lentement. Cela permet aux cardiomyocytes des oreillettes de se contracter et donc de chasser le sang contenu dans les oreillettes avant que les potentiels d'action n'atteignent les ventricules. Les influx passent d'une oreillette à un ventricule par le faisceau de His jusqu'à l'apex cardiaque puis remontent dans les fibres de Purkinje (Fig 5). Quand le potentiel d'action arrive dans le réseau de distribution, il va être transmis aux cardiomyocytes indifférenciés des ventricules qui vont répondre en se contractant. La contraction des ventricules démarre au niveau de l'apex pour remonter vers la base permettant de guider le sang vers l'aorte. S'ensuit une repolarisation des cellules. Chaque cellule se repolarise elle-même indépendamment de la voisine.

L'influence du système nerveux sur ces voies de conduction est liée à des terminaisons libres. Le système nerveux envoie des nerfs, mais il n'y a pas de synapses à proprement parler. La terminaison libre décharge de l'acétylcholine (ACh) (cardiomodulatrice) ou de l'adrénaline (cardioaccélétratrice).

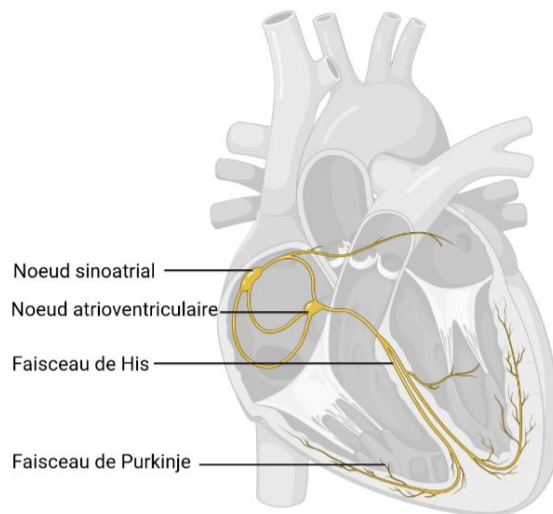


Figure 5 Fibres nerveuses cardiaques

2. Contraction du muscle cardiaque

Battements et rythme sont déterminés par l'activité intrinsèque du nœud sinoatrial. Les cardiomyocytes sont spontanément excitables. La contraction dépend des courants ioniques ainsi que des fibres d'actine et de myosine composant le muscle.

a) Courants ioniques

La contraction des cardiomyocytes dépend principalement des courants calciques (Fig 6).

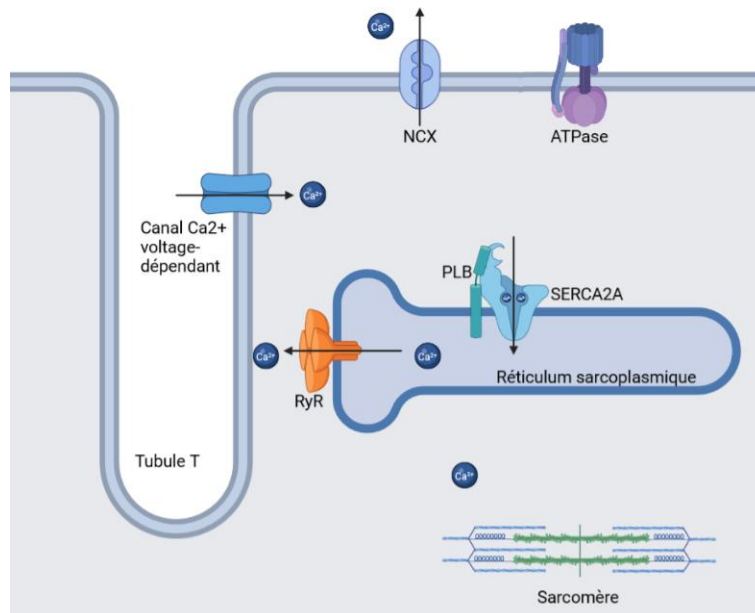


Figure 6 Cycle calcique

Lors du potentiel d'action, le calcium entre dans la cellule via les canaux calciques voltage-dépendants de type L. Cette entrée de Ca^{2+} induit l'ouverture du récepteur à la ryanodine de type 2 (RyR2) pour relarguer du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique vers le cytosol entraînant la contraction cellulaire. Le calcium est ensuite capturé par le réticulum sarcoplasmique ou sort de la cellule grâce à l'échangeur Na^+/Ca^+ (NCX) permettant la relaxation. La recapture du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique est effectuée par la pompe sarco-réticulum endoplasmique Ca^{2+} ATPase (SERCA2a).

La régulation du taux calcique cytoplasmique dépend notamment du phospholamban qui inhibe la pompe SERCA2a. Quand le phospholamban est phosphorylé par la protéine kinase A (PKA) ou par la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante (CamKII), au niveau de la sérine 16 ou de la thréonine 17 respectivement, il se décroche de la pompe SERCA2a qui peut alors pomper du Ca^{2+} du cytoplasme vers le réticulum sarcoplasmique.

b) Facteurs de modification de la force de contraction

Le myocarde est constitué de fibres musculaires composées de myofibrilles caractérisées par des filaments épais et fins. Les filaments épais contiennent de la myosine, protéine structurale et fonctionnelle, constituée d'une queue de deux chaînes polypeptidiques et d'une tête possédant un site de liaison à l'actine, un à l'ATP et une ATPase. Quant aux filaments fins, ils contiennent de l'actine, de la troponine et de la tropomyosine. Le complexe troponine-tropomyosine permet de cacher les sites d'interaction entre actine et myosine quand le muscle est au repos. Quand le calcium augmente en intracellulaire, un changement de conformation a lieu et les sites deviennent accessibles (Fig 7). L'interaction entre la myosine et l'actine permet alors un raccourcissement des sarcomères et par conséquent la contraction.

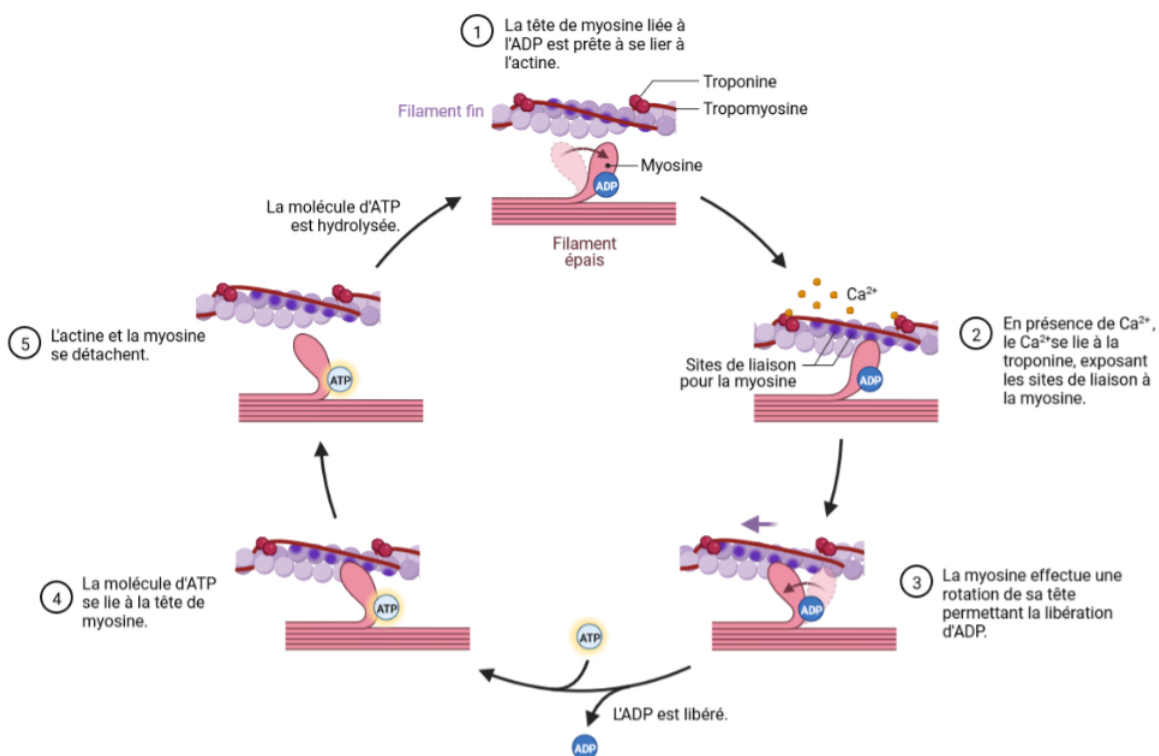


Figure 7 Cycle de liaison myosine-actine

La titine, reliant les filaments épais à la strie Z, permet le maintien de la cellule (Fig 8). Elle a des propriétés élastiques qui permettent au muscle de retrouver sa forme d'origine. La titine existe sous deux isoformes : N2BA est l'isoforme compliant et N2B le rigide.

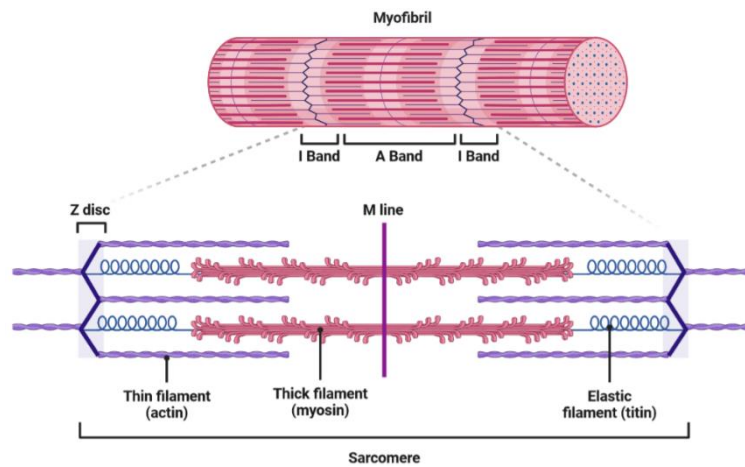


Figure 8 Composition d'un sarcomère

La force de contraction dépend de la quantité de calcium cytosolique qui vient se fixer à la troponine. Une augmentation du calcium cytosolique augmente la force de contraction. Elle est donc responsable d'inotropisme positif. Une diminution du calcium cytosolique diminue la force de contraction. Elle est donc responsable d'un inotropisme négatif.

En outre, plus les fibres myocardiques sont étirées, plus la force de contraction est grande. En effet, plus le cœur contient du sang à l'intérieur du ventricule, plus les fibres sont étirées et plus des ponts de liaisons actine-myosine se feront.

3. Cycle cardiaque

Le cycle cardiaque entraîne des variations de volume et des variations de pression dans le ventricule (Fig 9).

a) Relaxation

La phase de relaxation commence à la fin de la systole ventriculaire. Elle se traduit par l'onde T sur l'électrocardiogramme (ECG) qui correspond à la repolarisation des fibres ventriculaires (relaxation isovolumique du ventricule). Les fibres se relâchent après le retour du calcium au réticulum sarcoplasmique. La pression au niveau du ventricule diminue alors. La baisse de pression dépend de la capacité du ventricule à se relâcher : plus le ventricule se relâche facilement (grande compliance) plus la pression diminue rapidement. Quand la pression du ventricule devient plus basse que la pression dans l'aorte, la valve aortique se ferme, la valve mitrale s'ouvre provoquant le remplissage du ventricule.

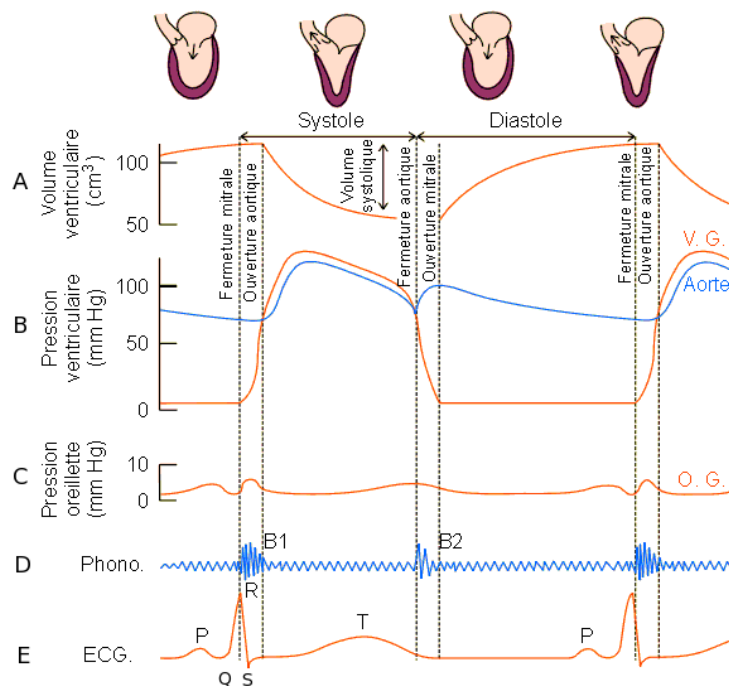


Figure 9 Cycle cardiaque avec pressions et volumes

b) Remplissage ventriculaire

Durant la période de remplissage du ventricule, la valve mitrale reste ouverte et la valve aortique est fermée.

Cette période se divise en 3 temps :

- Le remplissage rapide correspond à une augmentation du volume sanguin dans le ventricule dès l'ouverture de la valve mitrale par succion du sang par le ventricule. C'est un processus rapide qui dépend de la rigidité du ventricule. Le myocarde s'amincit et s'allonge.
- Le diastasis équivaut à un remplissage très lent où le volume de sang dans le ventricule n'augmente pas beaucoup.
- La systole auriculaire est commandée par la naissance d'un influx au niveau du nœud sinusal et se traduit par l'onde P sur l'ECG. L'influx va entraîner la contraction des fibres des oreillettes permettant une augmentation du volume de sang contenu dans le ventricule permettant un apport de sang supplémentaire de 30 mL.

À la fin de la diastole ventriculaire, le volume de sang dans le ventricule est d'environ 135 mL et correspond au volume télédiastolique.

c) Systole ventriculaire

L'influx nerveux arrive au niveau des ventricules et entraîne une dépolarisation des fibres ventriculaires qui vont se contracter. Cela induit immédiatement une augmentation de la pression dans le ventricule. Cette pression devient supérieure à la pression qui règne dans l'OG. Cela entraîne la fermeture de la valve mitrale.

Les quatre valves sont alors fermées, c'est la fin du remplissage et donc de la diastole. On parle de télédiastole. La pression augmente rapidement dans le VG entraînant la contraction ventriculaire sans variation de volume. La contraction est dite isovolumique.

La pression dans le VG va devenir supérieure à la pression dans l'aorte et va ainsi induire l'ouverture de la valve aortique. La paroi myocardique s'épaissit et se raccourcit entraînant une réduction du volume dans le VG permettant l'éjection de sang vers l'aorte et la circulation périphérique.

À la fin de la systole ventriculaire, un volume dans le ventricule d'environ 65 mL reste, c'est le volume téléstolique.

4. Débit cardiaque

a) Définition

Le débit cardiaque correspond au volume de sang éjecté par minute calculé grâce au volume d'éjection systolique multiplié par la fréquence cardiaque (environ 70 mL x 70 à 75 battements/min = 5 L/min).

b) Régulation du débit cardiaque

La régulation va permettre d'adapter le débit aux besoins de l'organisme en O₂. Lors d'un effort, du fait d'une augmentation des besoins en oxygène, le débit cardiaque augmente grâce à une augmentation de la fréquence cardiaque et du volume d'éjection systolique (VES) pouvant atteindre une valeur de 30L/min.

(1) Régulation par le volume d'éjection systolique (VES) et fraction d'éjection

Le débit diminue quand le VES diminue.

Le VES équivaut au volume télédiastolique (VTD) auquel on soustrait le volume téléstolique (VTS). Il correspond au volume sanguin éjecté par le VG à chaque battement cardiaque.

Le VES dépend de 3 facteurs : la précharge, la contractilité intrinsèque et la post-charge. La précharge correspond à l'étirement du cœur avant sa contraction. La post-charge est la charge qui s'exerce au-dessus des valves sigmoïdes aortiques empêchant de les rouvrir et que le cœur doit déplacer pour éjecter le sang contenu dans le ventricule. La contractilité va dépendre des fibres musculaires cardiaques et de la longueur du sarcomère.

Le débit cardiaque diminue donc en cas de diminution de la précharge (hypovolémie, déshydratation) et en cas d'augmentation de la post-charge (hypertension artérielle, rétrécissement aortique, cardiopathie hypertrophique obstructive).

La force de contraction dépend notamment de la loi de Frank Starling. La Loi de Starling stipule que tout étirement des fibres myocardiques entraîne une augmentation de leur contractilité. Ainsi en cas d'augmentation du VTD, il existe une augmentation du VES et donc du débit cardiaque par augmentation de la force de contraction ventriculaire.

Le VES permet de calculer la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) qui correspond au pourcentage d'éjection du sang contenu dans le ventricule gauche lors d'un battement. $FEVG = VES / VTD = (VTD - VTS) / VTD$. Chez l'Homme, elle peut être mesurée par échocardiographie ou imagerie à résonance magnétique (IRM) cardiaque. Chez un individu sain, elle est comprise entre 50 à 70 %.

(2) Régulation de la fréquence cardiaque

La régulation de la fréquence cardiaque est double : nerveuse et hormonale.

La régulation nerveuse dépend du centre cardiovasculaire bulbaire (dans le bulbe rachidien) qui reçoit des informations des barorécepteurs, des chémorécepteurs, des propriorécepteurs et des régions supérieures du cerveau (cortex et système limbique via hypothalamus). Le système nerveux libère des neurotransmetteurs qui ont une action directe sur le cœur en augmentant la fréquence cardiaque et la contractilité des cardiomyocytes. Cette libération de catécholamines a également une action périphérique et entraîne une vasoconstriction augmentant la résistance périphérique totale. La pression artérielle et le débit cardiaque sont alors augmentés.

La régulation hormonale dépend notamment de l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA). Les reins sécrètent la rénine qui clive l'angiotensinogène en angiotensine I qui est convertie en angiotensine II (AngII) par l'enzyme de conversion de l'angiotensine. L'AngII induit une vasoconstriction via son récepteur AT1 ce qui augmente la résistance périphérique totale et en conséquence, la pression artérielle.

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

C. Conclusion

Le cœur agit donc comme une pompe grâce à la propagation d'influx nerveux permettant la contraction des cardiomyocytes suivant un cycle bien précis. Il est essentiel pour assurer la bonne distribution des nutriments via les vaisseaux à tout l'organisme. Une dysfonction d'un des paramètres de la fonction cardiaque peut donc avoir de lourdes conséquences sur la vie des patients en entraînant notamment une insuffisance cardiaque.

II. Insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque (IC) est un problème de santé publique majeur touchant entre 1 et 2 % de la population générale avec une augmentation de la prévalence avec l'âge, l'âge moyen au diagnostic étant de 75 ans. L'IC est une des principales causes de mortalité et d'hospitalisation dans le monde, selon l'OMS. La conséquence la plus grave d'une IC est évidemment le décès du patient. Les complications peuvent être une aggravation fonctionnelle avec un œdème aigu du poumon, une altération des fonctions hépatique et rénale, des complications thrombo-emboliques, des troubles du rythme et une mort subite.

L'insuffisance cardiaque est définie par la Société Européenne de Cardiologie comme un ensemble de symptômes (dyspnées, œdèmes), de signes (tachycardie, crépitations, turgescence jugulaire) et d'altérations structurales ou fonctionnelles du myocarde (cardiomégalie, souffle cardiaque) conduisant à l'incapacité du cœur à fournir un débit adapté aux besoins de l'organisme, à un niveau normal de pressions de remplissage.

On distingue deux types d'IC en fonction de la physiologie de l'atteinte cardiaque :

- IC à FEVG altérée ou réduite <50 % dite systolique (ICFEr)
- IC à FEVG conservée ou préservée ≥50 % dite diastolique (ICFEp).

L'ICFEr est parfois définie avec une FEVG <40 %, les patients ayant une FEVG entre 40 et 50 % ont alors une IC à FEVG dite intermédiaire.

La distinction entre l'ICFEr et l'ICFEp est importante, car elle permet de déterminer les étiologies, les comorbidités et les traitements à instaurer.

A. À fraction d'éjection réduite

L'ICFEr est retrouvée dans environ 50 % des cas d'IC.

1. Physiopathologie

Il s'agit d'une dysfonction systolique du VG où il se contracte mal et se vide mal. Cela entraîne une augmentation du volume et de la pression télédiastolique avec une baisse de la FEVG en dessous de 50 %. Il y a donc de façon concomitante une altération de la fonction systolique et de la fonction diastolique. La première cause de l'ICFEr est l'ischémie myocardique consécutive à l'obstruction d'une artère coronaire. Celle-ci provoque une perte de tissu contractile entraînant une diminution de l'efficacité du cœur à pomper correctement le sang. L'hypertension artérielle (HTA), quant à elle, peut induire une surcharge de pression qui affecte l'éjection du sang.

2. Clinique

Les signes cliniques déterminent le stade d'IC selon la classification de la New York Heart Association (NYHA) (Collège National des enseignants de cardiologie et Société Française de Cardiologie 2015) :

Stade I : absence de dyspnée, palpitations ou fatigue pour les efforts habituels : aucune gêne n'est ressentie dans la vie courante

Stade II : dyspnée, palpitations ou fatigue pour des efforts importants habituels tels que la marche rapide ou en côte, ou la montée des escaliers > 2 étages

Stade III : dyspnée, palpitations ou fatigue pour des efforts peu intenses de la vie courante, tels que la marche en terrain plat ou la montée des escaliers < 2 étages

Stade IV : dyspnée, palpitations ou fatigue permanente de repos ou pour des efforts minimes

3. Traitements

Le traitement pharmacologique de l'ICFcr a pour but de réduire la mortalité, de prévenir les hospitalisations dues à l'aggravation de la maladie et d'améliorer les paramètres cliniques et fonctionnels et la qualité de vie des patients (McDonagh et al. 2021). Le traitement de première intention pour tous les patients atteints d'ICFcr repose sur l'association d'antagonistes du SRAA, de β -bloquants, d'antagonistes du récepteur aux minéralocorticoïdes et des inhibiteurs du cotransporteur 2 sodium-glucose (SGLT2). En fonction des symptômes et du stade de l'IC, un diurétique de l'anse de Henlé, un inhibiteur des canaux If (ivabradine), un stimulateur de la guanylate cyclase (vericiguat), de l'hydralazine ou de la digoxine peuvent être ajoutés.

En cas d'IC sévère (stade III ou IV) ou en fonction des antécédents, des traitements non médicamenteux sont possibles. Il peut s'agir d'une resynchronisation ventriculaire par un stimulateur biventriculaire, d'un défibrillateur automatique implantable, d'une transplantation, ou d'une assistance ventriculaire.

Les traitements médicamenteux sont associés à des mesures hygiéno-diététiques. Elles correspondent, entre autres, à une restriction sodée modérée (<6 g/j), à diminuer, voire arrêter l'alcool, à arrêter le tabac et à pratiquer une activité physique (30 min/j).

a) Médicaments agissant sur le SRAA

Il existe plusieurs médicaments agissant sur le SRAA, notamment les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) et les antagonistes du récepteur AT1 de l'angiotensine II (ARAII).

Les IEC agissent en empêchant la conversion de l'angiotensine I en AngII. Les ARAII sont, quant à eux, des antagonistes compétitifs, réversibles et sélectifs du récepteur AT1 à l'AngII. Ils permettent ainsi la diminution de la synthèse d'AngII pour les IEC ou la diminution des effets de l'AngII pour les ARAII, ce qui induit un effet antihypertenseur. Dans l'IC, ils limitent les effets néfastes de l'activation chronique du SRAA. Ils diminuent, en effet, les effets vasoconstricteurs de l'AngII ce qui permet une diminution de la précharge et de la postcharge. Ils abaissent également les taux d'aldostérone permettant la réduction des œdèmes. Enfin, ils atténuent le remodelage cardiaque et en conséquence, l'hypertrophie cardiaque. Les IEC réduisent la mortalité et la morbidité des patients atteints d'ICFcr. Ils améliorent aussi les symptômes. Ils sont recommandés chez tous les patients insuffisants cardiaques (McDonagh et al. 2021). Les IEC peuvent être remplacés par les ARAII en cas d'effets indésirables ou de contre-indications.

Les IEC et les ARAII peuvent être associés avec un inhibiteur de néprilysine. Les inhibiteurs de néprilysine augmentent les peptides natriurétiques dégradés par la néprilysine. Ces peptides activent des récepteurs membranaires à activité guanylate cyclase (GC) entraînant une augmentation des concentrations en guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Cette action permet une vasodilatation, une diurèse et natriurèse, une augmentation de la filtration glomérulaire, une inhibition de rénine et d'aldostérone ainsi qu'une diminution de l'activité sympathique, et des effets anti-hypertrophique et anti-fibrotique (« Fiche info - ENTRESTO 24 mg/26 mg, comprimé pelliculé - Base de données publique des médicaments » s. d.).

L'association d'un IEC ou d'un ARAII avec un inhibiteur de la néprilysine, comme le sacubitril/valsartan, permet d'ainsi réduire davantage les réhospitalisations et la mortalité cardiovasculaire.

b) B-bloquants

Les β -bloquants sont des antagonistes compétitifs et réversibles des récepteurs β -adrénergiques. Ils ont des effets chronotrope, inotrope, bathmotrope et dromotrope négatifs en agissant sur les récepteurs β 1 du cœur. Ils diminuent également la sécrétion de rénine en bloquant les récepteurs β 1 du rein. Les β -bloquants ont ainsi des propriétés antihypertensives.

Les β -bloquants réduisent également la mortalité, la morbidité et améliorent les symptômes quand ils sont associés avec les IEC (McDonagh et al. 2021).

c) Antagonistes du récepteur aux minéralocorticoïdes

Les antagonistes du récepteur aux minéralocorticoïdes comme la spironolactone ou l'éplérénone sont des diurétiques qui inhibent la réabsorption du sodium au niveau du tube collecteur du tubule rénal. La spironolactone bloque le récepteur auquel se lie l'aldostérone, mais aussi d'autres hormones stéroïdiennes alors que l'éplérénone est plus spécifique de l'aldostérone. Dans l'IC, ces deux molécules diminuent la volémie et le retour veineux entraînant une diminution de la précharge et de la pression télédiastolique du VG. Ils sont donc bénéfiques en cas d'œdèmes ou de congestion pulmonaire. Ils ont également un effet hypotenseur (McDonagh et al. 2021).

Les antagonistes de l'aldostérone sont recommandés en association aux IEC et aux β -bloquants pour réduire la mortalité et le risque de réhospitalisations.

d) Inhibiteurs du SGLT2

Le SGLT2 est un cotransporteur principalement exprimé dans les cellules du tubule proximal rénal. Les inhibiteurs du SGLT2 appelés aussi gliflozines réduisent la réabsorption rénale du glucose en augmentant son excrétion urinaire et diminuent ainsi la glycémie. Ils sont indiqués dans le diabète de type 2 et plus récemment dans l'IC. L'empagliflozine a d'abord démontré des bénéfices cardiovasculaires dans l'essai clinique EMPAREG-OUTCOME (Sarafidis 2016) dans un contexte de diabète puis dans l'ICFER avec l'essai clinique EMPEROR-Reduced. Ce dernier révèle que l'empagliflozine réduit le nombre de décès cardiovasculaires et le nombre d'hospitalisations pour IC et améliore la qualité de vie (Butler et al. 2021; Zannad et al. 2020). L'essai DAPA-HF a également montré

que le traitement par la dapagliflozine entraîne une réduction du risque d'aggravation de l'insuffisance cardiaque et du risque de décès cardiovasculaire. De plus, la dapagliflozine réduit la mortalité toutes causes confondues (McMurray et al. 2019), atténue les symptômes de l'IC, améliore la fonction physique et la qualité de vie chez les patients atteints d'ICFEr symptomatique (Kosiborod et al. 2020). Les propriétés diurétiques/natriurétiques des inhibiteurs du SGLT2 permettent également une réduction de la congestion (Jackson et al. 2020). Par conséquent, la dapagliflozine ou l'empagliflozine sont recommandées, en plus d'un IEC ± inhibiteur de néprilysine, d'un β -bloquant et d'un antagoniste de l'aldostérone, pour les patients atteints d'ICFEr.

Cependant, le mécanisme des inhibiteurs du SGLT2 dans l'IC reste à élucider.

B. À fraction d'éjection préservée

1. Épidémiologie

Les patients atteints d'ICFEp représentent environ 50 % des patients ayant une IC et sont souvent âgés (au-dessus de 65 ans), de sexe féminin, et présentent fréquemment une HTA et une fibrillation auriculaire (FA) associée. La prévalence de l'ICFEp ne cesse de croître, d'environ 1 % par an, et devient ainsi le phénotype d'IC le plus courant, induisant ainsi une augmentation de la mortalité, des hospitalisations et des frais de prise en charge. Les autres facteurs de risque associés sont le plus souvent l'obésité et le diabète de type 2. Ces comorbidités sont associées à une augmentation du risque de développer des maladies cardiovasculaires. Les patients atteints d'ICFEp présentent fréquemment plusieurs de ces comorbidités en même temps. La prévalence élevée de ces comorbidités suggère qu'elles jouent un rôle dans le développement de la maladie.

2. Complications et pronostic

En rapportant le pronostic vital de l'ICFEp à l'âge, au sexe et aux autres facteurs de risque cardiovasculaires (FRCV), celui-ci apparaît moins sévère que dans l'ICFEr. Il y a moins de mortalité chez les patients atteints d'ICFEp que chez les patients atteints d'ICFEr. En revanche, il y a plus de réadmissions pour hospitalisation (Lam et al. 2018). Ce fort taux de réhospitalisations est probablement dû au manque d'options thérapeutiques actuel.

En outre, la mortalité non cardiovasculaire est plus élevée que la mortalité due à des causes cardiaques, contrairement à l'ICFEr. Cette différence est due à l'ensemble des facteurs de risque, cardiovasculaires, mais aussi non cardiovasculaires, très présents chez les patients atteints d'ICFEp (Loungani et al. 2020).

3. Diagnostic

Le diagnostic d'ICFEp est plus difficile que celui d'ICFEr, car c'est un diagnostic d'exclusion.

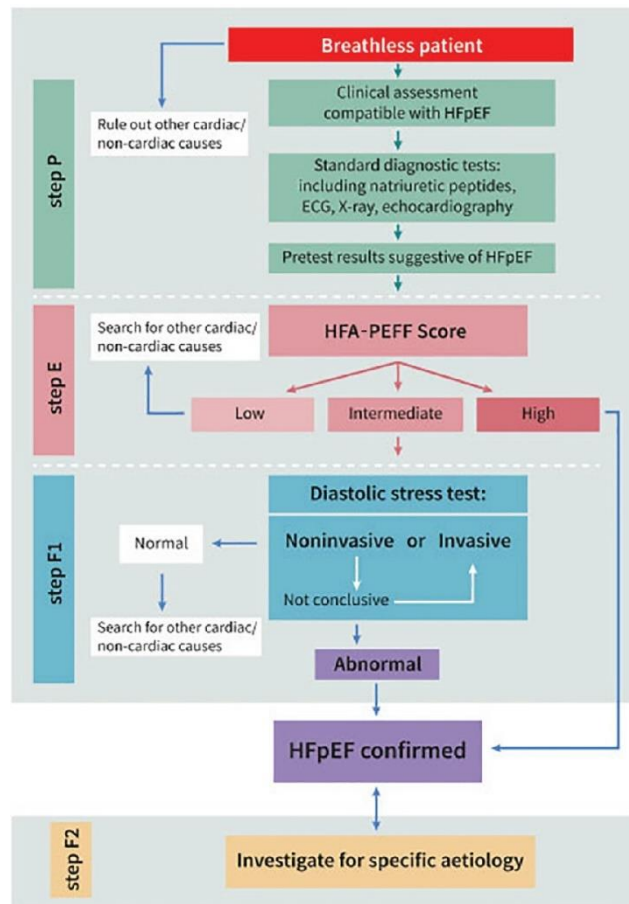


Figure 10 Organigramme de l’algorithme diagnostique HFA-PEFF (Pieske et al. 2019)

Le diagnostic global de l’ICFEp repose sur l’algorithme HFA-PEFF (Pieske et al. 2019) qui se compose :

- d’un prétest avec établissement des symptômes cliniques, des comorbidités, de l’ECG, de l’échographie cardiaque, du dosage des peptides natriurétiques et éventuellement d’un test d’effort (étape P, Fig 10),
- du diagnostic d’ICFEp avec mesures échographiques précises et dosage des peptides natriurétiques, si non réalisé lors du prétest (étape E, Fig 10),
- d’une phase de tests fonctionnels, si le diagnostic reste incertain, avec échographie de stress et mesures hémodynamiques invasives (étape F1, Fig 10),
- d’une recherche d’étiologie grâce à l’IRM, aux biopsies, à des tests génétiques... (étape F2, Fig 10) (2019_Pieske).

Cet algorithme permet d’établir un score en fonction de critères majeurs et mineurs fonctionnels, morphologiques, et biomarqueurs lors de l’étape E (Fig 11).

	Functional	Morphological	Biomarker (SR)	Biomarker (AF)
Major	septal e' < 7 cm/s or lateral e' < 10 cm/s or Average E/e' ≥ 15 or TR velocity > 2.8 m/s (PASP > 35 mmHg)	LAVI > 34 ml/m ² or LVMI ≥ 149/122 g/m ² (m/w) and RWT > 0,42 #	NT-proBNP > 220 pg/ml or BNP > 80 pg/ml	NT-proBNP > 660 pg/ml or BNP > 240 pg/ml
Minor	Average E/e' 9 -14 or GLS < 16 %	LAVI 29-34 ml/m ² or LVMI > 115/95 g/m ² (m/w) or RWT > 0,42 or LV wall thickness ≥ 12 mm	NT-proBNP 125-220 pg/ml or BNP 35-80 pg/ml	NT-proBNP 365-660 pg/ml or BNP 105-240 pg/ml
	Major Criteria: 2 points	≥ 5 points: HFpEF		
	Minor Criteria: 1 point	2-4 points: Diastolic Stress Test or Invasive Haemodynamic Measurements		

Figure 11 Système de notation pour le diagnostic (Pieske et al. 2019)

a) Clinique

Les signes et symptômes de l'ICFEp sont similaires à ceux de l'ICFEr : dyspnée d'effort ou intolérance à l'exercice, orthopnée, dyspnée nocturne paroxystique, surcharge pulmonaire, dilatation veineuse avec turgescence jugulaire, œdèmes périphériques. D'autres signes peuvent être associés tels qu'une HTA ou une arythmie comme une FA visible à l'ECG.

b) Biologique

Le dosage principal à réaliser pour le diagnostic d'IC est la mesure de la concentration sanguine de peptides natriurétiques. La concentration des peptides natriurétiques augmente fortement en cas d'insuffisance cardiaque aiguë. Elle augmente également, mais plus légèrement, en cas d'insuffisance cardiaque chronique, dans un contexte de FA, avec l'âge et en présence d'une insuffisance rénale et diminue en cas d'obésité. Les peptides natriurétiques les plus souvent dosés sont le BNP et le N-terminal-pro Brain Natriuretic Peptide (NT-proBNP). Ces peptides sont synthétisés et libérés dans la circulation par les cardiomyocytes lorsqu'ils sont étirés (donc en présence d'une augmentation de pression à l'intérieur des cavités).

Si le BNP est inférieur à 35 pg.mL⁻¹ ou le NT-proBNP à 125 pg.mL⁻¹, le diagnostic d'IC est peu probable. Au contraire, si le BNP est supérieur à 80 pg.mL⁻¹ ou le NT-proBNP à 220 pg.mL⁻¹ chez un patient en rythme sinusal, le diagnostic d'IC est très probable. Mais un BNP normal n'exclut pas l'ICFEp, l'interprétation doit donc tenir compte des données cliniques.

On peut aussi réaliser un ionogramme (natrémie, kaliémie), un bilan rénal (urémie, créatininémie, calcul du débit de filtration glomérulaire [DFG]), un bilan hépatique (transaminases, créatine kinase), un hémogramme (numération formule sanguine [NFS], plaquettes) ainsi qu'une glycémie afin d'évaluer les FRCV et comorbidités associés.

c) Imagerie

(1) Échocardiographie transthoracique

L'examen recommandé par l'European Society of Cardiology pour le diagnostic de l'ICFEp et de l'IC en général est l'échographie transthoracique. Elle informe sur l'anatomie cardiaque notamment sur la taille des cavités en fonction des diamètres (diastolique et systolique) et sur les volumes (télédiastolique ou télésystolique). L'échographie permet également d'évaluer les fonctions : fonction systolique du VG mesurée par la fraction de raccourcissement ou la FEVG et fonction du VD. Elle renseigne aussi sur l'aspect des valves et sur le niveau des pressions de remplissage via le doppler. C'est une méthode non invasive et indirecte, car elle ne mesure pas directement les paramètres de relaxation et de compliance.

L'échocardiographie en cas d'ICFEp présente une FEVG $\geq 45-50\%$, des volumes ventriculaires gauches normaux, ainsi qu'une dysfonction diastolique. La dysfonction diastolique est définie échographiquement par une augmentation des pressions de remplissage et par une dilatation de l'oreillette gauche pouvant être associées à une hypertrophie du VG. Elle est mise en évidence par l'échographie Doppler. Elle se traduit par des modifications des flux de remplissage que l'on peut observer dans les veines pulmonaires et les veines caves, ou à travers la valve mitrale et la valve tricuspide. La vélocité d'un flux de remplissage est proportionnelle au gradient de pression. Elle reflète ainsi la pression régnant dans les différentes veines et les oreillettes du cœur.

Les paramètres étudiés sont l'onde E et l'onde A. L'onde E, en protodiastole, correspond au remplissage actif du VG. L'onde A, en télédiastole, correspond au remplissage passif du VG. Le rapport E/A reflète ainsi les pressions de remplissage du VG et permet de détecter un trouble de la relaxation (Fig 12).

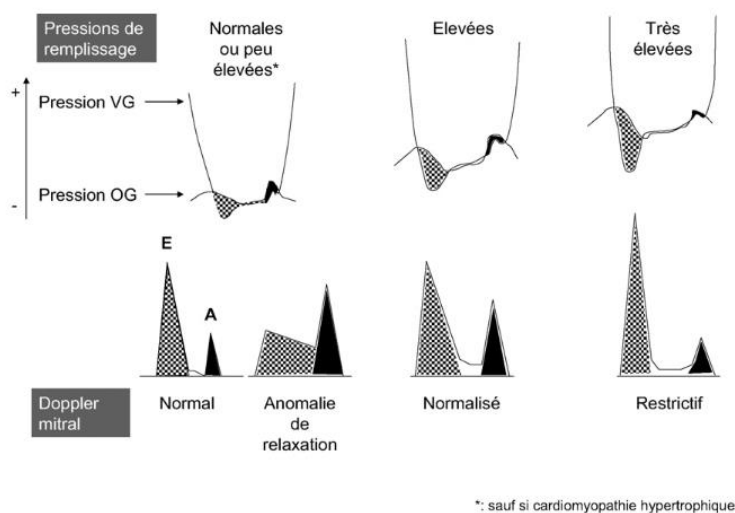


Figure 12 Influence des pressions de remplissage sur le profil du doppler mitral (Vignon 2007)

On note aussi une augmentation de l'épaisseur de la paroi postérieure du VG chez 25 à 50 % des patients atteints d'ICFEp et une augmentation du diamètre de l'OG dans environ 60 % des cas, signes d'augmentation des pressions de remplissage (« Biological Phenotypes of Heart Failure With Preserved

Ejection Fraction | Elsevier Enhanced Reader » s. d.). La mesure de la taille de l'OG est importante, car elle joue un rôle dans la fonction diastolique en modulant le remplissage du VG. La diminution du remplissage due à l'augmentation des pressions est compensée par une contraction des oreillettes plus importante. Le diamètre de l'OG est alors augmenté.

Le temps de relaxation isovolumique (IVRT) peut aussi être mesuré grâce au Doppler. Il correspond au temps entre la fermeture de la valve aortique et l'ouverture de la valve mitrale. L'IVRT dépend de la post-charge et de la fréquence cardiaque. Il permet de repérer précocement une relaxation altérée.

(2) IRM cardiaque

L'IRM permet l'étude de la fonction cardiaque en évaluant notamment la cinétique myocardique. Elle permet également de mesurer l'épaisseur du myocarde, de quantifier la fraction d'éjection, de calculer la masse myocardique, de vérifier le jeu des valves et de voir s'il y a un épanchement péricardique. En utilisant une séquence en T2, l'IRM permet de voir la présence ou non d'un œdème. Les séquences de rehaussement tardif quant à elles permettent de mettre en évidence les zones d'augmentation anormale de volume extracellulaire comme la fibrose ou les séquelles d'infarctus. Pour cibler spécifiquement la fibrose, des nanoparticules USPIO (Ultra small Super Paramagnetic Iron Oxide) couplées à la collagelin peuvent être utilisées (Belkahl et al. 2020). Après administration d'un produit de contraste, la perfusion peut également être évaluée.

L'IRM cardiaque a révélé que 96 % des patients atteints d'ICFEP présentent au moins une région altérée avec défaut d'oxygénation (Fischer et al. 2022). Cet examen a également montré que 83 % des patients atteints d'ICFEP présentent un volume extracellulaire accru (cartographie T1) reflétant une teneur en eau élevée ou une charge fibrotique élevée (Löffler et al. 2019). La cartographie T2 suggère que 66 % des patients présentent en fait un œdème myocardique. Une réserve d'oxygénation myocardique atténuée était associée à un œdème myocardique et à un dysfonctionnement diastolique (Fischer et al. 2022).

Cependant, l'IRM cardiaque n'est pas réalisée de façon systématique en clinique.

d) Cathétérisme droit-gauche

Le cathétérisme consiste à introduire un cathéter directement dans le cœur, dans les différentes cavités afin de mesurer les pressions et volumes de remplissage. Cet examen est dit « gold-standard » selon l'American Heart Association, car c'est le seul test permettant de mesurer directement ces paramètres. Il permet d'obtenir, entre autres, la pression télédiastolique dans le VG, la constante de relaxation isovolumique tau et le dP/dt_{min} pour évaluer la relaxation, l'index de contractilité et le dP/dt_{max} pour évaluer la contractilité.

Ces paramètres permettent d'établir une courbe pression-volume (Fig 13). En cas d'ICFEP, il y a une augmentation de la résistance au remplissage ventriculaire menant à des symptômes de congestion qui se traduit par un déplacement inapproprié de la relation pression-volume diastolique, en particulier pendant l'effort (Brutsaert, Sys, et Gillebert 1993).

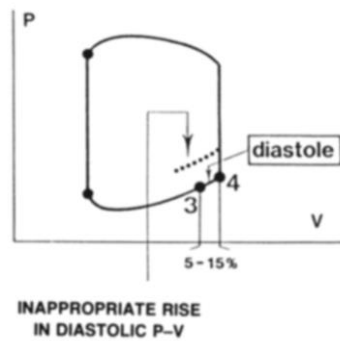


Figure 13 Courbe pression-volume (Brutsaert, Sys, et Gillebert 1993)

4. Physiopathologie

La physiopathologie de l'ICFep reste mal connue. Ces principaux mécanismes sont :

- des altérations hémodynamiques avec notamment une dysfonction diastolique pouvant être accompagnée d'une hypertrophie ventriculaire
- une dysfonction endothéliale avec une inflammation ainsi que des changements structuraux cellulaires et extracellulaires (changement d'isoforme de la titine et développement de fibrose par exemple) (Lam et al. 2018).

a) Dysfonction diastolique

En temps normal, le ventricule se remplit sans augmentation importante de pression, au repos comme à l'exercice. La dysfonction diastolique est caractérisée par une anomalie des mesures du remplissage ventriculaire avec élévation des pressions de remplissage pour les mêmes volumes ventriculaires.

Dans la dysfonction diastolique, la relaxation active ou la compliance passive sont altérées. Ainsi, le remplissage du VG ne dépend plus de son effet de succion et de sa souplesse, mais de la pression dans l'oreillette qui doit pousser le sang dans le ventricule. La relaxation, qui s'accélère normalement à l'effort, ne permet plus un remplissage rapide et la capacité d'exercice s'effondre (Borlaug 2014). Au lieu de 20 % normalement, le remplissage par la contraction auriculaire contribue pour 40-50 % au remplissage total (Kumar et al. 2011).

La fonction diastolique ventriculaire gauche dépend de la rigidité myocardique et de la fonction de l'OG. Physiologiquement, la rigidité dépend de la matrice extracellulaire (MEC) et des cardiomyocytes.

(1) Compliance

(a) Matrice extracellulaire (MEC)

La compliance du myocarde dépend du collagène sécrété par la MEC. La MEC est aussi constituée d'élastine, de laminine et de fibronectine. Un déséquilibre dans sa composition peut entraîner une

mauvaise compliance. En cas d'ICFEP, on peut, en effet, observer un excès de collagène qui augmente la rigidité (Burlew et Weber 2002; González et al. 2010; Ahmed et al. 2006).

Cette abondance de collagène peut être due à une synthèse accrue et une dégradation diminuée. En effet, des excès de dépôts de collagène sont retrouvés, car il y a une sous-régulation des métalloprotéinases matricielles (MMP) et une surrégulation de leurs inhibiteurs (TIMP). En outre, des cross-links entre les fibres de collagène peuvent se faire. Ce phénomène est induit par la lysyl oxydase (LOX) et augmente davantage la rigidité du myocarde.

L'excès de collagène et de fibrose rigidifie et épaissit la paroi ventriculaire ayant pour conséquence une augmentation de la pression de remplissage en télédiastole pour le même volume ventriculaire.

La présence d'une fibrose chez les patients atteints d'ICFEP a été vérifiée par une analyse histologique effectuée sur des biopsies cardiaques (Mohammed et al. 2015).

(b) Remodelage du cytosquelette (titine)

La rigidité myocardique accrue peut aussi être due à un défaut de phosphorylation au niveau de la titine ou à un changement du ratio des isomères de cette protéine (Linke et Hamdani 2014). La titine est une grosse protéine du cytosquelette des cardiomyocytes contribuant à l'effet ressort bidirectionnel lors de la contraction-relaxation du cœur. Elle permet l'ancrage de la myosine au disque Z dans le sarcomère. Dans l'ICFEP, le ratio des isomères N2A compliant et N2BA rigide peut être modifié, entraînant une augmentation de la sensibilité des myofibrilles au calcium. Cela entraîne une augmentation de la rigidité des cardiomyocytes et donc une rigidité du myocarde et du VG plus généralement. Il peut aussi exister un défaut de phosphorylation de la titine par la PKA ou la protéine kinase G (PKG) augmentant la rigidité de la titine et empêchant la relaxation du sarcomère (Borbély et al., 2009; Hamdani, Franssen, et al. 2013).

(2) Relaxation active

La relaxation active des cardiomyocytes est dépendante de la recapture du calcium par le réticulum sarcoplasmique pour la dissociation des myofilaments. Cette recapture est effectuée par la pompe SERCA2a associée au phospholamban. Le niveau d'expression de cette pompe diminue avec l'âge entraînant une relaxation altérée (Cain et al., 1998). Dans l'ICFEP, la dysfonction diastolique est associée à une diminution de l'expression de la pompe SERCA2a et d'un défaut de phosphorylation du phospholamban (van der Velden 2011).

b) Hypertrophie ventriculaire

Dans l'ICFEP, dans un à deux tiers des cas (« Biological Phenotypes of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction | Elsevier Enhanced Reader » s. d.), il existe un remodelage : une hypertrophie ventriculaire gauche concentrique caractérisée par une augmentation du diamètre des cardiomyocytes sans modification de leur longueur. Il y a épaississement des parois pour compenser l'augmentation de la pression systolique. Selon la loi de Laplace, la contrainte se définit comme la

pression multipliée par le rayon de la cavité divisé par l'épaisseur. L'augmentation d'épaisseur des parois permet de normaliser la contrainte de la paroi ventriculaire. L'hypertrophie peut être adaptative, chez les sportifs par exemple, ou mal adaptative. Cette dernière peut avoir un effet délétère, car elle augmente le travail cardiaque et la rigidité des parois.

c) Dysfonction endothéliale

Il a été démontré que les patients atteints d'ICFEP ont une fonction endothéliale systémique altérée. Cela a été mis en évidence par la mesure de la dilatation médiée par le flux de l'artère brachiale (Maréchaux et al. 2016). En effet, 70 à 75 % des patients atteints d'ICFEP présentent une réserve de flux myocardique coronaire inférieure à celle des patients sains à l'échographie, l'angiographie (Sucato et al. 2015), au scanner (Srivaratharajah et al. 2016), et à l'IRM (Kato et al. 2016; Löffler et al. 2019). Le cathétérisme cardiaque a également révélé que les patients atteints d'ICFEP ont un indice moyen de résistance microvasculaire plus élevé par rapport aux témoins.

L'essai clinique PROMIS-HFpEF a montré une prévalence importante de dysfonction microvasculaire dans l'ICFEP, évaluée par la réserve de flux coronaire. La dysfonction microvasculaire est corrélée aux marqueurs de la sévérité de l'IC (Shah et al. 2018). Plus précisément, parmi les patients atteints d'ICFEP présentant une maladie coronaire microvasculaire (72 %), il a été démontré que 29 % présentent une dysfonction microvasculaire dépendante de l'endothélium (vasodilatation induite par l'ACh) et 33 % une dysfonction microvasculaire indépendante de l'endothélium (vasodilatation induite par l'adénosine) (J. H. Yang et al. 2020).

La présence d'une maladie microvasculaire chez les patients atteints d'ICFEP a été vérifiée par une analyse histologique effectuée sur des biopsies cardiaques. Les biopsies cardiaques ont révélé que les patients atteints d'ICFEP ont une densité microvasculaire cardiaque réduite (Mohammed et al. 2015). De plus, les niveaux d'expression de la E-sélectine (SELE) et de la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM1) sont accrus et l'expression de la NADPH oxydase 2 (NOX2) est élevée dans les macrophages et les cellules endothéliales (CE), mais pas dans les cardiomyocytes. Un découplage de la Nitric oxide synthase endothéliale (NOS3) a aussi été retrouvé. Il est associé à une réduction de la voie NO/GMPc/PKG (Franssen et al. 2016). Les niveaux circulants de E-sélectine et d'ICAM1 chez les jeunes adultes sont associés à de moins bons indices de la fonction systolique du VG plus tard, montrant que l'activation endothéliale survenant avant les signes de l'ICFEP peut être responsable de la dysfonction cardiaque (Patel et al. 2020).

d) Inflammation

Les cellules inflammatoires présentes dans le cœur sont des cellules soit résidentes soit infiltrées. Il s'agit des macrophages, des mastocytes, des monocytes, des polynucléaires neutrophiles, des polynucléaires éosinophiles, des lymphocytes B et des lymphocytes T (Swirski et Nahrendorf 2018).

Les patients atteints d'ICFEP présentent une inflammation systémique mise en évidence par une augmentation des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 6 (IL-6) et le TNF α (Collier et al. 2011) ainsi qu'une augmentation des leucocytes CD45 à la fois au niveau plasmatique et au niveau tissulaire (Westermann et al. 2011; Hulsmans et al. 2018).

Les mastocytes ont un rôle important dans les maladies cardiaques (Indhirajanti et al. 2018), les IgE également (Z. Xu et al. 2018), notamment dans l'IC en promouvant l'hypertrophie et la fibrose cardiaque (Shiota et al. 2003). Les patients atteints de mastocytose sont, en effet, plus à risque de maladie cardiovasculaire. Cependant, le rôle de l'inflammation dans l'ICFEp reste encore mal compris et reste à élucider.

5. Traitements

Contrairement au traitement de l'ICFEr, le traitement de l'ICFEp n'est pas encore bien défini. Il repose sur le traitement des facteurs déclenchants et comorbidités : HTA, FA, surcharges volumiques. Pour l'instant, aucun traitement ne permet de réduire significativement la morbidité ou la mortalité chez les patients atteints d'ICFEp. Seuls les inhibiteurs du SGLT2 permettent de réduire les réhospitalisations. L'objectif du traitement actuel est d'atténuer les symptômes et d'augmenter la qualité de vie.

a) Traitements actuels

(1) Non pharmacologiques

Il est recommandé de pratiquer une activité physique régulière et de suivre les mêmes règles hygiéno-diététiques que celles énoncées pour l'ICFEr.

(2) Pharmacologiques

La prise en charge actuelle des patients ICFEp comprend, pour l'instant, le traitement des étiologies et des comorbidités associé aux diurétiques pour les patients congestionnés afin d'atténuer les symptômes (McDonagh et al. 2021).

(a) Traitement des comorbidités

Le traitement des comorbidités (Fig 14) correspond au traitement de l'hypertension par des médicaments agissant sur le SRAA, de l'hypercholestérolémie par des statines chez les patients à haut risque de maladies cardiovasculaires, du diabète par un inhibiteur du SGLT2 pour prévenir les réhospitalisations (McDonagh et al. 2021).

Recommendations	Class ^a	Level ^b
Treatment of hypertension is recommended to prevent or delay the onset of HF, and to prevent HF hospitalizations. ^{287–290}	I	A
Treatment with statins is recommended in patients at high risk of CV disease or with CV disease in order to prevent or delay the onset of HF, and to prevent HF hospitalizations. ^{291,292}	I	A
SGLT2 inhibitors (canagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin, sotagliflozin) are recommended in patients with diabetes at high risk of CV disease or with CV disease in order to prevent HF hospitalizations. ^{293–297}	I	A
Counselling against sedentary habit, obesity, cigarette smoking, and alcohol abuse is recommended to prevent or delay the onset of HF. ^{298–302}	I	C

CV = cardiovascular; HF = heart failure; SGLT2 = sodium-glucose co-transporter 2.
^aClass of recommendation.
^bLevel of evidence.

Figure 14 Recommandations pour la prévention des FRCV des patients avec ICFEp (McDonagh et al. 2021)

(b) Inhibiteurs du SGLT2

Pour l’instant, les gliflozines sont le seul traitement bénéfique dans l’ICFep.

Dans l’ICFep, l’empagliflozine est le premier médicament qui a montré une réduction des hospitalisations des patients atteints d’ICFep dans l’essai clinique EMPEROR-Preserved (Anker et al. 2021). Il a, en effet, été démontré que l’empagliflozine améliore la fonction diastolique en réduisant le volume télédiastolique du VG et les rapports E/A et E/e' chez les patients (Cohen et al. 2019 ; Sakai et Miura 2019). Cependant, le mécanisme par lequel les inhibiteurs du SGLT2 améliorent la fonction cardiaque reste inconnu (Pabel et al. 2018). L’empagliflozine pourrait améliorer la fonction cardiaque en améliorant les facteurs de risque cardiovasculaires de l’ICFep. L’empagliflozine réduit, en effet, la pression artérielle systolique et diastolique chez les patients atteints de diabète de type 2 et d’ICFep (Sakai et Miura 2019 ; Chilton et al. 2015). De même, il a également été démontré qu’elle réduisait les taux de triglycérides, de cholestérol, de glucose et d’HbA1c chez les patients (Sakai et Miura 2019). L’effet bénéfique des gliflozines dans l’ICFep a été confirmé dans les essais cliniques PRESERVED-HF et CHIEF-HF dans lesquels la dapagliflozine (Nassif et al. 2021) et la canagliflozine (Spertus et al. 2022) ont montré l’augmentation du score total du Kansas City Cardiomyopathy Questionnaire (KCCQ) évaluant les symptômes et l’amélioration au test d’effort.

Premièrement, l'empagliflozine réduit les FRCV en diminuant les marqueurs de dyslipidémie et glycémie chez les modèles animaux atteints de diabète et d'ICFep (Connelly et al. 2019). En provoquant une natriurèse significative, l'empagliflozine améliore aussi la volémie (Griffin et al. 2020).

Deuxièmement, l'empagliflozine pourrait améliorer la rigidité passive des cardiomyocytes. Elle diminue notamment les taux de sodium et de calcium cytosoliques dans des fibres myocardiques isolées et en inhibant l'échangeur Na^+/H^+ 1 (NHE1) (Baartscheer et al. 2017) et peut augmenter la phosphorylation de la titine et des protéines régulatrices des myofilaments (Pabel et al. 2018; Kolijn et al. 2021).

De plus, l'empagliflozine pourrait augmenter la biodisponibilité du NO. Il a notamment été démontré qu'elle favorise la phosphorylation de la NOS3 au niveau de la sérine 1177 (Oelze et al. 2014), et qu'elle augmente les niveaux de la guanylate cyclase soluble (GCs), de la protéine kinase 1 dépendante du GMPc (PRKG1) et du GMPc (Kolijn et al. 2021; Xue et al. 2019). L'empagliflozine améliore ainsi la vasodilatation dépendante de l'endothélium induite par l'ACh (Oelze et al. 2014 ; Lin et al. 2014 ; Aroor et al. 2018). Il a été également démontré que l'empagliflozine prévient l'accumulation de d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans des modèles animaux de diabète (Oelze et al. 2014 ; Lin et al. 2014 ; Kusaka et al. 2016). L'empagliflozine prévient notamment l'accumulation d'ERO induite par le $\text{TNF}\alpha$ dans les CE microvasculaires cardiaques humaines et prévient l'altération de la relaxation par les cardiomyocytes (Juni et al. 2019).

Enfin, il a été démontré que l'empagliflozine prévient la fibrose cardiaque chez des souris diabétiques *Lepr^{db/db}* (Habibi et al. 2017 ; Xue et al. 2019), chez des rats prédiabétiques (Kusaka et al. 2016) et chez des rats non diabétiques (Byrne et al. 2020), probablement par une régulation négative du $\text{TGF}\beta$ 1 (Xue et al. 2019; Byrne et al. 2020). La diminution de la fibrose est associée à une diminution de l'inflammation, notamment une diminution des macrophages CD68 et de plusieurs cytokines inflammatoires, dont l'IL-6, le CCL2 et le $\text{TNF}\alpha$ (Oelze et al. 2014 ; Lin et al. 2014 ; Kusaka et al. 2016).

b) Traitements envisagés : thérapies anti-inflammatoires

L'inflammation étant au centre de la physiopathologie de l'ICFep, il pourrait être intéressant de la cibler et de la traiter avec des anti-inflammatoires.

(1) Colchicine

Dans l'insuffisance cardiaque, son efficacité n'a pas encore été démontrée. L'inflammation systémique jouant un rôle majeur dans la physiopathologie de l'ICFep, la colchicine pourrait avoir toute sa place dans la prise en charge thérapeutique de la maladie. Elle est d'ailleurs étudiée dans un essai clinique actuellement : Colchicine in HFpEF (COLPEF) où les patients reçoivent de la colchicine à la dose de 0,5 mg/jour. Les patients sont tous atteints d'ICFep (n = 426) et sont suivis pendant 6 mois. Leur protéine C réactive (CRP) est évaluée régulièrement pour mesurer l'efficacité du traitement sur l'inflammation (Montreal Heart Institute 2022).

La colchicine est un anti-inflammatoire utilisé dans la crise de goutte. La colchicine inhibe la motilité des polynucléaires neutrophiles par effet anti-tubuline. Elle diminue ainsi l'afflux leucocytaire, inhibe la phagocytose des microcristaux d'urate et freine la production d'acide lactique en maintenant le pH local normal. L'acidité favorisant la précipitation des cristaux d'urate est la première cause de la goutte. Elle est donc indiquée dans les formes aiguës de goutte, en traitement symptomatique et préventif, mais aussi dans la chondrocalcinose, le rhumatisme à hydroxyapatite, la maladie périodique et la maladie de Behçet. Elle est, en outre, déjà utilisée en cardiologie. Elle est, en effet, indiquée en traitement de la péricardite aiguë idiopathique en association aux traitements anti-inflammatoires conventionnels.

Son intérêt thérapeutique dans les maladies cardiovasculaires a été démontré dans plusieurs études. Notamment dans un contexte d'athérosclérose où la colchicine diminue le risque d'événements cardiovasculaires, dont l'infarctus du myocarde (Nidorf et al. 2020), en diminuant la CRP sanguine (Raju et al. 2012) et les cytokines pro-inflammatoires des patients (Martínez et al. 2015). Elle permet ainsi de réduire la plaque d'athérome (Vaidya et al. 2018).

En outre, la colchicine diminue le risque de récurrence de péricardite et est donc largement utilisée dans ce contexte (Imazio 2011; Imazio, Bobbio, Cecchi, Demarie, Pomari, et al. 2005; Imazio, Bobbio, Cecchi, Demarie, Demichelis, et al. 2005; Imazio et al. 2013).

Enfin, la colchicine est bénéfique dans les infarctus du myocarde avec élévation du segment ST (Deftereos et al. 2015; Hemkens et al. 2016 ; Tardif et al. 2019), et aussi pour les patients avec maladie artérielle coronaire (CAD) en réduisant le risque d'événements cardiovasculaires (M. Xia, Yang, et Qian 2021) et empêche une trop forte augmentation d'IL-6 et de la CRP (Vaidya et al. 2018).

(2) Anakinra, anti-IL-1

Il n'y a pas encore de preuves que l'anakinra est bénéfique dans l'ICFEP, mais cette thérapie améliore la consommation en oxygène et la ventilation à 12 semaines de traitement des patients atteints de dysfonction diastolique (Benjamin Wallace Van Tassel et al. 2014 ; « IL-1 Blockade in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction » s. d.).

Un essai clinique dans l'ICFEP est en cours et prévoit de regarder les effets du blocage de l'IL-1 sur la structure et la fonction cardiaques chez des patients avec ICFEP sans antécédents de maladies auto-immunes rhumatismales. Les investigateurs regarderont notamment l'onde E et l'onde E' pour évaluer la relaxation. Une estimation de la dilatation médiée par le flux sera également réalisée pour étudier la fonction endothéliale. L'inflammation, quant à elle, sera évaluée par le dosage de la CRP.

L'Anakinra est une protéine recombinante analogue de l'antagoniste endogène du récepteur à l'IL-1 (IL-1RI) indiquée dans la polyarthrite rhumatoïde en association au méthotrexate.

Cet immunosuppresseur antirhumatismal neutralise l'activité biologique de l'IL-1 α et de l'IL-1 β par inhibition compétitive de la liaison de l'IL-1 à l'IL-1RI. L'IL-1 est une cytokine pro-inflammatoire majeure intervenant dans la médiation de nombreuses réponses cellulaires, notamment dans l'inflammation synoviale. L'IL-1 est également augmentée dans l'ICFEP, d'où l'intérêt de l'anakinra comme thérapie de l'ICFEP.

Chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, l'anakinra améliore la fonction vasculaire et la fonction ventriculaire gauche. Le médicament diminue, en effet, l'IL-6 et l'endothéline-1 et améliore

la dilatation médiée par le flux, la réserve coronaire et le rapport E/E' après 30 jours de traitement (« Inhibition of Interleukin-1 by Anakinra Improves Vascular and Left Ventricular Function in Patients With Rheumatoid Arthritis » s. d.).

C. Conclusion

L'IC est une des principales causes de mortalité dans le monde et affecte 1 à 2 % de la population générale. Le diagnostic de l'ICFEp est difficile, c'est un diagnostic d'exclusion qui repose sur un faisceau d'indices. Le développement de la pathologie est complexe et correspond à une dysfonction diastolique pouvant être due à une altération de la compliance et de la relaxation active parfois associée à une hypertrophie ventriculaire. Cependant, ce défaut de compliance et de relaxation reste difficile à expliquer.

Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement spécifique de l'ICFEp, car la physiopathologie de l'ICFEp reste mal comprise et nécessite d'être approfondie afin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Cependant, les données concernant la dysfonction endothéliale chez les patients atteints d'ICFEp ont permis à Paulus et son équipe de supposer que la forte prévalence des FRCV induisait un état pro-inflammatoire systémique causant une inflammation endothéliale des microvaisseaux coronaires, que cette inflammation endothéliale réduisait la biodisponibilité du NO et de la voie du GMPc dans les cardiomyocytes adjacents, que la diminution de la signalisation GMPc/PKG favorisait une hypertrophie et une rigidité avec hypophosphorylation de la titine et que la rigidité des cardiomyocytes et la fibrose contribuaient à la dysfonction diastolique du VG et le développement de l'IC (Paulus et Tschöpe 2013). Notre travail a donc été, d'une part, de tester si la dysfonction endothéliale était une bonne cible thérapeutique pour soigner l'ICFEp. D'autre part, étant donné que la maladie est plus retrouvée chez les femmes ménopausées que chez les hommes, notre travail a consisté à mettre en évidence des différences liées aux sexes.

III. Vasculature cardiaque et fonction vasculaire

A. Organisation

Le système vasculaire est un système clos extrêmement important permettant le transport du sang à travers tout le corps. Il est composé, en fonction de leur taille, de trois types de vaisseaux : les artères, les veines et les capillaires.

Les artères conduisent le sang depuis le cœur jusqu'aux différents tissus en se ramifiant au fur et à mesure en plus petits vaisseaux jusqu'à former des artérioles.

Les veines conduisent le sang des tissus vers le cœur en convergeant pour former de plus gros vaisseaux, des veinules aux veines.

Les capillaires correspondent à de petits vaisseaux d'un diamètre de 8 à 10 μm représentant l'union entre les veines et les artères où se font les échanges avec les tissus. Ils constituent la partie perméable du système. Les échanges entre le sang et le liquide interstitiel permettent notamment l'apport en nutriments et O_2 ainsi que l'élimination des déchets.

Le système vasculaire de l'organisme comprend trois systèmes circulatoires : la circulation systémique, la circulation pulmonaire et la circulation coronaire.

La vascularisation cardiaque est particulière, car les vaisseaux sont disposés en couronne d'où l'appellation de circulation coronaire.

La circulation coronaire est locale et intramurale c'est-à-dire dans la paroi du cœur. La circulation est intermittente. Cette intermittence est due au VG qui se contracte avec une force importante et avec une pression très élevée pour dépasser la pression qui règne dans l'aorte pour éjecter le sang dans la totalité de l'organisme. À cause de cette forte contraction, la paroi du VG écrase la coronaire gauche qui passe sous l'OG et le sang ne passe plus. Au moment de la diastole ventriculaire, la paroi du VG n'écrase plus la coronaire gauche et la circulation du sang dans la coronaire gauche reprend.

En revanche, pour éjecter le sang dans les poumons, le cœur n'a pas besoin d'exercer une forte pression pour éjecter le sang. La pression qui règne dans le cœur droit est donc toujours inférieure à la pression qui règne dans la coronaire droite et il y a ainsi une circulation sanguine en continu dans cette coronaire.

1. Artères coronaires

On distingue deux artères coronaires qui apportent le sang aux cellules cardiaques qui partent toutes les deux de la base de l'aorte : l'artère coronaire gauche et l'artère coronaire droite.

L'artère coronaire gauche passe sous l'OG et donne naissance à deux branches : l'artère interventriculaire antérieure vascularise principalement le VG à la face antérieure et la circonflexe vascularise l'OG et le VG.

L'artère coronaire droite donne naissance à 2 branches : l'artère interventriculaire postérieure qui vascularise le VD et le VG à la face postérieure et le rameau marginal qui vascularise l'OD et le VD

La paroi de l'artère est constituée de trois tuniques : l'intima au contact du sang, la media et, à l'extérieur, l'adventice (Fig 15).

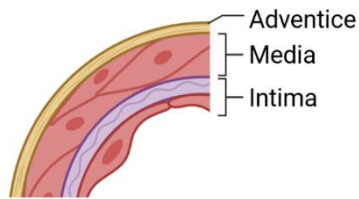


Figure 15 Tuniques d'une artère

a) *Tunique interne ou intima*

L'intima comporte différentes sous-couches : l'endothélium, le glycocalyx, la lame basale, le sous-endothélium et la limitante élastique interne.

L'endothélium est la couche la plus profonde, couche mince avec une seule couche de CE à renouvellement très lent.

Le glycocalyx est un manteau fin et fragile qui recouvre la surface luminale des CE. Il est constitué de glycoprotéines, de glycosaminoglycanes et de protéoglycanes. Parmi les glycosaminoglycanes du glycocalyx se trouve l'héparane sulfate qui est le cofacteur de l'antithrombine III et potentialise ses propriétés anticoagulantes. Le glycocalyx est chargé négativement et repousse ainsi les plaquettes et interagit avec les facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants. Le glycocalyx participe également à la régulation du trafic cellulaire et macromoléculaire.

La lame basale est de fine épaisseur et soutient l'endothélium. Elle est composée de microfibrilles de collagène et de glycoprotéines qui servent à le régénérer.

La couche sous-endothéliale est constituée de fibres conjonctives, d'élastine, de glycogène et de protéoglycanes.

La limitante élastique interne est une couche fenestrée faite de tissu élastique qui sépare l'intima de la media.

b) *Tunique moyenne intermédiaire ou media*

La media est plus épaisse et est constituée de plusieurs composants : les cellules musculaires lisses (CML), la MEC et la limitante élastique externe.

(1) CML

Les CML sont un type de cellules murales qui correspond à 30 % du volume de la media. Elles contrôlent le diamètre des vaisseaux par leur contractilité. Elles sont organisées de façon concentrique en plusieurs couches ou unités lamellaires. Ce sont des cellules allongées, fusiformes, d'un diamètre de 2 à 5 μm . Leur longueur est variable en fonction des tissus. Elles se composent de myofilaments et du réticulum endoplasmique. Les filaments épais contiennent de la myosine et les filaments fins de l'actine, de la tropomyosine et de la caldesmone. Elles ne s'organisent pas en sarcomères comme les cellules musculaires striées. L'ancrage des filaments contractiles au cytosquelette se fait au niveau des

corps denses qui remplacent les stries Z du muscle strié. Ces corps denses contiennent de l' α -actinine et de la vinculine entre autres. Leur cytosquelette est riche en protéines comme la desmine, la filamine et la vimentine.

Leur fonction principale est d'assurer la contraction permettant d'assurer le tonus vasculaire indispensable à la régulation du débit sanguin et de la pression artérielle.

Contrairement au muscle squelettique ou cardiaque possédant un état de différenciation terminal, les CML gardent une plasticité et peuvent donc avoir des modifications phénotypiques dues à des signaux. Leur plasticité est bénéfique dans la morphogenèse des vaisseaux ou lors de lésions vasculaires. Elles peuvent également se différencier en réponse à des signaux pathologiques.

Des constituants extracellulaires comme des glycosaminoglycane (acide hyaluronique), du collagène de type I, de la fibronectine et de l'élastine qui va former des lames élastiques sont aussi présents et forment la MEC.

(2) MEC

(a) Composition de la MEC

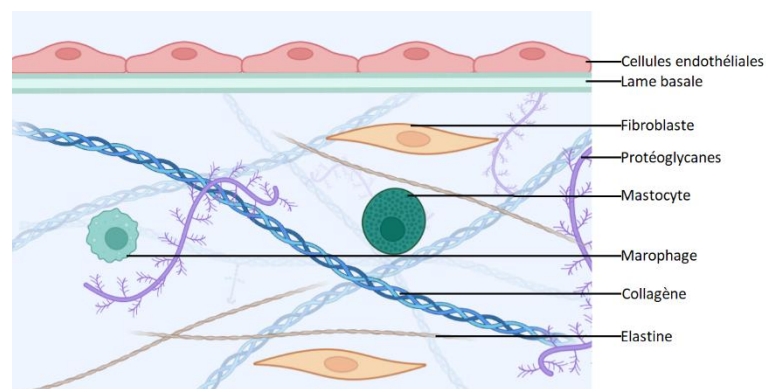


Figure 16 Représentation de la matrice extracellulaire

La MEC est composée de divers protéines et polysaccharides localement sécrétés s'assemblant en un réseau organisé solidement associé à la surface cellulaire qui les produit (Fig 16). Elle joue ainsi un rôle actif dans la régulation du comportement des cellules qui entrent en contact avec elle et influence leur survie, leur développement, leur migration, leur prolifération, leur forme et leur fonction.

Elle est constituée de macromolécules produites localement, sécrétées par les fibroblastes.

Deux principales classes de macromolécules se distinguent : les glycosaminoglycane (GAG), chaînes de polysaccharides, et les protéines fibreuses comme le collagène, l'élastine, la fibronectine (facilite l'attachement des cellules sur la matrice) et la laminine ayant des fonctions structurales et adhésives. Les polysaccharides formant des chaînes solides résistent aux forces de compression. En outre, ils permettent une diffusion rapide des nutriments, des métabolites et des hormones entre le sang et les cellules tissulaires. Les fibres de collagène renforcent la matrice et les fibres d'élastine lui donnent son élasticité.

(b) Fonctions de la MEC

La MEC a de nombreuses fonctions. Elle influence notamment l'organisation du cytosquelette grâce aux intégrines (Fig 17).

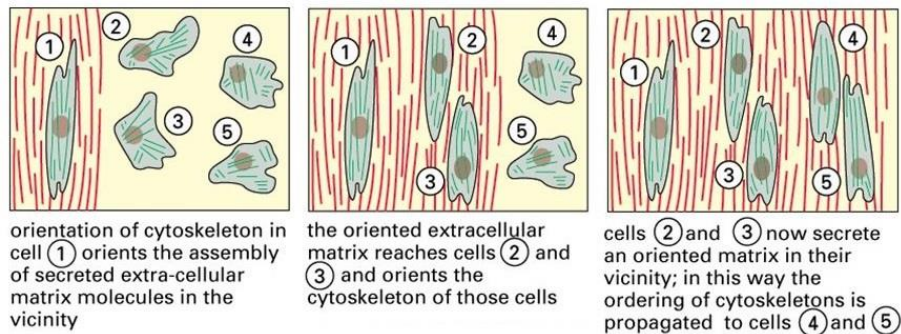


Figure 17 MEC et organisation du cytosquelette (ALBERTS 2017)

De plus, pour permettre la croissance, la prolifération et la survie des cellules, elle engendre une dépendance d'ancrage grâce aux intégrines et aux signaux cellulaires qui permettent l'étalement des cellules favorisant leur prolifération (ALBERTS 2017).

Elle facilite également la migration par la dégradation de ses composants. Ce rôle dépend des MMP et des sérine-protéases qui dégradent le collagène (collagénases), la laminine et la fibronectine. Cela permet de dégager un passage permettant l'exposition des sites favorisant la fixation des cellules ou la migration, promeut le détachement cellulaire pour que la cellule avance et libère des protéines de signalisation extracellulaire stimulant la migration (Maquart et al. 2005).

Les protéases sont régulées positivement par activation locale et négativement par confinement par des récepteurs cellulaires de surface ou sécrétion d'inhibiteurs comme les serpinines. Les MMP, quant à elles, sont inhibées par les TIMP (tissue inhibitors of metalloproteases).

Les CML et la MEC vont être en proportions différentes en fonction de la taille de l'artère. Les grosses artères auront une paroi avec beaucoup de lames élastiques et seront donc principalement élastiques alors que les petites artères n'auront plus de lames élastiques et seront surtout musculaires. Ce sont ces dernières qui réguleront leur diamètre par la contraction des CML.

La limitante élastique externe sépare la media de l'adventice.

c) La tunique externe ou adventice

L'adventice est constituée d'un tissu conjonctif composé de fibres élastiques, de fibres de collagène, de très petits vaisseaux (vasa vasorum) pour la nourrir ainsi que des filets nerveux sympathiques. Cette innervation permet de contrôler, via les cellules de la media, le diamètre du vaisseau. Les fibres nerveuses vont libérer de la noradrénaline qui va diffuser au niveau de la media vers les CML qui présentent des récepteurs α_1 permettant une vasoconstriction et des récepteurs β pour une vasodilatation.

2. Veines coronaires

On compte deux veines coronaires. La grande veine du cœur récupère le sang sur la face antérieure du cœur tandis que la veine moyenne récupère le sang sur la face postérieure du cœur. Ces deux veines vont converger pour former le sinus coronaire qui court au niveau du sillon coronarien pour se jeter dans l'OD.

La paroi des veines est peu tonique et plus mince. La lumière est beaucoup plus grande que celle des artères. On trouve les mêmes tuniques que pour les artères : la tunique interne ou intima mince, la tunique moyenne ou media, plus mince que celle des artères, et la tunique externe ou adventice épaisse.

La media présente des fibres élastiques et des fibres de collagène qui permettent de s'adapter à la volémie. Les veines vont être capables de se dilater qu'elles soient de petit calibre ou de gros calibre. Les fibres élastiques sont particulièrement présentes dans les veines de petit et moyen calibre. À l'inverse, les grosses veines sont très riches en collagène et sont difficilement déformables. Les CML se trouvent surtout dans les petites veines et veinules pour modifier le diamètre sous contrôle du système nerveux sympathique.

L'adventice des veines présente aussi des terminaisons nerveuses sympathiques.

Contrairement aux artères, les veines présentent des valves dont la concavité est tournée vers le cœur. Elles jouent un rôle de clapet antiretour.

3. Capillaires

On distingue trois types de capillaires : les continus, les fenestrés et les discontinus.

Les capillaires continus se caractérisent par une lame basale continue avec la membrane des CE et les échanges ne se font qu'à la jonction entre les cellules. Les capillaires continus composent notamment les microvaisseaux du muscle strié squelettique et du cœur.

Les capillaires fenestrés ont, quant à eux, une lame basale continue avec des pores entre les CE. Ces pores permettent les échanges liquidiens. Ils se retrouvent principalement au niveau des capillaires viscéraux. Ils permettent notamment la filtration glomérulaire au niveau du rein.

Les capillaires discontinus ou sinusoides possèdent une lame basale discontinue qui permet le passage d'éléments de grande taille. Ce type de capillaires s'observe au niveau du rein, de la rate ou de la moelle osseuse.

Les capillaires se composent d'une couche de CE associée à une fine couche de cellules murales, les péricytes (Figure 18).

a) CE

L'endothélium est un tissu épithélial qui dérive du mésoderme. Il est constitué de CE plates polarisées d'environ 0,5 μm d'épaisseur, 100 μm de longueur et 10 μm de largeur. Leur face apicale est en contact avec la lumière du vaisseau, la face basale est fixée sur la lame basale. Les CE s'orientent toutes longitudinalement dans la direction du flux sanguin. Mais elles présentent une hétérogénéité structurale en fonction de leur situation. Celles qui tapissent les microvaisseaux sont généralement

aplaties et allongées alors que celles des artères de plus gros calibre sont polygonales et plus épaisses. Les marqueurs caractérisant les CE sont CD31, CD34, CD105 (endogline), les récepteurs au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF, le facteur von Willebrand (vWF) et la cadhérine 5 entre autres.

b) Péricytes

Les péricytes ont été décrits pour la première fois en 1871 par Eberth, mais la découverte de ces cellules murales a été attribuée à Rouget qui les définit comme des cellules environnant les CE des petits vaisseaux. Ces cellules sont alors nommées cellules de Rouget. Au 20^e siècle, Zimmermann nomme ces cellules périvasculaires péricytes du fait de leur proximité avec les CE. Les péricytes sont définis comme des cellules intégrées à la membrane basale vasculaire au niveau des microvaisseaux comme les artérioles et les capillaires (Fig 18). Ils se caractérisent par de nombreux prolongements cytoplasmiques qui entourent les vaisseaux permettant de les soutenir par contact direct avec les CE. *In vitro*, ces cellules sont plutôt aplaties. Les prolongements sont composés de microfilaments d'actine permettant aux prolongements d'encercler le cylindre endothélial (Forbes, Rennels, et Nelson 1977). Aucun marqueur spécifique de péricytes n'existe, mais les marqueurs les plus retrouvés sont NG2 (Neural/glial antigen 2) et PDGFRB (platelet derived growth factor receptor β), récepteur présent à la surface des péricytes. Les marqueurs diffèrent selon la localisation des péricytes (artériole, veinule ou capillaire), mais aussi selon l'espèce. Ils n'expriment pas la platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM1) appelée aussi CD31 ce qui permet de les distinguer facilement des CE.

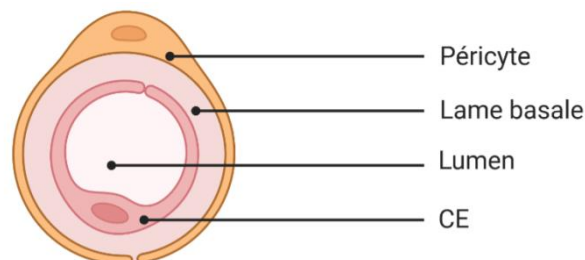


Figure 18 Structure d'un capillaire

Leur origine embryonnaire reste incertaine, car elle différerait en fonction des tissus. Les péricytes sont d'ailleurs différents d'un tissu à l'autre. Leur distribution, leur morphologie, l'expression de marqueurs, leur plasticité et leur fonction varient.

L'origine embryonnaire des péricytes cardiaques est mésothéliale. Ils dérivent des angioblastes mésenchymateux et sont originaires de l'endocarde et de l'épicarde (Armulik, Genové, et Betsholtz 2011 ; Huang et al. 2019 ; Jackson-Weaver et al. 2020). La transition en cellules mésenchymateuses se ferait via la voie Wnt pour les cellules provenant de l'endocarde (Huang et al. 2019 ; W. C. W. Chen et al. 2015) et via PRMT1-p53 pour celles provenant de l'épicarde (Jackson-Weaver et al. 2020). Le mécanisme précis de recrutement des péricytes au cœur reste pour l'instant inconnu.

Les péricytes cardiaques sont le type cellulaire le plus présent dans le cœur, après les CE, dû à l'importante vascularisation. Le ratio péricytes/CE est de 1 pour 2 ou de 1 pour 3 (Su et al. 2021).

c) Communication CE-péricytes

Les péricytes sécrètent de l'angiopoïétine (angpt-1 et angpt-2) qui va se fixer sur le récepteur Tie-2 présent à la surface des CE. L'angpt-1 permet leur association alors que l'angpt-2 permet leur dissociation. Cette signalisation permet la stabilisation et la croissance du vaisseau. Les péricytes sécrètent du VEGFA qui va se fixer sur son récepteur au niveau de la CE pour permettre la prolifération et la survie endothéliale et ainsi permettre la formation de nouveaux vaisseaux. Le tissue growth factor β (TGF β) est quant à lui sécrété pour inhiber cette prolifération. Enfin, la signalisation PDGFB/PDGFRB permet le recrutement des péricytes sur les CE pour stabiliser les vaisseaux (Fig 19).

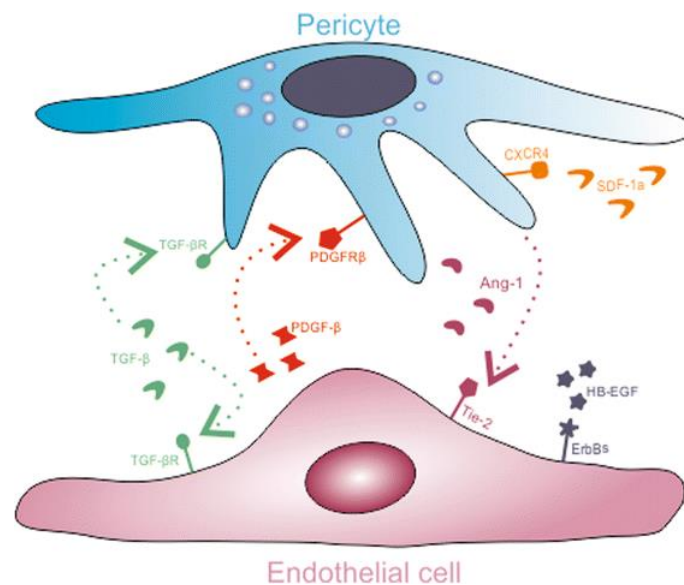


Figure 19 Communication CE-Péricytes (Harrell et al. 2018)

B. Formation

La formation des vaisseaux ou morphogénèse vasculaire se produit au cours du développement embryonnaire à partir du mésoderme, couche médiane de cellules entre l'ectoderme et l'endoderme. Elle a aussi lieu à l'âge adulte dans les conditions physiologiques de réparation ou dans certaines pathologies. Les CE ont, en effet, la capacité d'ajuster leur nombre et leur distribution en fonction des besoins. Elles gardent une capacité à se diviser et à migrer.

La morphogénèse regroupe la vasculogénèse, l'angiogénèse et l'artériogénèse.

Elle s'effectue à partir de cellules souches et de progéniteurs, mais aussi de cellules différenciées comme les CE, les CML, les cellules inflammatoires, les fibroblastes et les composants de la MEC. Elle correspond à une balance entre facteurs anti ou proangiogéniques.

1. Vasculogénèse

La vasculogénèse correspond à la migration et la différenciation des CE à partir des progéniteurs vasculaires et leur assemblage en réseau ou plexus primitif. Les cellules mésodermiques s'agrègent en

îlots sanguins, les cellules centrales de ses îlots deviennent les cellules souches hématopoïétiques et les cellules externes deviennent les angioblastes, futures cellules vasculaires. L'assemblage de ces précurseurs endothéliaux se fait grâce à l'expression de marqueurs de CE, comme PECAM1, de cellules souches, comme CD34 et comme le récepteur de type 2 au VEGF (VEGFR2).

2. Angiogenèse

L'angiogenèse se définit comme la croissance, l'extension et le remodelage de l'arbre vasculaire pour obtenir un système mature et fonctionnel à partir de la circulation préexistante. Ce processus varie d'un organe à l'autre.

La néo-angiogenèse a lieu de manière physiologique, pendant le développement embryonnaire (associée à la vasculogenèse). Seulement 0,1 % des CE prolifèrent à l'âge adulte. Les vaisseaux sont, en effet, dits quiescents, car ils forment rarement de nouvelles branches. La néo-angiogenèse survient surtout chez la femme durant le cycle menstruel et lors de la grossesse. Mais elle survient aussi de manière pathologique, pour la régénération tissulaire post-ischémie, l'inflammation (arthrite, psoriasis...), l'athérosclérose (vascularisation de la plaque d'athérome), la rétinopathie diabétique, les cancers...

Les nouveaux vaisseaux apparaissent sous forme de capillaires qui bourgeonnent à partir de petits vaisseaux existants. Les CE forment d'abord un bourgeon plein qui se creuse pour former un tube où va se définir la lumière des vaisseaux. Le processus de formation d'un nouveau vaisseau continue jusqu'à ce que le bourgeon rencontre un autre capillaire avec lequel il forme une connexion pour permettre au sang de circuler.

3. Artériogenèse

L'artériogenèse est l'augmentation du diamètre des vaisseaux artériels néoformés liée à l'augmentation de la pression. Le diamètre du vaisseau augmente jusqu'à ce que le stress subi par l'endothélium revienne à la normale. Un stress mécanique comme l'augmentation de la pression ou les contraintes de cisaillement sur l'endothélium provoque une production de NO pour entraîner une vasodilatation.

4. Maturation

La maturation intervient à la fin du processus de morphogenèse pour conférer une organisation tridimensionnelle, structurée et ordonnée au réseau. Une structure stable avec un calibre vasculaire régulable est nécessaire pour gérer les forces de cisaillement et la pression sanguine. Cette maturation correspond au recrutement de cellules murales, péricytes ou CML, à la surface externe des vaisseaux pour la stabilisation.

C. Fonctions

Le rôle principal du système vasculaire est d'apporter le sang riche en nutriments et en O₂ à tout l'organisme. Il joue aussi un rôle de barrière et régule l'inflammation.

1. Rôle des CE

L'endothélium composé des CE joue un rôle important notamment dans la perméabilité, le tonus vasculaire, l'inflammation et le maintien de la fluidité du sang.

a) Perméabilité

L'endothélium forme une barrière semi-perméable entre le sang et l'espace interstitiel. Les CE sont, en effet, liées les unes aux autres par des jonctions cellulaires. Ce sont des complexes composés de molécules d'adhésion transmembranaires reliées aux protéines cytoplasmiques ou au cytosquelette. Les jonctions jouent ainsi un rôle dans la régulation de la perméabilité. Elles permettent une diffusion passive des molécules de petite taille. Le passage des molécules de plus grosse taille supérieure à 68 kDa, comme l'albumine, se fait soit par des canaux soit par transcytose.

Il existe trois catégories de jonctions (Fig 20) :

- Serrées ou occlusives, qui scellent les cellules entre elles de manière à empêcher le passage d'une molécule et forment ainsi une barrière
- D'ancrage ou adhérentes, qui attachent mécaniquement les cellules entre elles ou à la matrice
- Communicantes, qui permettent le passage de substances chimiques ou signaux électriques.

Les jonctions occlusives correspondent aux jonctions serrées. Les jonctions d'ancrage correspondent aux jonctions adhérentes et contacts focaux ou plaques d'adhésion ou filaments intermédiaires : desmosomes et hémidesmosomes. Les jonctions communicantes sont aussi appelées nexus ou jonctions gap.

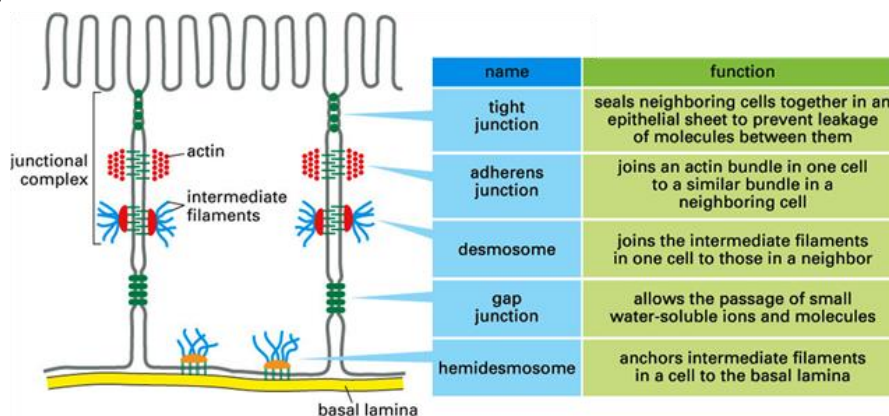


Figure 20 Les différents types de jonctions (ALBERTS 2017)

(1) Jonctions serrées

Elles sont composées de protéines d'adhésion transmembranaires : les claudines, qui ont pour rôle la formation et la fonction de la jonction, et l'occludine. Les claudines et les occludines sont associées à des protéines membranaires périphériques intracellulaires, les protéines ZO (jonction serrée=zonula occludens) qui s'ancrent au cytosquelette d'actine. Les CE expriment ZO-1, ZO-2 et ZO-3 pour permettre l'ancrage des jonctions au cytosquelette.

Les jonctions serrées forment une barrière sélectivement perméable. Elles scellent les cellules voisines entre elles. Elles assurent le transport transcellulaire grâce à des protéines soit au niveau apical soit au niveau baso-latéral de la cellule. Elles fonctionnent donc comme une barrière et empêchent la diffusion de certaines protéines membranaires entre le domaine apical et le domaine baso-latéral de la membrane plasmique. Elles sont ainsi responsables de la polarité cellulaire. Elles assurent aussi le transport paracellulaire.

(2) Jonctions d'ancrage

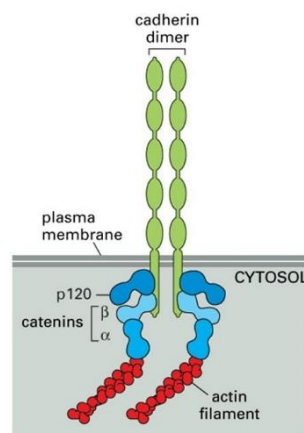


Figure 21 Jonction d'ancrage ou adhérente (ALBERTS 2017)

Les jonctions d'ancrage (Fig 21) sont fixées à l'intérieur de la cellule sur des filaments du cytosquelette. Elles se retrouvent dans tous les tissus, mais sont plus abondantes dans les tissus soumis à d'importantes tensions mécaniques comme le cœur et les muscles. Elles sont constituées de deux sortes de protéines : les protéines d'ancrage intracellulaire et les protéines d'adhésion transmembranaire. Ces protéines s'associent à des protéines de signalisation intracellulaire pour permettre aux jonctions de transmettre un signal à l'intérieur de la cellule.

Il existe deux catégories de jonctions d'ancrage : les jonctions adhérentes et les plaques d'adhésion. Les jonctions adhérentes et desmosomes maintiennent ensemble les cellules et sont composés de protéines d'adhésion de la famille des cadhérines (N-cadhérine au niveau du cœur, VE-cadhérine ou cadhérine-5 au niveau endothélial). Les plaques d'adhésion ou contact focaux et hémidesmosomes fixent la cellule à la MEC grâce aux protéines d'adhésion de la famille des intégrines.

À l'intérieur de la cellule, les jonctions adhérentes et les plaques d'adhésion servent de site de connexion aux filaments d'actine alors que les desmosomes et les hémidesmosomes servent de site

de connexion aux filaments intermédiaires (filaments de desmine dans les cellules musculaires cardiaques). Les jonctions adhérentes ont ainsi un rôle de structure et de maintien pour la CE.

(3) Jonctions communicantes ou jonctions gap

Les jonctions gap permettent le passage direct par diffusion passive de petites molécules (<1000 Da) d'une cellule à l'autre.

Elles se composent de protéines formant des canaux : les connexines. Ces canaux permettent le passage d'ions et autres petites molécules hydrosolubles du cytoplasme d'une cellule à celui d'une autre. Les cellules sont ainsi couplées électriquement et métaboliquement. Les connexines sont différentes en fonction du tissu, et les canaux sont plus ou moins perméables. Les principales connexines retrouvées entre les CE du réseau sanguin sont la connexine 37, la connexine 40 et la connexine 43 (Cx43). Le canal formé par les connexines est appelé connexon. Il s'agit en fait d'un hémicanal au niveau de la membrane plasmique qui va s'assembler à son homologue de la cellule voisine pour former un canal complet et donc une jonction complète, fermée et étanche.

b) Tonus et vasomotricité

Le tonus et la vasomotricité dépendent de la composition des artères, en CML notamment, de la concentration calcique intracellulaire comme dans les cardiomyocytes, mais aussi de la production de signaux par les CE.

Les CE contrôlent, en effet, le tonus vasculaire en envoyant des signaux paracrines aux CML entourant les vaisseaux qui peuvent se contracter ou se relâcher et donc contracter ou dilater le vaisseau. Il existe une balance entre signaux vasodilatateurs et vasoconstricteurs pour adapter la pression artérielle et le flux.

Le principal facteur vasoconstricteur est l'endothéline qui est synthétisée par les CE dans un état pro-inflammatoire pour contracter le vaisseau et ainsi ralentir le passage de leucocytes. Les autres facteurs vasoconstricteurs sont les endopéroxydes, le thromboxane A₂, les anions superoxydes, l'Ang II et le facteur activateur de plaquettes PAF.

Les facteurs vasodilatateurs comprennent la prostacycline et la bradykinine entre autres. Le facteur vasodilatateur le plus important est le NO, produit par la NOS par réaction d'oxydoréduction à partir de la L-arginine. Il existe plusieurs isoformes de la NOS : neuronale (NOS1), endothéliale (NOS3) et inducible (NOS2) induite par les cytokines pro-inflammatoires et calcium-indépendante, contrairement aux autres. Physiologiquement, la NOS3 est constitutive et fournit du NO pour maintenir un tonus vasculaire en fonction des variations de pression et des conditions de flux. La NOS3 est activée par l'ADP, la bradykinine, la substance P, les agonistes muscariniques et certains agents physiques comme les forces de cisaillement. La synthèse de NO provoque alors l'activation de la GCs des CML entraînant une augmentation du GMPc. Cette augmentation induit l'activation de la PKG qui mène à la diminution du calcium cytosolique et donc à l'inhibition de la contraction de la CML via déphosphorylation de la myosine. La PKG agit notamment en phosphorylant le phospholamban menant à l'activation de la pompe SERCA2a permettant la recapture du calcium et favorisant la relaxation. Le NO a aussi une action antithrombotique en inhibant l'activation et l'adhésion des

plaquettes à l'endothélium et favorise ainsi la désagrégation plaquettaire. Il diminue également l'expression des molécules d'adhésion à la surface des CE.

c) Adhésion et transport de cellules inflammatoires

Physiologiquement, les CE ont un phénotype antiadhésif empêchant l'activation et l'adhésion des cellules circulantes. Pendant la réponse inflammatoire, une des principales fonctions des CE est d'organiser et de coordonner la transition des leucocytes à travers la paroi vasculaire pour leur recrutement au niveau du tissu lésé ou infecté. L'endothélium s'active, sa surface devient proadhésive et pro-inflammatoire pour le recrutement et l'adhérence des leucocytes. Les CE expriment alors des récepteurs de la réponse immunitaire innée comme les toll-like receptors. Des molécules d'adhésion sont alors mises en jeu : les sélectines, les molécules de la famille des immunoglobulines (ICAM1 par exemple) et les intégrines. Le rôle des CE dans l'inflammation comprend plusieurs étapes (Fig 22) :

- Le roulement leucocytaire dépendant des sélectines,
- L'activation des CE qui produisent des chimiokines permettant l'activation des intégrines,
- L'adhésion médiée par les intégrines et possible grâce à l'expression de ICAM1 et VCAM1 par les CE,
- La transmigration ou diapédèse.

Ces étapes ont lieu après la lyse du glycocalyx des CE par des héparinases et des MMP.

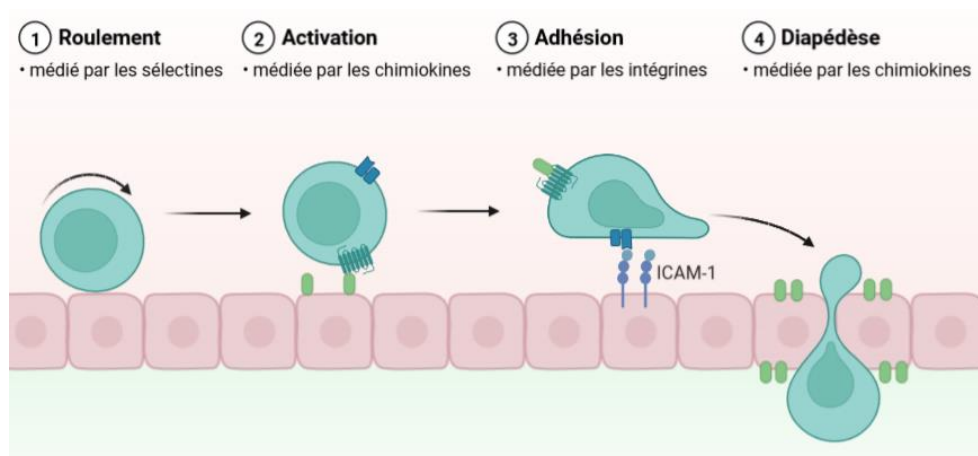


Figure 22 Recrutement leucocytaire

d) Hémostase

L'hémostase est définie comme l'ensemble des mécanismes qui concourent à l'arrêt des saignements, à la prévention des saignements spontanés et des thromboses. C'est un processus permettant de colmater une brèche vasculaire et donc de maintenir l'intégrité du réseau vasculaire.

Elle comprend :

- L'hémostase primaire avec formation d'un clou plaquettaire appelé aussi thrombus blanc (enchevêtrement des plaquettes liées les unes aux autres).

- La coagulation plasmatique avec consolidation et formation d'un réseau de fibrine ou thrombus rouge (réseau de protéines qui piègent les globules rouges).

L'endothélium contrôle la fluidité du sang en prévenant la formation du clou plaquettaire (hémostase) et aussi en le lysant quand il est formé.

(1) Hémostase primaire

À l'état normal, les CE ne réagissent pas avec les facteurs sanguins capables de déclencher la formation d'un caillot. En cas de lésion endothéliale, le sang est mis en contact avec le sous-endothélium (lame basale, intima et média) qui est thrombogène. Se produit alors l'hémostase primaire.

Les acteurs de l'hémostase primaire sont les plaquettes et les facteurs plasmatiques comme le fibrinogène et le vWF. Ce dernier est sécrété par l'endothélium et localisé au niveau des corps de Weibel-Palade dans les CE, dans les plaquettes, dans le plasma et dans le sous-endothélium. Il a pour rôle l'adhésion des plaquettes, leur agrégation et le transport du facteur VIII.

L'hémostase se divise en 3 phases : l'adhésion, l'activation-sécrétion et l'agrégation des plaquettes. Le thrombus blanc se forme.

En cas de saignements au niveau des petits capillaires cutanés ou des muqueuses, le simple thrombus blanc suffit pour arrêter le saignement. S'il y a une lésion des vaisseaux de gros calibre, il faut renforcer le thrombus blanc par formation du caillot de thrombine (coagulation).

(2) Coagulation plasmatique

La coagulation plasmatique correspond à une cascade d'activations de précurseurs circulants inactifs appelés zymogènes qui, par perte d'une extrémité de leur chaîne protéique, donnent des facteurs activés (Fig 23). Ces activations ont lieu grâce à la fixation de phospholipides, en présence de calcium. La libération de facteur tissulaire par les CE joue un rôle clé pour déclencher ces phénomènes. Une fois la coagulation amorcée, elle s'autocatalyse par activation des précurseurs dès l'apparition de thrombine.

Il existe deux voies d'activation de la coagulation plasmatique :

- La voie endogène ou intrinsèque
- La voie exogène ou extrinsèque.

(1) Régulation de la coagulation

La coagulation doit rester un phénomène localisé et très finement régulé pour éviter la formation anormale de thrombus. Plusieurs mécanismes interviennent alors pour réguler la coagulation.

En plus de réguler l'expression du facteur tissulaire, l'endothélium possède des propriétés antithrombotiques. Les GAG à la surface des CE, dont les héparane-sulfates, favorisent l'action de l'antithrombine qui inhibe les facteurs IIa et Xa. L'endothélium produit également des inhibiteurs de la coagulation, dont l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) qui inhibe l'initiation de la coagulation.

La protéine C permet d'inhiber la coagulation lors de la phase d'amplification. Les CE produisent la thrombomoduline qui fixe la protéine C et augmente son activité anticoagulante en association avec un cofacteur spécifique, la protéine S. L'endothélium potentialise l'activation de la protéine C en exprimant son récepteur (EPCR). La protéine C inhibe alors les facteurs V et VIII.

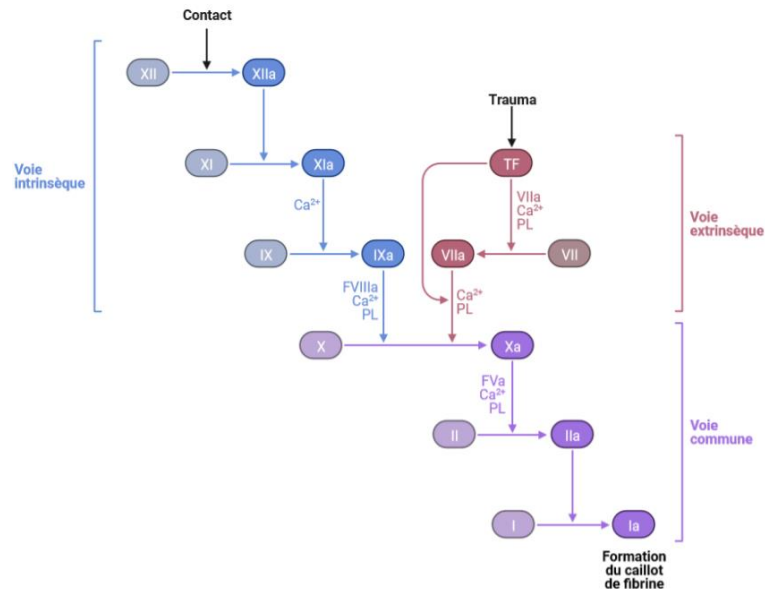


Figure 23 Cascade de la coagulation

(2) Fibrinolyse

La fibrinolyse correspond à la lyse du caillot de fibrine. Elle permet d'éliminer les dépôts fibrineux des trajets vasculaires grâce à une enzyme protéolytique, la plasmine. Elle se forme par activation d'un précurseur inactif, le plasminogène. Le plasminogène est un zymogène de sérine-protéase synthétisé par le foie. Il est activé en plasmine par les activateurs du plasminogène. L'activation du plasminogène est localisée au caillot de fibrine. Elle se fait soit par l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) soit par l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA). Le tPA est libéré par les CE sous forme active alors que l'uPA est libéré par les CE, les monocytes, les macrophages, le placenta...

Les CE synthétisent aussi l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI) qui est un anti-activateur.

2. Rôle des péricytes

Le rôle des péricytes est beaucoup moins bien connu que celui des CE.

a) Maintien de l'endothélium

Dans le cerveau, où le ratio péricytes/CE est le plus important (Armulik, Abramsson, et Betsholtz 2005), il a été montré que les péricytes sont essentiels à l'intégrité de la barrière hématoencéphalique, car chez des souris mutantes déficientes en péricytes les capillaires cérébraux étaient anormalement perméables (Armulik et al. 2010; Daneman et al. 2010). Dans la rétine, ils participent également au

maintien de la perméabilité puisque dans le diabète, la perte précoce des péricytes entraîne une perméabilité accrue (Kusuhara et al. 2018).

Ils contribuent aussi au maintien de la fonction microvasculaire dans le cœur. Une perte de péricytes cardiaques a, en effet, été associée à une augmentation de la perméabilité vasculaire, une activation endothéliale et une vasomotricité altérée (Chintalgattu et al. 2013; Siao et al. 2012). En outre, l'inhibition spécifique du PDGFR diminue la FEVG.

b) Inflammation

Les péricytes jouent un rôle dans l'immunité en attirant les leucocytes grâce à des chimiokines, en les laissant passer, car les péricytes ne sont pas jointifs les uns aux autres, et en contribuant à leur élimination grâce à leur activité phagocytaire (Rudziak, Ellis, et Kowalewska 2019).

Une augmentation d'angpt-2, dans un contexte d'ischémie par exemple, entraîne le détachement du péricyte de la CE augmentant la perméabilité. Le péricyte va alors produire des cytokines pro-inflammatoires (Alex et Frangogiannis 2019) et va ensuite se différencier en myofibroblaste et exprimer FSP1+ (Ren et al. 2002; Su et al. 2020).

Les péricytes peuvent aussi être anti-inflammatoire et empêcher une inflammation accrue et les hémorragies (Zymek et al. 2006). Il y a, en effet, une activation de la voie PDGFB/PDGFRB avec recrutement de péricytes qui vont permettre la maturation de la vasculature et une résolution de l'inflammation en limitant le recrutement macrophagique (Zymek et al. 2006). Implantés dans le myocarde, les péricytes diminuent également l'infiltration inflammatoire (C.-W. Chen et al. 2013; Alvino et al. 2018).

c) Fibrose

La fibrose myocardique pourrait faire intervenir les péricytes, mais leur rôle dans la fibrose n'est pas encore bien défini. Ils se détacheraient de l'endothélium, migreraient et se différencieraient en myofibroblastes, entraînant une sécrétion de protéines de la matrice (Greenhalgh, Iredale, et Henderson 2013). Dans un modèle murin, l'inhibition de la prolifération péricytaire par administration d'acide valproïque permet, en effet, une réduction de la fibrose (Y. Zhang et al., s. d.). La transition des péricytes en myofibroblastes se fait notamment via sirtuine 3 (Sirt3) dans un modèle de fibrose cardiaque induite par l'Ang II (Su et al. 2020).

d) Cellules souches

Les péricytes peuvent aussi se comporter comme des cellules souches en se différenciant en différents types cellulaires.

Dans le muscle squelettique, les péricytes semblent pouvoir se différencier en myoblastes (Crisan et al. 2008; Dellavalle et al. 2007; Stallcup 2013; Cappellari et al. 2013). Dans le cœur, cette différenciation pourrait être utile pour réparer le myocarde en cas de lésion ischémique. Des péricytes cardiaques humains isolés d'un modèle murin d'infarctus présentent d'ailleurs un potentiel cardiomyogénique (W. C. W. Chen et al. 2015). De plus, des cellules progénitrices dérivant des

péricytes de la veine saphène (Campagnolo et al. 2010; R. G. Katare et Madeddu 2013; R. Katare et al. 2011) transplantées dans la zone infarctée chez un modèle murin d'infarctus du myocarde ont permis une réduction de l'apoptose et de la fibrose ainsi qu'une augmentation de l'angiogenèse. Les mêmes résultats ont été retrouvés avec des péricytes purifiés de muscle humain (C.-W. Chen et al. 2013).

e) Thrombose

Les péricytes seraient également impliqués dans les thromboses. Les péricytes sécrètent, en effet, du facteur tissulaire, initiateur de la coagulation (Juchem et al. 2010). Ils peuvent également sécréter des facteurs procoagulants qui créent un environnement thrombotique (Nees et al. 2012).

f) Fonction cardiaque

Les péricytes jouent un rôle dans la structure et la fonction cardiaque notamment dans le développement cardiaque où une perte de signalisation PDGFB/PDGFRB entraîne des malformations comme une hypoplasie myocardique (Van den Akker et al. 2008).

Ils augmentent aussi la contractilité cardiaque quand ils sont implantés dans le myocarde et diminuent la dilatation du VG due à l'ischémie, la fibrose et l'inflammation et empêchent ainsi le développement de l'IC (C.-W. Chen et al. 2013; Alvino et al. 2018).

g) Atteinte des péricytes en pathologie

Les péricytes participent également à la physiopathologie des maladies cardiovasculaires en particulier dans le diabète, puisque la dégénérescence des péricytes est l'un des marqueurs les plus précoces de la rétinopathie diabétique. Celle-ci entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire, une augmentation de l'adhésion des cellules inflammatoires sur les CE et une hypoxie dans les zones lésées. L'étiologie de la dégénérescence des péricytes dans le diabète reste cependant inconnue, mais celle-ci pourrait être due à l'hyperglycémie, à une augmentation du stress oxydatif ou à la production de protéines glyquées (Kusuhara et al. 2018).

Dans un modèle murin d'insuffisance cardiaque induite par régime gras, une raréfaction des capillaires cardiaques a été associée à une perte de péricytes et cette diminution de la couverture péricytaire était accentuée par une délétion de *Sirt3* (Zeng et al. 2015). De plus, il a été montré que l'insuffisance cardiaque induite par ischémie altère les propriétés de mécanotransduction des péricytes cardiaques (Rolle et al. 2021).

Concernant les pathologies virales, les péricytes pourraient jouer un rôle important notamment dans le COVID. Le virus SARS-CoV-2 a comme principal récepteur cellulaire hôte ACE2, enzyme de conversion de l'angiotensine I en AngII. Or, les péricytes cardiaques expriment fortement cette enzyme et semblent une cible potentielle du virus (L. Chen et al. 2020). La réplication du virus dans les péricytes entraîne une diminution de ceux-ci qui serait réversible chez les modèles animaux sans comorbidités, mais permanente chez ceux présentant une dysfonction diastolique due à un régime gras et hypertenseur (Daems et al. 2020).

h) Conclusion

Les péricytes cardiaques pourraient participer à la physiopathologie des maladies cardiovasculaires à travers un large éventail de mécanismes. Cependant, les études réalisées jusqu'à présent sont principalement descriptives. Il est donc nécessaire d'étudier plus précisément les péricytes cardiaques et leur rôle sur le cœur, notamment en étudiant les conséquences d'une perte de péricytes sur la structure et la fonction cardiaque.

IV. Dysfonction vasculaire et rôle dans l'IC

A. Définition

La dysfonction vasculaire est caractérisée par le phénotype prothrombotique et pro-inflammatoire des CE. En conséquence, les vaisseaux sont dans l'incapacité d'apporter correctement les nutriments et l'O₂ aux organes. Cette incapacité peut être due à une réduction de la densité vasculaire, à une vasomotricité altérée avec une vasoconstriction accrue due à une modification de production des signaux vasomoteurs, ou à une thrombose. La dysfonction endothéliale se caractérise également par sa fonction de barrière altérée qui se traduit par une perméabilité vasculaire augmentée pouvant être due à une altération des jonctions. La réponse inflammatoire est aussi exacerbée avec une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion par les CE promouvant l'infiltration de cellules inflammatoires.

B. Mécanismes

En conséquence, les CE pourraient affecter la fonction des cardiomyocytes suite à un défaut des apports en nutriments ou O₂ aux cardiomyocytes, une altération de la communication CE-cardiomyocytes ou encore un changement dans le micro-environnement des cardiomyocytes.

(Fig 24).

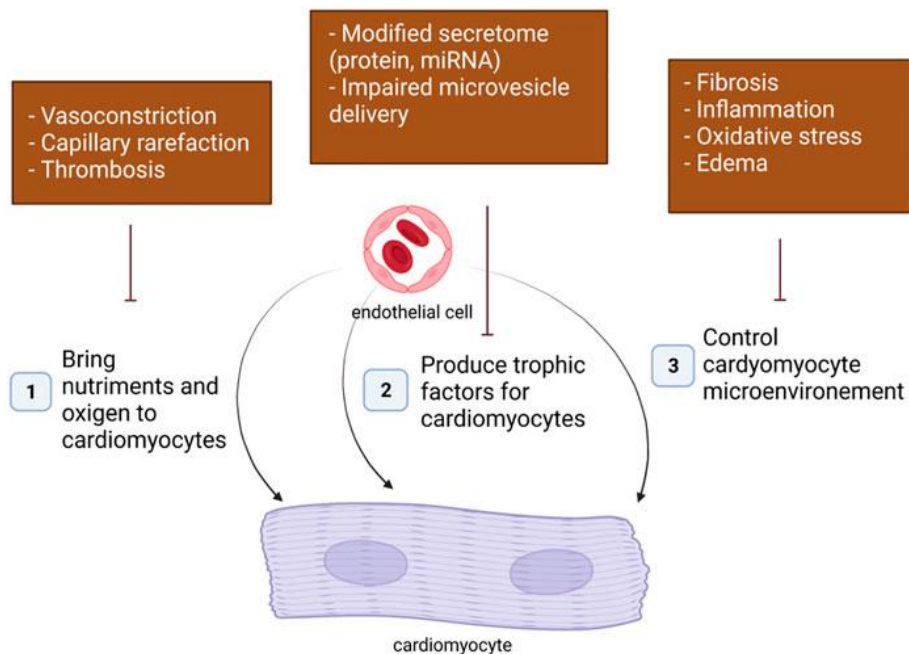


Figure 24 Effets des CE sur le cardiomyocyte (Cornuault et al. 2022)

1. Altération de l'apport en nutriments et O₂

Le rôle premier de la circulation coronaire est d'apporter des nutriments et de l'O₂ aux cardiomyocytes.

a) Altération de la vasomotricité

Un défaut de vasomotricité peut engendrer un défaut d'apport en nutriments et en O₂. Il est, en effet, suggéré que la vasomotricité joue un rôle critique dans la perfusion cardiaque, notamment grâce au NO. Il a d'ailleurs été démontré que l'administration chronique d'un donneur de NO augmente le flux coronaire *ex vivo* et limite la dysfonction diastolique du ventricule gauche (augmentation du rapport E/A, diminution de la relaxation) chez des souris diabétiques (Cao et al. 2015).

b) Raréfaction capillaire et altération de l'angiogenèse

La diminution de l'apport en nutriments et en O₂ aux cardiomyocytes pourrait aussi être due à une diminution de la densité capillaire. La relation entre la densité capillaire et le phénotype des cardiomyocytes a été largement étudiée dans le cadre de l'hypertrophie cardiaque adaptative. Il a, en effet, été démontré que l'angiogenèse est nécessaire à la croissance des cardiomyocytes. L'expression de facteurs pro-angiogéniques (Tirziu et al. 2007 ; Jaba et al. 2013), dans le cœur, induit une hypertrophie cardiaque. Et cette hypertrophie dépendrait d'une production de NO par les CE angiogéniques. L'hypertrophie des cardiomyocytes est effectivement inhibée en présence de L-NAME, inhibiteur de NOS. À l'inverse, la délétion du gène du facteur de croissance endothélial vasculaire A (*Vegfa*) dans les cardiomyocytes, diminue la densité capillaire et induit une légère atrophie cardiaque (Giordano et al. 2001). Ces résultats prouvent que l'angiogenèse et une densité capillaire suffisante sont nécessaires à la bonne croissance des cardiomyocytes.

c) Thrombose

Une thrombose microvasculaire pourrait également provoquer un défaut d'apport en nutriment et O₂. Cependant, peu de choses sur la thrombose des petits vaisseaux pouvant conduire à une occlusion capillaire sont connues. Des études expérimentales récentes suggèrent que la thrombose des petits vaisseaux peut contribuer à l'IC. Il a, en effet, été démontré que l'augmentation de la thrombose suite à l'activation des neutrophiles exacerbe l'hypoxie cardiaque induite par l'Ang II, l'hypertrophie des cardiomyocytes et la dysfonction diastolique (Tang et al. 2022).

2. Altération de la communication CE-cardiomyocyte

Une altération des facteurs sécrétés par les CE peut également modifier les propriétés des cardiomyocytes.

a) NO

Principalement connu pour son effet vasodilatateur, le NO a également des effets directs sur les cardiomyocytes. Le NO module la contractilité des cardiomyocytes et la fréquence cardiaque, mais aussi la croissance et la rigidité des cardiomyocytes (Rastaldo et al. 2007).

L'effet du NO sur la contractilité des cardiomyocytes dépend des niveaux de NO. De faibles niveaux de NO ont des effets inotropes positifs alors que des niveaux élevés de NO ont des effets inotropes négatifs. La régulation de la contractilité des cardiomyocytes dépend notamment du NO dérivé de la NOS1 (Martin et al. 2006). Dans les cardiomyocytes, la NOS1 améliore la contraction en augmentant les niveaux protéiques du phospholamban qui inhibe la SERCA2a et permet au Ca^{2+} de sortir du réticulum sarcoplasmique induisant des effets inotropiques et dromotropiques positifs (Ziolo, Kohr, et Wang 2008 ; Ally et al. 2020).

En revanche, la régulation de la croissance des cardiomyocytes semble dépendre principalement de la NOS3. En effet, les souris *Nos3*KO développent une hypertrophie cardiaque (Tsutsui et al. 2015).

Il a été suggéré que le NO prévient également la rigidité des cardiomyocytes en régulant la phosphorylation de la titine via l'activation de la PRKG1 ou de la PKA (van Heerebeek et al. 2012).

b) Endothéline (EDN1), Neuréguline 1 (NRG1) et Apéline (APLN)

L'altération du cardiomyocyte pourrait aussi être due aux facteurs constricteurs sécrétés par les CE comme l'endothéline (EDN1), la neuréguline 1 (NRG1) et l'apéline (APLN). La dysfonction endothéliale provoque, en effet, une augmentation de production de ces facteurs entraînant alors une augmentation de la contractilité des cardiomyocytes (Hu, Von Harsdorf, et Lang 1988 ; Concas et al. 1989 ; Szokodi et al. 2002 ; Farkasfalvi et al. 2007) ainsi qu'une hypertrophie (Ito et al. 1991; Zhao et al. 1998 ; Baliga et al. 1999 ; Scimia et al. 2012).

Cependant, l'hypertrophie provoquée par l'EDN1 est en fait provoquée par l'EDN1 des cardiomyocytes eux-mêmes et non celle produite par les CE (Shohet et al. 2004; Heiden et al. 2014). De plus, l'effet de la NRG1 sur l'hypertrophie des cardiomyocytes ne se fait pas directement sur les cardiomyocytes, mais sur les CE via une signalisation autocrine (Özcelik et al. 2002; Dugaucquier et al. 2020). Enfin, les effets hypertrophiques de l'APLN sont contradictoires avec ceux retrouvés dans d'autres études où elle est cardioprotectrice (Simpkin et al. 2007 ; Parikh et al. 2018).

En somme, le rôle proposé du NO, de la NRG1, de l'APLN et de l'EDN1 dans la signalisation entre l'endothélium et les cardiomyocytes reste discuté. En effet, le NO modulant le phénotype du cardiomyocyte est principalement produit par les cardiomyocytes eux-mêmes. L'hypertrophie des cardiomyocytes est régulée par l'EDN1 dérivé des cardiomyocytes, mais pas de l'endothélium (Shohet et al. 2004). La NRG1 n'interagit pas directement avec les cardiomyocytes, mais exerce son action cardiaque via une signalisation autocrine dans les CE (Dugaucquier et al. 2020). Enfin, l'APLN exercerait un effet anti-hypertrophique via les CE. Le médiateur moléculaire de la signalisation endothéliale au cardiomyocyte reste donc à identifier.

c) Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les ERO sont principalement produites par les cardiomyocytes dans l'ICFcr, mais sont aussi produites par les CE dans l'ICFcp (Münzel et al. 2015). Au niveau des vaisseaux sanguins, elles sont produites par les enzymes pro-oxydantes activées comme la NOX et la NOS découplée.

Une surexpression endothéliale de la NOX exacerbe, en effet, la dysfonction diastolique induite par l'Ang II (diminution du volume télédiastolique, augmentation de la rigidité du VG). La dysfonction diastolique est alors associée à une augmentation de la fibrose et de l'inflammation cardiaques (Murdoch 2014).

Quant à la NOS, son couplage dépend notamment de la disponibilité suffisante du substrat (L-arginine) et des cofacteurs ainsi que d'un environnement redox équilibré. Le défaut de l'un de ces composants induit un découplage de la NOS, avec un déplacement des électrons vers l'O₂ et ainsi la production d'un ion superoxyde (O₂⁻) au lieu du NO (Farah, Michel, et Balligand 2018).

Dans le cœur, les ERO peuvent activer la CAMKII, ce qui entraîne un couplage excitation-contraction. En outre, les ERO peuvent promouvoir l'hypertrophie des cardiomyocytes (Dubois-Deruy et al. 2020).

3. Modification du micro-environnement du cardiomyocyte

Enfin, la dysfonction des CE peut affecter indirectement la fonction du cardiomyocyte en modifiant le micro-environnement du cardiomyocyte. Le dysfonctionnement des CE peut notamment favoriser la fibrose, l'inflammation ou l'œdème cardiaque via une production accrue de signaux profibrotiques et pro-inflammatoires ou une altération des propriétés de barrière.

a) Perméabilité capillaire et œdème

La fuite capillaire entraîne un œdème cardiaque et modifie la physiologie cardiaque (Dongaonkar et al. 2010). Il est important de noter que l'œdème cardiaque peut perturber les contacts cellule-cellule, l'élasticité de la paroi cardiaque et comprimer les capillaires cardiaques (Hsieh et al. 2006; Tirziu, Giordano, et Simons 2010; Talman et Kivelä 2018). Il a notamment été démontré qu'une accumulation de liquide de seulement 2 % dans l'interstitium cardiaque peut induire une augmentation de la pression interstitielle et entraîner une rigidification de la paroi cardiaque, ce qui nuit à la relaxation cardiaque (Dongaonkar et al. 2012; Desai et al. 2008). De plus, lorsque le liquide s'accumule dans l'interstitium, la distance de diffusion de l'O₂ entre les capillaires et les myocytes augmente.

b) Fibrose

Les CE peuvent également favoriser la fibrose cardiaque par la production de molécules profibrotiques, notamment le TGFβ1, le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF) et l'EDN1 (Xuetao Sun et al. 2020). Il a, en effet, été démontré que la délétion de l'EDN1 dans les CE provoque la diminution de la protéine de jonction cadhérine 5, l'augmentation du TGFβ1 et de la fibrose cardiaque chez les souris (Widyantoro et al. 2010). La fibrose cardiaque pourrait aussi être favorisée par l'activation des CE entraînant une infiltration de cellules inflammatoires dans le cœur.

Enfin, les CE pourraient contribuer directement à la fibrose par la transition phénotypique des CE en cellules mésenchymateuses. La transition endothélio-mésenchymateuse peut être induite par le TGF β 1, l'EDN1, l'hypoxie et un flux sanguin perturbé (Xiaodi Sun et al. 2020).

c) Inflammation

L'inflammation peut aussi affecter le micro-environnement des cardiomyocytes. Cette inflammation serait permise par l'activation endothéliale caractérisée par l'expression de molécules d'adhésion qui permettrait aux leucocytes de s'infiltrer dans le tissu cardiaque.

La délétion d'*Icam1*, exprimé par les CE, empêche effectivement le recrutement de leucocytes et la fibrose cardiaque induits par une constriction aortique. La prévention de l'inflammation est associée à une amélioration significative de la fonction diastolique (diminution de la pression télédiastolique, augmentation de dP/dt min) et systolique (augmentation de la fraction de raccourcissement et de dP/dT max) (Salvador et al. 2016).

En outre, l'infiltration de macrophages (Ning Zhang et al. 2022) et de neutrophiles (Xin-Lin Zhang et al. 2022) induite par l'activation des CE favorise la dysfonction diastolique (augmentation de la pression télédiastolique et de Tau) dans un contexte d'hypertension, tout comme les mastocytes chez les souris *Lepr^{db/db}* (Guimbal et al. 2021).

L'activation endothéliale entraîne aussi la production de cytokines inflammatoires. Celles-ci activent les fibroblastes cardiaques, modifient le phénotype des cardiomyocytes et exacerbent la dysfonction endothéliale. Il a, en effet, été démontré que la perfusion de TNF α induit une dysfonction systolique chez le rat (Bozkurt et al. 1998), de même avec l'Il-1 β chez la souris (Benjamin W. Van Tassel et al. 2013). Au niveau cellulaire, le TNF α induit un effet inotrope négatif et favorise l'apoptose des cardiomyocytes (Bozkurt et al. 1998). L'Il-1 β réduit la réactivité β adrénergique des canaux calciques de type L et l'expression des gènes impliqués dans la régulation de l'homéostasie calcique et stimule l'apoptose des cardiomyocytes (Szekely et Arbel 2018).

Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que l'activation des CE, en favorisant le recrutement de cellules inflammatoires, peut participer à la physiopathologie de l'IC notamment en modifiant la contractilité des cardiomyocytes et en augmentant leur apoptose via les cytokines.

Dans l'ensemble, ces données démontrent que les CE peuvent effectivement affecter l'homéostasie et la fonction des cardiomyocytes de nombreuses façons (Fig 25).

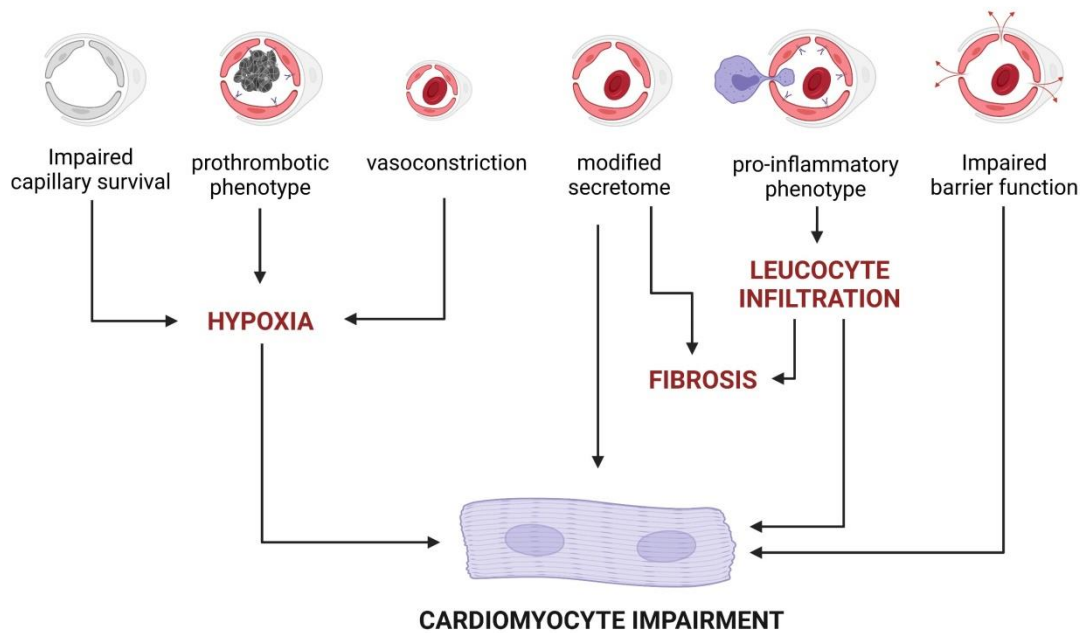


Figure 25 Mécanismes pouvant expliquer l'effet de la dysfonction endothéliale sur les cardiomyocytes (Cornuault et al. 2022)

4. Conclusion

Ainsi, beaucoup de données indiquent que la dysfonction endothéliale pourrait induire la dysfonction diastolique, mais ces résultats reposent sur des associations, il n'y a aucune preuve. De plus, le paradigme proposé par Paulus suggère que le NO joue un rôle central dans la dysfonction diastolique alors que les souris *Nos3KO* ne développent pas de dysfonction diastolique, leur pression télédiastolique n'étant pas modifiée (Tsutsui et al. 2015; Ebner et al. 2017). Les essais cliniques évaluant le potentiel thérapeutique de la signalisation NO/GCs/GMPc n'ont pas non plus montré de bénéfices chez les patients atteints d'ICFep (Borlaug et al. 2018; Armstrong et al. 2020; Redfield et al. 2013). L'implication de la dysfonction endothéliale dans la physiopathologie de l'ICFep reste donc à démontrer.

C. Preuves expérimentales attestant le rôle essentiel de la CE dans la physiologie cardiaque

1. La modification génétique des propriétés des CE est suffisante pour provoquer une dysfonction cardiaque

Afin de démontrer spécifiquement les conséquences de la dysfonction endothéliale sur les cardiomyocytes et la fonction cardiaque, plusieurs groupes ont évalué le phénotype cardiaque de souris présentant une délétion spécifique de l'endothélium. Des études démontrent, en effet, que la délétion ou la surexpression d'un gène spécifiquement dans les CE suffit à elle seule à provoquer l'IC (tableau 1).

Tableau 1 Modifications génétiques dans CE induisant une dysfonction cardiaque

Genetic modification	Age/sex of mice	mechanism	Modifications of cardiac properties	Type of dysfunction
<i>Sirt3</i> ECKO (X. He et al. 2017)	12 month-old male mice	<ul style="list-style-type: none"> ↘ Capillary density ↘ glycolysis ↗ ERO 	<ul style="list-style-type: none"> ↘ CFR ↗ IVRT ↗ MPI 	Diastolic dysfunction
<i>Sirt3</i> ECKO (Zeng, He, et Chen 2020)	10 week-old female mice		<ul style="list-style-type: none"> ↘ E'/A' ↗ IVRT ↗ MPI 	Diastolic dysfunction
<i>Sirt1</i> ECKO (Maizel et al. 2014)	30 to 40 week old	<ul style="list-style-type: none"> ↘ Capillary density ↔ HIF1a ↔ Fibrosis 	<ul style="list-style-type: none"> ↗ IVRT ↗ MPI ↘ SERCA2a 	Diastolic dysfunction
EC Tg (ADRB3) (Dhot et al. 2020)	45 week-old male rats	<ul style="list-style-type: none"> ↗ ERO (O₂') ↗ NO ↘ NOS3 ↗ NOS1 & NOS2 	<ul style="list-style-type: none"> ↗ E/A ↗ Left atrial dilatation ↗ EDP ↘ Contractility (under stress) 	Diastolic dysfunction
Tg (<i>FOXO1-CA</i>) (Dharaneeswaran et al. 2014)		<ul style="list-style-type: none"> ↔ Capillary density ↘ Capillary lumen (endothelial hypertrophy) 	<ul style="list-style-type: none"> ☐ cardiac output 	Cardiac dilation

Il a été démontré que la délétion de *Sirt3* ou *Sirt1* et la surexpression du récepteur adrénergique bêta-3 (ADRB3) ou NOX2 dans les CE induisent une dysfonction diastolique. Plus précisément, il a été démontré que la suppression endothéliale spécifique de *Sirt3* (He et al. 2017) et de *Sirt1* augmente le temps isovolumique de relaxation et le rapport E/e' (Maizel et al. 2014). Cette augmentation est associée à une diminution des niveaux de SERCA2a chez les souris déficientes en *Sirt1*. Alors que les souris *Sirt3*^{ECKO} présentent une augmentation de la fibrose périvasculaire, ce n'est pas le cas des souris *Sirt1*^{ECKO}.

En outre, les souris *Sirt3*^{ECKO} et *Sirt1*^{ECKO} présentaient toutes deux une diminution de la densité des capillaires cardiaques et une diminution de la réserve coronaire. Des expériences *in vitro* ont montré que la délétion de *Sirt3* endothélial augmente la consommation d'oxygène et la production d'ERO dans les CE. Il a notamment été proposé que le phénotype soit plus sévère chez les femelles puisque les souris femelles *Sirt3*^{ECKO} développent une hypertrophie cardiaque alors que les souris mâles *Sirt3*^{ECKO} non (He et al. 2017) (Zeng, He, et Chen 2020). Chez les rats surexprimant ADRB3, la dysfonction diastolique a été mise en évidence par une augmentation de la pression télédiastolique et du rapport E/A (Dhot et al. 2020). Chez ces rats, la dysfonction diastolique est associée à une production accrue

d'ERO et à une fibrose cardiaque. Contrairement aux souris *Sirt3*^{ECKO}, seuls les mâles surexprimant ADRB3 ont développé une dysfonction diastolique (Dhot et al. 2021).

2. La modification génétique des propriétés des CE peut exacerber l'IC

Des études ont révélé que certaines modifications génétiques de CE exacerbent l'IC induite par une perfusion d'AngII ou par une constriction aortique transverse (TAC) alors qu'elles ne sont pas suffisantes pour induire l'IC par elles-mêmes. C'est le cas de la délétion de la Forkhead Box P1 (*Foxp1*), du récepteur 1 de la sphingosine-1-phosphate (*S1pr1*) ou de la sous-unité α du facteur 1 inductible par l'hypoxie (*Hif1 α*) et de la surexpression de NOX2 (tableau 2).

Tableau 2 Modifications génétiques dans les CE exacerbant l'IC

Genetic modification	model	Mechanisms	Modifications of cardiac properties	Type of dysfunction
<i>Lipg</i> KO (Nakajima et al. 2013)	TAC 12-week-old male mice	↘ β -oxidation	↗ Hypertrophy ↘ FS ↗ NPPA and NPPB Pulmonary edema	Systolic dysfunction
EC Tg (NOX2) (Murdoch et al. 2014)	AngII 1.1 mg/kg/day 14 days 12-week-old male mice	↗ ERO ↗ Fibrosis (COL1A1) ↗ Inflammation (CD45+, Mac3+).	↘ LV end-systolic volume ↘ Stroke volume ↘ LV end-diastolic dimension and volume	Diastolic dysfunction
<i>S1pr1</i> ECKO (X. Liu et al. 2020)	TAC (1 week after TAM injection)	↗ Fibrosis	↗ Hypertrophy ↘ FS ↘ EF	Systolic dysfunction
<i>Foxp1</i> ECKO (J. Liu et al. 2019)	AngII 1.44 mg/kg/day 14 days (1 week after TAM injection)	↗ Fibrosis (COL1A1, COL3A1, TGF β 1, fibroblast proliferation)	↗ Hypertrophy ↗ E/e' ↗ CM size	Diastolic dysfunction
<i>Hif1α</i> ECKO (Wei et al. 2012)	TAC male mice	↘ Vascular density ↗ Myocardial hypoxia ↗ Fibrosis (TGF β)	↘ EF ↘ FS ↗ Hypertrophy	Systolic dysfunction
<i>Sirt3</i> ECKO (Zeng, He, et Chen 2020)	TAC 7 weeks after	↘ APLN ↘ HIF1 α ↘ GLUT1 ↘ Glucose uptake	↗ Hypertrophy ↘ EF ↘ FS	Systolic dysfunction

Plus précisément, il a été démontré que la perte de *Foxp1* endothélial (J. Liu et al. 2019, 1) ou la surexpression de NOX2 (Murdoch et al. 2014) exacerbent la dysfonction diastolique induite par l'AngII (augmentation d'E/e', de la rigidité diastolique du VG et de la pression télédiastolique) (J. Liu et al. 2019, 1). En revanche, la délétion endothéliale de *S1pr1* (Xiuxiang Liu et al. 2020) ou de *Hif1α* (Wei et al. 2012) exacerbe l'hypertrophie cardiaque et la dysfonction systolique induites par la TAC (diminution de la FE). La délétion endothéliale de *Foxp1* exacerbe l'hypertrophie cardiaque induite par l'AngII, mais pas la surexpression de NOX2.

Dans toutes ces études, l'exacerbation de l'IC est associée à une formation accrue de myofibroblastes puis à une fibrose cardiaque. D'un point de vue mécanistique, il a été proposé que *Foxp1* et *Hif1α* limitent la fibrose en régulant à la baisse le TGFβ1 dans les CE, tandis que la signalisation en aval de *S1pr1* dans les CE est proposée comme promouvant la phosphorylation de la NOS3, ce qui entraîne une augmentation de l'activité des GC dans les fibroblastes. Le blocage du TGFβ1 a d'ailleurs empêché l'exacerbation de l'IC chez les souris *Foxp1*^{ECKO} et *Hif1α*^{ECKO} (J. Liu et al. 2019, 1) (Wei et al. 2012).

De plus, l'exacerbation de l'IC chez les souris *Foxp1*^{ECKO} et *Hif1α*^{ECKO} est associée à une raréfaction capillaire augmentant l'hypoxie cardiaque (J. Liu et al. 2019, 1) (Wei et al. 2012). En outre, il a été démontré que du milieu conditionné de CE surexprimant S1PR1 diminuait la chaîne lourde de la myosine MYH7 dans les cardiomyocytes, suggérant que la délétion de *S1pr1* dans les CE peut également modifier le phénotype des cardiomyocytes (Xiuxiang Liu et al. 2020). Les souris surexprimant NOX2 présentent une infiltration cardiaque significative de leucocytes associée à une augmentation des niveaux de VCAM1 (Murdoch et al. 2014).

Il a été prouvé que la délétion de *Sirt3* dans les CE n'induit qu'une dysfonction diastolique (Zeng, He et Chen 2020) (He et al. 2017). En revanche, il a été établi que, associé à la TAC, la délétion de *Sirt3* dans les CE exacerbe la dysfonction systolique (diminution de la FEVG) et l'hypertrophie cardiaque induite par la TAC (Zeng, He et Chen 2020 a).

D. Conclusion

L'ensemble de ces résultats démontrent que les modifications des propriétés des CE sont suffisantes pour induire une dysfonction cardiaque. Il reste à vérifier si ces mécanismes peuvent réellement participer à la physiopathologie de l'ICFEp.

V. Dimorphisme sexuel

Plusieurs études ont montré que l'ICFep était davantage retrouvée chez les femmes plutôt que chez les hommes et surtout chez les femmes ménopausées. Elles correspondraient, en effet, à environ 55 % des patients atteints d'ICFep. Les hommes semblent plus à risque d'avoir une ICFer qu'une ICFep (Ceia et al. 2002 ; Gerber et al. 2015 ; Ho et al. 2016 ; Stolfo et al. 2019). Cette répartition serait due à une prévalence des comorbidités, comme le diabète, plus importante chez les femmes (Fig 26) ainsi qu'à la ménopause.

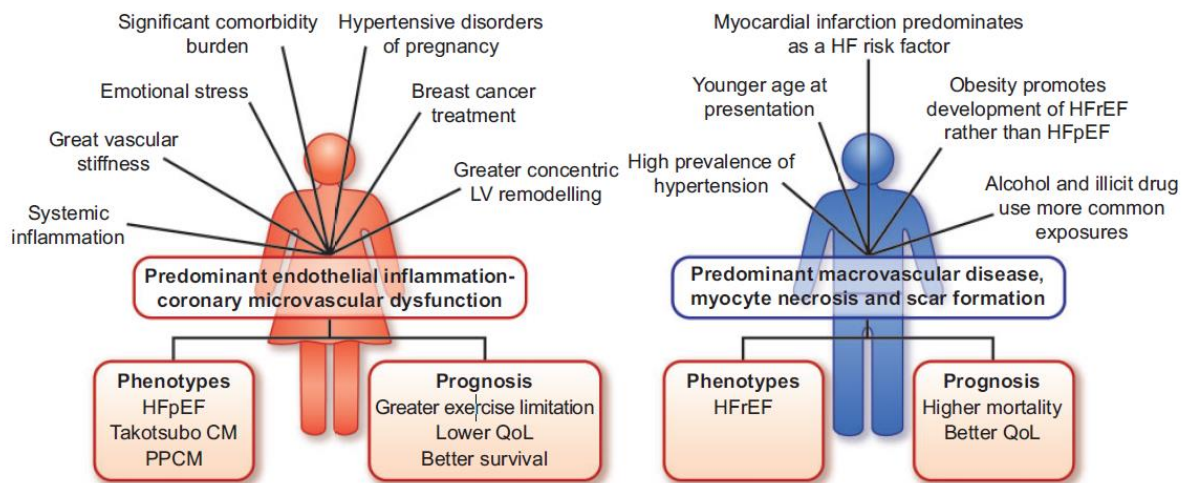


Figure 26 Différences entre les femmes et les hommes dans l'IC (Lam et al. 2019)

A. Différences des FRCV

La prévalence du diabète est plus importante chez les hommes (Kautzky-Willer, Harreiter, et Pacini 2016), cependant, chez les femmes, ce diabète entraîne un remodelage du VG avec épaississement des parois non retrouvé chez les hommes (Galderisi et al. 1991). La prévalence plus importante de l'obésité chez les femmes associée au diabète soutient l'hypothèse de l'inflammation dans l'ICFep proposé par Paulus (Paulus et Tschöpe 2013 ; Tromp et al. 2018).

Concernant un autre FRCV, l'hypertension, elle entraîne chez les femmes une hypertrophie concentrique comme retrouvée chez les patients avec ICFep alors que chez les hommes, l'hypertrophie est excentrique (Krumholz, Larson, et Levy 1993 ; Lam et al. 2019).

La prévalence des FRCV peut aussi être influencée par la ménopause.

B. Ménopause

La ménopause correspond à l'arrêt définitif des menstruations. Elle intervient généralement entre 45 et 55 ans. Elle survient lorsque les ovaires arrêtent leur sécrétion hormonale (œstrogènes et progestérone) et la formation d'un ovule chaque mois. La survenue de la ménopause est due à l'épuisement du stock limité de follicules ovariens (« Ménopause · Inserm, La science pour la santé » s. d.).

Les problèmes potentiels liés à la ménopause sont de deux types : les symptômes qu'elle entraîne et le risque augmenté de certaines maladies (ostéoporose, maladies cardiovasculaires).

La ménopause a un impact sur les FRCV, notamment le diabète. Les œstrogènes sont, en effet, protecteurs vis-à-vis du diabète et la carence en œstrogènes induite par la ménopause augmente le risque de diabète (Handgraaf et al. 2018), d'autant plus quand la ménopause survient précocement (Muka et al. 2017). De plus, l'obésité, facteur de risque majeur de l'ICFep, est retrouvée au niveau abdominal et viscéral chez les femmes après la ménopause et est associée à une détérioration de la fonction cardiaque (Eaton et al. 2016 ; Selvaraj et al. 2016).

C. Mécanismes

Les différences observées entre les hommes et les femmes, notamment la prévalence de la maladie et le remodelage cardiaque, pourraient être dues aux œstrogènes (Lam et al. 2019). Ce sont des hormones stéroïdiennes dérivées du cholestérol. Elles existent de manière endogène sous trois formes : l'œstradiol, forme la plus importante, l'œstrone et l'œstriol. L'œstradiol est produit par les ovaires, mais aussi par les vaisseaux sanguins. Les œstrogènes agissent en se fixant sur leurs récepteurs ER α et ER β . Ces deux types de récepteurs sont exprimés par les cellules vasculaires et différents tissus comme le foie, les os, le cerveau et le cœur (Mendelsohn 2002). Ils peuvent agir de manière génomique en agissant comme des facteurs de transcription ou de manière non génomique sur les voies de signalisation intracellulaires. Il existe un troisième récepteur aux œstrogènes couplé aux protéines G : GPR30.

1. Effets des œstrogènes sur les cardiomyocytes

Les récepteurs aux œstrogènes (ER) sont exprimés dans les cardiomyocytes (Grohé et al. 1997). À l'âge adulte, c'est ER α qui est le plus exprimé (Jankowski et al. 2001).

a) *Contraction et relaxation*

La perte d'œstrogènes pourrait aggraver la dysfonction cardiaque notamment au niveau de la relation pression-volume télédiastolique du VG et du temps de relaxation tout en préservant la fonction d'éjection du VG (Bustamante et al. 2019). Ces résultats suggèrent que la déplétion en œstrogènes, pouvant notamment être due au vieillissement, joue un rôle important dans le développement de l'ICFep.

Les œstrogènes régulent la contraction et la relaxation des cardiomyocytes notamment en diminuant les niveaux d'expression des canaux calciques de type L. Quand le récepteur aux œstrogènes ER α est bloqué, l'expression en ARNm et protéique des canaux calciques de type L est, en effet, augmentée au niveau du cœur (Johnson et al., s. d.). La surexpression des canaux calciques entraînerait alors des anomalies de la contraction et l'excitabilité cardiaque avec un risque accru d'arythmies et de maladies cardiovasculaires.

Le phénotype de dysfonction cardiaque peut être prévenu par l'administration d'un agoniste du récepteur GPR30 qui empêche l'augmentation de la pression télédiastolique, de dP/dt_{min} et de tau et améliore ainsi la relaxation (Xiaowei Zhang et al. 2021). Les effets des œstrogènes sur le cœur ne passeraient donc pas seulement par ER α mais aussi par GPR30.

b) Remodelage cardiaque

Chez les patients atteints d'ICFEP, des taux élevés de testostérone sont associés à une augmentation de la masse du VG. En outre, chez les femmes, des taux élevés de testostérone libre et des taux bas de SHBG (sex hormone binding globulin) sont associés à un changement du ratio masse/volume du VG correspondant à un remodelage concentrique. Cette étude suppose ainsi qu'un profil androgénique (plus de testostérone et moins de SHBG) serait associé à une augmentation de la masse du VG et du ratio masse/volume (Subramanya et al. 2018). Ces résultats sont aussi retrouvés dans les modèles animaux.

Chez des rates âgées et ovariectomisées, l'ovariectomie induit une augmentation de la masse du VG associée à une augmentation de l'expression de la MYH7 et du collagène et une diminution de l'activité de la MMP-2. Ces résultats suggèrent que les hormones femelles protègent de l'hypertrophie et de la fibrose. De plus, ces souris présentent une diminution des récepteurs aux œstrogènes ER α et ER β . La supplémentation en œstradiol a permis de prévenir le remodelage cardiaque et a restauré le niveau d'expression des ER (Xu 2003). Les mêmes résultats sont observés dans un modèle d'hypertrophie induite par surcharge volumique (van Eickels et al. 2001). Les œstrogènes agissent notamment sur la voie p38/MAPK activée dans les cardiomyocytes des souris ovariectomisées (van Eickels et al. 2001 ; Clerk, Michael, et Sugden 1998).

Des souris déficientes en ER β développent également une hypertension et une hypertrophie confirmant le rôle protecteur des œstrogènes via ce récepteur dans l'hypertrophie (Förster et al. 2004). En outre, l'ANP, connu pour être anti-hypertrophique, est diminué au niveau des cardiomyocytes de rates ovariectomisées (Jankowski et al. 2001). Ces résultats sont cohérents l'augmentation de l'ANP induite par les œstrogènes qui prévient l'hypertrophie dans un modèle *in vitro* de cardiomyocytes (Pedram et al. 2005; « 17 β -Estradiol Antagonizes Cardiomyocyte Hypertrophy by Autocrine/Paracrine Stimulation of a Guanylyl Cyclase A Receptor-Cyclic Guanosine Monophosphate-Dependent Protein Kinase Pathway », s. d.).

Ainsi, les œstrogènes protégeraient du remodelage cardiaque en prévenant l'hypertrophie et la fibrose.

2. Effets des œstrogènes sur les CE

a) Survie, migration et prolifération

L'œstradiol augmente à la fois la migration et la prolifération des CE *in vitro* (Geraldès et al. 2002). Cet effet contribue à accélérer la réendothélisation *in vivo* (Filipe et al. 2008).

En plus de la réparation endothéliale, l'œstradiol favorise l'angiogenèse dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (Rubanyi, Johns, et Kauser 2002 ; Fontaine et al. 2006). L'œstradiol induit, en effet, l'expression

de plusieurs facteurs proangiogéniques comme le FGF-2, le VEGF et le NO (Rubanyi, Johns, et Kauser 2002 ; Fontaine et al. 2006 ; Garmy-Susini et al. 2004 ; Chambliss et Shaul 2002). En accord avec ces résultats, l'œstradiol augmente l'angiogenèse dépendante de VEGFA via VEGFR2 dans des CE bovines (Suzuma et al. 1999).

Les œstrogènes auraient également un rôle sur la survie des CE en les protégeant de l'apoptose induite par le TNF α et les LDL oxydés (Florian et Magder 2008; Spyridopoulos et al. 1997).

b) Activation/Molécules d'adhésion

Les œstrogènes régulent aussi l'activation endothéliale en inhibant les formes solubles d'ICAM1 et de VCAM1 exprimées par les CE dans les sérums de femmes ménopausées traitées par œstrogènes (Koh 1999). De même, en culture cellulaire, les œstrogènes induisent la diminution de l'expression d'ICAM1 et de VCAM1 (Caulin-Glaser et al., s. d. ; Nakai et al. 1994 ;). Cette diminution induite par les œstrogènes est d'ailleurs empêchée par les antagonistes des ER (Simoncini, De Caterina, et Genazzani 1999).

c) Vasomotricité

Les œstrogènes réguleraient également la contraction des vaisseaux. La délétion du récepteur ER α , dans un contexte de vieillissement et d'hypertension, entraîne, en effet, une augmentation de la pression artérielle systolique et de la contractilité vasculaire (contraction induite par phényléphrine) (Guivarc'h et al. 2020).

L'œstradiol inhibe la synthèse d'EDN1, facteur vasoconstricteur, dans les CE (Morey et al. 1998) via les récepteurs aux œstrogènes (Akishita et al. 1998). L'EDN1 est d'ailleurs augmentée chez les femmes ménopausées non supplémentées en œstradiol (Ylikorkala et al. 1995). Les œstrogènes auraient aussi un rôle sur la vasodilatation, notamment en activant la production de NO par la NOS3 via ER α localisé dans les CE (Arnal et al., s. d. ; Chambliss et Shaul 2002).

De plus, l'hypertension induite par l'AngII et le vieillissement réduisent la relaxation dépendante de l'endothélium et cet effet est plus prononcé chez des souris délétées pour ER α . Ces résultats suggèrent que les effets des œstrogènes dépendants du récepteur ER α permettent d'atténuer les effets de l'hypertension et du vieillissement (Guivarc'h et al. 2020).

Une amélioration de la dilatation médiée par le flux a aussi été observée chez des femmes ménopausées traitées par œstrogènes (Koh et al. 1999). Ce résultat est retrouvé chez des souris délétées pour ER α supplémentées en œstrogènes (Guivarc et al., s. d.) suggérant que les effets des œstrogènes ne dépendent pas seulement du récepteur ER α .

d) Thrombose

Les œstrogènes préviennent également la thrombose en diminuant la concentration en fibrinogène, en PAI et en TPA provenant des CE chez des femmes ménopausées traitées par œstradiol et chez des femmes préménopausées en comparaison à des hommes et à des femmes ménopausées non supplémentées (Koh et al. 1997; Gebara et al. 1995).

3. Effets des œstrogènes sur l'inflammation

L'inflammation importante dans l'ICFep pourrait être prévenue par les œstrogènes.

En cohérence avec la diminution de l'expression des molécules d'adhésion par les CE, l'œstradiol inhibe également l'adhésion des monocytes aux CE en réponse aux cytokines et aux LDL oxydés (Suzuki et al. 1997) et empêche l'infiltration de macrophages dans l'athérosclérose (Cheng et al. 1991). Cet effet anti-inflammatoire passe par l'inhibition de NFκB *in vitro* (Rodríguez et al. 2002) et *in vivo* dans des modèles d'hypercholestérolémie (Nathan et al. 1999 ; Gourdy et al. 2003). La microscopie intravitale sur artérioles mésentériques de rat a aussi montré que la privation d'œstrogènes provoque une inflammation systémique de bas grade et que la supplémentation en œstradiol réduit cette inflammation (Abu-Taha et al. 2009).

Les études de l'impact de l'œstradiol sur les cellules inflammatoires elles-mêmes ont révélé des effets opposés. Un traitement *in vitro* par œstradiol dans une lignée cellulaire de macrophages a conduit à un effet anti-inflammatoire (Ghisletti et al. 2005). Mais l'œstradiol potentialise aussi la capacité des cellules immunitaires circulantes ou résidentes à produire des cytokines inflammatoires chez des souris (Calippe et al. 2008 ; Soucy, Boivin, et Labrie, s. d.).

4. Conclusion

En somme, l'ICFep est retrouvée davantage chez les femmes, notamment les femmes ménopausées. Ce phénomène pourrait être dû à la carence en œstrogènes qui pourrait entraîner la dysfonction endothéliale retrouvée chez les patients atteints d'ICFep. Cependant, les œstrogènes pourraient aussi agir directement sur les cardiomyocytes et leur diminution pourrait donc être responsable de la dysfonction diastolique. Les mécanismes impliquant les œstrogènes dans la physiopathologie de l'ICFep restent à déterminer.

VI. Outils

A. Modèles animaux

Les patients atteints d'ICFEP ne se faisant pas transplanter, les biopsies de cœur de ces patients sont difficiles à obtenir, c'est pourquoi de nombreux modèles animaux ont été développés.

Cependant, l'ICFEP est une maladie hétérogène multifactorielle et il n'existe pas de modèle animal unique récapitulant la plupart des caractéristiques cliniques de cette maladie (Withaar, Lam, et al. 2021). Les modèles animaux d'ICFEP actuellement utilisés possèdent un ou plusieurs facteurs de risque de l'ICFEP et présentent une association de caractéristiques cliniques de l'ICFEP, mais ne répondent pas à toute l'hétérogénéité du syndrome clinique. La plupart d'entre eux présentent une dysfonction diastolique avec une élévation de la pression télédiastolique et une FEVG préservée. Les modèles correspondant à une combinaison de facteurs de risque cardiovasculaire ou « modèles multihits » sont considérés comme étant les plus appropriés pour étudier la maladie (Withaar, Lam, et al. 2021).

1. Modèles de rongeurs

a) Modèles à un seul FRCV

(1) Modèles atteints de maladie métabolique

Les souris *Lep^{rd^{db/db}}*, mâles et femelles, déficientes en récepteurs de la leptine, développent une obésité sévère et une hyperglycémie. Les femelles ont une prise de poids plus impressionnante que les mâles et présentent une augmentation de la pression artérielle. En accord avec la physiopathologie de l'ICFEP, ces souris présentent des signes de dysfonction diastolique (augmentation de la pression télédiastolique, d'E/A et d'E/e' dès l'âge de 3 mois) avec une FE préservée. Ceci est associé à un remodelage ventriculaire hypertrophique et à un œdème pulmonaire. Le fait que ces souris présentent ou non une fibrose cardiaque est controversé (Alex et al. 2018 ; Guimbal et al. 2021). Ce modèle est celui dans lequel la vascularisation cardiaque a été la mieux caractérisée. Ces souris présentent une raréfaction des capillaires cardiaques, une activation endothéliale (augmentation d'ICAM1 et de SELE) et une fuite capillaire (Guimbal et al. 2021). En outre, ces souris présentent une diminution du glycocalyx endothélial (Qiu et al. 2022) et une altération de la vasorelaxation périphérique à la carbamoylcholine (Otto et al. 2021). Enfin, le phénotype des CE cardiaques a été complété par une analyse transcriptomique via le séquençage de l'ARN (Guimbal et al. 2021).

Il a été démontré que le régime gras (HFD) induit une dysfonction diastolique caractérisée par une diminution du dP/dt max et du dP/dt min et est associée à une hypertrophie, une fibrose et une inflammation cardiaques (Ternacle et al. 2017 ; Bostick et al. 2017 ; Aroor et al. 2017). Mais le phénotype endothélial n'a pas encore été caractérisé dans ce modèle.

(2) Modèles de vieillissement

L'ICFEP étant une maladie associée au vieillissement, des souris SAMP8 (Senescence accelerated prone mice) (Gevaert et al. 2017) et des souris âgées de 24-30 mois (Roh et al. 2020) ont été utilisées comme modèles d'ICFEP. Il a été démontré que ces souris présentent une dysfonction diastolique (diminution d'E/A chez les souris SAMP8, augmentation du BNP chez les souris âgées) avec une FE préservée et un remodelage cardiaque caractérisé par une hypertrophie et une fibrose du ventricule gauche (Reed et al. 2011). Les souris SAMP8 présentent également une intolérance à l'effort et un œdème pulmonaire. Au niveau vasculaire, les souris SAMP8 présentent une altération de la relaxation dépendante de l'ACh associée à une diminution des niveaux de NOS3, une activation endothéliale (augmentation d'ICAM1) et une sénescence, tandis que les souris de 24-30 mois présentent une raréfaction des capillaires cardiaques.

(3) Modèles d'hypertension

Les modèles d'hypertension chez les rongeurs correspondent à des animaux nourris avec un régime riche en sel et traités avec de l'acétate de désoxycorticostérone (DOCA) précurseur de l'aldostérone (modèle DOCA-salt), à des souris perfusées avec de l'AngII, à des souris avec perfusion d'aldostérone et uninéphrectomie ou à des rats Dahl sensibles au sel.

L'association d'un régime salé et de l'administration de DOCA entraîne une augmentation du volume sanguin (hypervolémie) et favorise la réabsorption du sodium au niveau des tubules distaux des reins entraînant une importante hypertension artérielle. Chez les souris DOCA-salt, la dysfonction diastolique a été mise en évidence par une augmentation de la pression télédiastolique, une diminution d'E/A et une augmentation d'E/e associées à une hypertrophie cardiaque (Silberman et al. 2010; Lovelock et al. 2012; Mohammed et al. 2010 ; Bowen et al. 2017). Au niveau vasculaire, il a été démontré que ces souris présentent une activité de la NOS3 altérée avec une diminution de la production de NO et une augmentation de la production d'ERO (Silberman et al. 2010) associée à une expression accrue de la NOX2, de la NOX4 et de la chaîne α du cytochrome B-245 (CYBA) (Mohammed et al. 2010).

Les souris qui ont subi une uninéphrectomie et une perfusion d'aldostérone présentent une dysfonction diastolique caractérisée par une diminution du rapport E/A, une augmentation du temps isovolumique de relaxation, une diminution du temps de décélération et un œdème pulmonaire (Valero-Muñoz et al. 2016). Cette dysfonction diastolique s'accompagne d'une hypertrophie et d'une fibrose cardiaques (L. Zhang et al. 2021 ; Wilson et al. 2009 ; Valero-Muñoz et al. 2016 ; Valero-Munoz et al. 2016). Au niveau endothélial, ces souris présentent une diminution des niveaux de NOS3 phosphorylée et une activation endothéliale caractérisée par une augmentation des niveaux de VCAM1 soluble (L. Zhang et al. 2021 ; Wilson et al. 2009).

Les rats Dahl nourris avec un régime riche en sel présentent une dysfonction diastolique (augmentation de la pression télédiastolique), caractérisée par une altération de la relaxation cardiaque (diminution du dP/dt min et augmentation de Tau) associée à une hypertrophie, une fibrose et une inflammation cardiaques (Adams et al. 2015 ; Esposito et al. 2017). Chez ces rats, la dysfonction endothéliale se caractérise par une activation endothéliale (augmentation de VCAM1 et de SELE) et un découplage de

la NOS3 entraînant une diminution de la production de NO, une altération de la vasodilatation endothélium-dépendante à l'ACh et une augmentation du stress oxydatif (augmentation de la NOX2) (Adams et al. 2015). L'inconvénient majeur de ce modèle est que la FEVG diminue au bout d'un certain temps. De plus, le rat présente une HTA sévère non retrouvée chez les patients.

Le phénotype vasculaire n'a pas été évalué chez les souris perfusées avec l'AngII (Ichihara et al. 2001; Regan et al. 2015) chez qui la dysfonction diastolique a été caractérisée par une augmentation de la pression télédiastolique, du temps de relaxation isovolumique et de Tau et un rapport E/A plus faible. Dans ces modèles la dysfonction diastolique est souvent associée à l'hypertrophie et à la fibrose cardiaques.

b) Modèles à 2 composantes

Les rats ZSF1 diabétiques, obèses et hypertendus sont obtenus par croisement de rats Zucker diabétiques gras (ZDF) résistants à la leptine avec des rats insuffisants cardiaques spontanément hypertendus (SHHR). Ces rats développent une dysfonction diastolique avec une élévation de la pression télédiastolique et une altération de la relaxation cardiaque (diminution du dP/dt min) associée à une hypertrophie, une fibrose et une inflammation cardiaques (Schauer et al. 2021 ; Schmederer et al. 2018 ; Franssen et al. 2016 ; Leite et al. 2019). Au niveau vasculaire, il a été démontré que les rats ZSF1 présentent une activation endothéliale (augmentation d'ICAM1 et de SELE) et une diminution de la phosphorylation et du couplage de la NOS3, associées à une altération de la vasodilatation à l'ACh médiée par l'endothélium et à une diminution de la compliance artérielle.

Chez les souris, l'association de la maladie métabolique et de l'hypertension a été obtenue soit en combinant un régime HFD avec du L-NAME, soit avec un traitement par AngII.

Chez les souris traitées par HFD+L-NAME, la dysfonction diastolique est caractérisée par une augmentation de la pression télédiastolique et est associée à une hypertrophie et une fibrose cardiaque. La dysfonction vasculaire a été mise en évidence par la raréfaction des capillaires (Schiattarella et al. 2019). En accord avec le traitement continu par L-NAME, ces souris ont montré une altération de la vasodilatation endothélium-dépendante à l'ACh (Cordero-Herrera et al. 2020).

Chez les souris traitées par HFD+AngII, la dysfonction diastolique a été mise en évidence par une augmentation d'E/A, une diminution du volume diastolique final et une diminution du dP/dt min. Cette dysfonction diastolique est associée à une hypertrophie cardiaque, une fibrose et une inflammation (Du et al. 2018 ; Reddy, Agarwal, et Barthwal 2018). Le phénotype vasculaire cardiaque n'a pas été évalué dans ce modèle, mais il a été démontré que HIF1 α était régulé à la hausse, ce qui suggère une hypoxie cardiaque.

Un modèle combine le vieillissement avec une maladie métabolique. En effet, les souris SAMP8 ont été nourries avec un régime gras (western diet) pendant 24 semaines. Elles présentent des caractéristiques de dysfonction diastolique avec une augmentation de la pression télédiastolique et d'E/e' par rapport aux souris SAMP8 nourries avec un régime classique (Gevaert et al. 2017). Ceci est associé à une hypertrophie et une fibrose cardiaque. Au niveau vasculaire, ces souris présentent une diminution des niveaux de NOS3 et une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium, une activation endothéliale avec une augmentation des niveaux d'ICAM1 et une sénescence endothéliale (augmentation de p53).

c) *Modèles à trois composantes*

Plus récemment, des modèles à trois FRCV ont été développés. Ces modèles combinent maladie métabolique et hypertension avec vieillissement.

Des souris femelles âgées de 18 à 22 mois ont été traitées par HFD+AngII (Withaar, Meems, et al. 2021). Chez ces souris, l'IC a été mise en évidence par une congestion pulmonaire associée à une hypertrophie et une fibrose cardiaque. En outre, ces souris présentent une raréfaction capillaire, une apoptose endothéliale (expression accrue du récepteur Fas et de la caspase 3 activée) et des calcifications vasculaires (expression accrue du membre 12a de la superfamille des récepteurs du TNF α [TNFRSF12A] et de l'ostéprotégérine).

Dans un autre modèle, l'ICFEp a été induite par un régime HFD de 13 mois combiné à un traitement par DOCA (« 2021_Deng, Li_Targeting Mitochondria-Inflammation Circuit by β -Hydroxybutyrate Mitigates ICFEp.pdf », s. d.). Conformément à l'ICFEp humaine, ces souris présentent une relaxation cardiaque altérée avec une diminution du dP/dt min et une congestion pulmonaire. En outre, la dysfonction diastolique est associée à une hypertrophie cardiaque, une fibrose et une inflammation. L'évaluation du phénotype vasculaire est limitée à la mesure de la vasorelaxation dépendante de l'endothélium.

Tableau 3 Caractéristiques microvasculaires des modèles rongeurs d'ICFEp

	Capillary Density	Vasomotricity	NO/sGC-GMPC-PRKG1	Oxidative stress	Endothelial activation	Permeability	Pericyte coverage	Glycocalyx	Fibrosis	Inflammation
One hit models										
<i>Lepr</i> ^{db/db} mice	↘	ND	↘	ND	↗	↗	ND	↘	=/↗	↗
HFD/WD mice	ND	ND	ND	↗	ND	ND	ND	ND	↗	ND
Aged mice	↘	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	↗	ND
SAMP8 mice	ND	↘	↘	ND	↗	ND	ND	ND	↗	
DOCA-salt mice	↘	↘	↘	↗	ND	ND	ND	ND	=	ND
Aldosterone nephrectomy mice	ND	ND	↘	↗	↗	ND	ND	ND	↗	↗
Dahl rats	=	↘	↘	↗	↗	ND	ND	ND	↗	↗
AngII infusion mice	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	↗	ND
Two hit models										
ZSF1 rats	ND	↘	↘	↗	↗	ND	ND	ND	↗	↗
HFD+L-NAME mice	↘	↘	↘	ND	ND	ND	ND	ND	↗	ND
HFD+AngII mice	ND	ND	ND	↗	ND	ND	ND	ND	↗	↗
SAMP8+WD	ND	↘	↘	ND	↗	ND	ND	ND	ND	ND
Three hit models										
Age + HFD + AngII	↘	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	↗	↗
Age + HFD + DOCA	ND	↘	ND	↗	ND	ND	ND	ND	↗	↗

Ainsi, la caractérisation du dysfonctionnement endothélial est succincte dans la plupart des modèles animaux d'ICFep. La densité capillaire, le dysfonctionnement endothélial ou le stress oxydatif n'ont été évalués que dans 6 des 14 modèles de rongeurs énumérés ci-dessus (tableau 3). Même l'activité NOS3 ou la vasodilatation endothéliale, la caractéristique la plus étudiée du dysfonctionnement endothélial, n'a été évaluée que dans 8 des 14 modèles. La perméabilité endothéliale, qui présente chez 66 % des patients atteints d'ICFep (Fischer et al. 2022), n'a été quantifiée que dans un seul modèle.

2. Grands modèles animaux

Les modèles de grands animaux d'ICFep comprennent également des modèles à une ou plusieurs composantes (tableau 4).

a) Chiens hypertendus

L'hypertension a été induite chez des chiens âgés par enveloppement du rein avec du cellophane et par administration de pivalate de désoxycorticostérone (DOCP) pour exacerber l'inflammation. Ces chiens présentent une dysfonction diastolique caractérisée par une augmentation de la pression télédiastolique et une diminution de la constante Tau et est associée à une hypertrophie et une fibrose cardiaques (Munagala et al. 2005; Zakeri et al. 2016 ; Hamdani et al. 2013). Au niveau vasculaire, ces chiens présentent à la fois une raréfaction capillaire et une vasoconstriction associée à une altération de la signalisation du NO (Zakeri et al. 2016).

b) Porcs avec hypertension et hyperlipidémie

L'hypertension et l'hyperlipidémie ont été induites chez des porcs par un régime riche en sel, en graisses, en cholestérol et en glucides (western diet) et par l'administration de DOCA. Ce traitement induit une dysfonction diastolique caractérisée par un déplacement vers la gauche de la boucle pression-volume et une augmentation de la pression télédiastolique et d'E/e'. Dans ce modèle, la dysfonction diastolique était associée à une hypertrophie concentrique du ventricule gauche, à une fibrose cardiaque (Schwarzl et al. 2015 ; Sharp et al. 2021) et à une altération de la vasorelaxation endothélium-dépendante à la bradykinine et à la substance P (Sharp et al. 2021).

Alternativement, des porcs nourris avec un régime western diet, ont reçu du DOCA et ont été perfusés avec de l'AngII. Dans ce modèle, la dysfonction diastolique est caractérisée par une augmentation de l'IVRT, une diminution du dP/dt max et min et est associée à une hypertrophie, une fibrose et une inflammation cardiaques. Dans ce modèle, la signalisation du NO s'est également avérée altérée avec une expression réduite de NOS3, PRKG1 et du GMPc dans l'aorte (Nannan Zhang et al. 2019).

c) Porcs avec hypertension, hyperlipidémie et hyperglycémie

Des porcs femelles ont été nourris avec un régime HFD induisant une hypercholestérolémie, puis traités par de la streptozotocine pour provoquer une hyperglycémie et soumis à une embolie de l'artère rénale pour obtenir une hypertension. Chez ces porcs, la dysfonction diastolique a été mise en

évidence par une rigidité élevée des cardiomyocytes passifs et une augmentation de la rigidité télédiastolique du ventricule gauche et associée à une fibrose et une inflammation avec stress oxydatif. Le phénotype endothélial cardiaque est caractérisé par une diminution de la densité capillaire, et une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium à la bradykinine en raison du découplage de la NOS et de l'augmentation de l'activité de la NOX (Sorop et al., s. d.).

d) Porcs présentant une surcharge de pression et une maladie métabolique

Dans ce dernier modèle, la dysfonction diastolique a été induite par un régime western et une surcharge de pression provoquée par une constriction aortique et caractérisée par un déplacement de la courbe pression-volume. Elle était associée à une hypertrophie cardiaque, une inflammation et une altération de la vasodilatation à l'ACh, à l'insuline et au nitroprussiate de sodium (Olver et al. 2019).

Tableau 4 Caractéristiques microvasculaires des modèles grands animaux d'ICFEP

	Capillary Density	Endothelial activation	NO/SGC-GMPC-PRKG1	Vasomotricity	Oxidative stress	Permeability	Pericyte coverage	Fibrosis	Inflammation
Renal wrapping in dogs	↘	ND	↘	↘	ND	ND	ND	↗	ND
DOCA + WD in pigs	ND	ND	↘	↘	↗	ND	ND	↗	ND
HFD + renal artery embolization in pigs	↘	ND	↘	↘	ND	ND	ND	↗	↗
Stented pigs	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	↗	ND
Aortic bending + WD in pigs	ND	ND	ND	↘	ND	ND	ND	↗	↗
DOCA + AngII + WD in pigs	ND	ND	↘	ND	ND	ND	ND	↗	↗

3. Conclusion

Les modèles multihits semblent les modèles mimant le mieux l'ICFEP. Cependant, il existe plusieurs phénotypes de patients atteints d'ICFEP (Heinzel et Shah 2022) donc aucun modèle ne peut correspondre parfaitement à tous les patients. Dans notre étude, nous avons décidé d'utiliser le modèle murin HFD+L-NAME et le modèle murin *Lep^{db/db}*.

B. Signalisation Hedgehog, cible moléculaire de la dysfonction endothéliale

Dans ce travail, la voie de signalisation Hedgehog a été essentiellement utilisée comme outil nous permettant de moduler les propriétés des cellules endothéliales.

La voie de signalisation Hedgehog a été découverte chez la drosophile en 1980 par Wieschaus et Nüsslein-Volhard (Nüsslein-Volhard et Wieschaus 1980). Le nom Hedgehog provient de la forme en hérisson de la larve de drosophile qui est courte et couverte de spicules. Elle est essentielle dans le développement embryonnaire dans l'organisation des plans et des axes anatomiques et durant les étapes les plus tardives du développement.

Chez l'adulte, la signalisation Hedgehog est généralement silencieuse, mais participe au maintien et à la régénération des tissus en contrôlant le renouvellement et la différenciation des cellules souches notamment dans la zone sous-ventriculaire cérébrale et dans les follicules pileux (Petrova et Joyner 2014). En outre, une activation inappropriée de la signalisation Hedgehog a été liée à plusieurs cancers humains, notamment le carcinome basocellulaire, le médulloblastome, le cancer du poumon et l'adénocarcinome pancréatique (Scales et de Sauvage 2009).

Contrairement à la drosophile, chez laquelle il n'existe qu'une protéine Hedgehog, chez les mammifères, la voie Hedgehog possède trois ligands : Sonic (SHH), Desert (DHH) et Indian (IHH) Hedgehog. Les gènes codant ces protéines se localisent sur les chromosomes 5, 15 et 14 chez la souris et les chromosomes 7,12 et 2 chez l'Homme. Les gènes des ligands Hedgehog possèdent une homologie de séquence permettant une conservation des protéines entre différentes espèces.

1. Synthèse des protéines Hedgehog

Les protéines Hedgehog sont synthétisées sous forme de préproprotéines de 45 kDa. Ces préproprotéines subissent ensuite un clivage par une peptidase du peptide d'adressage situé à l'extrémité N-ter après sa reconnaissance par une SRP (signal recognition particle) et forment alors des proprotéines. Ce clivage a lieu après la translocation dans le réticulum endoplasmique. Un second clivage s'ensuit et se fait par autoprotéolyse de la partie C-ter pour former les protéines finales. L'autoprotéolyse libère deux polypeptides : un de 19 kDa N-Hh et un de 26 kDa dégradé après le clivage. Le polypeptide N-Hh est sécrété sous forme encapsulée et s'ancre à la cellule grâce à une liaison à la molécule de cholestérol en C-ter. Pour N-Shh, un accrochage d'un palmitate sur la cystéine en N-ter a aussi lieu. D'autres modifications covalentes peuvent ensuite se faire pour acquérir une structure secondaire et tertiaire et donc gagner en stabilité et en activité. DHH est suggéré comme ne subissant pas de clivage autocatalytique efficace.

2. Signalisation

Deux types de voies se distinguent : la voie canonique et les voies non canoniques.

L'activation de la voie canonique Hedgehog favorise la survie et la prolifération cellulaire tandis que la signalisation non canonique a été impliquée dans des changements du cytosquelette et la migration cellulaire.

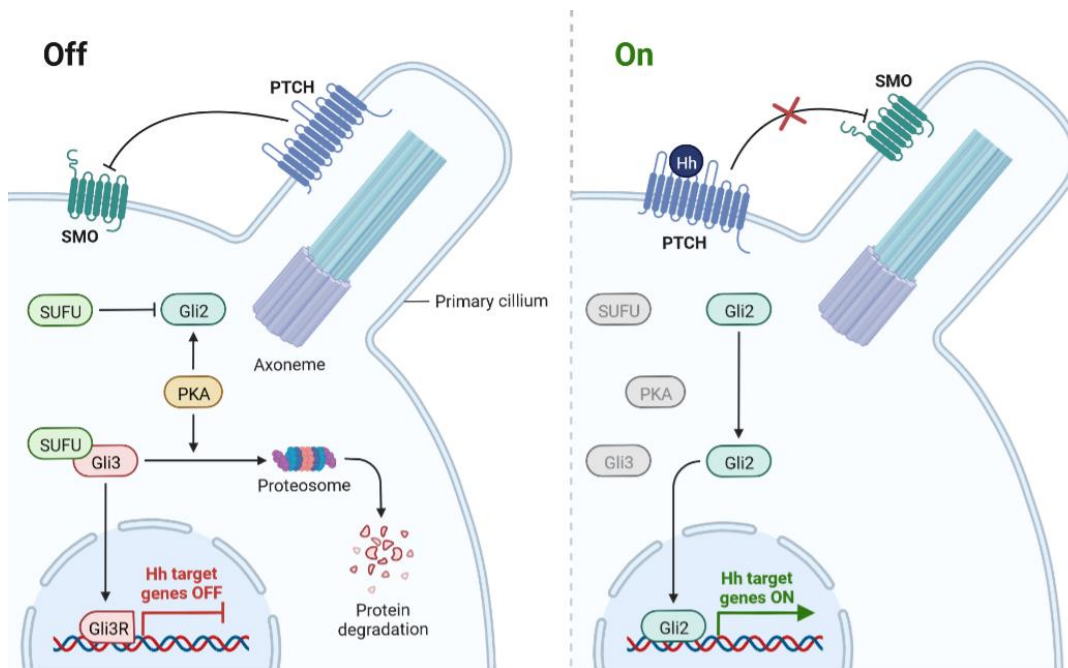


Figure 27 Voie de signalisation Hedgehog

a) Voie canonique Gli-dépendante

Les ligands Hedgehog se lient au récepteur Patched 1 (PTCH1), protéine à douze domaines transmembranaires. Cette liaison provoque la levée de l'inhibition de Smoothed (SMO) (Fig 27). SMO est une protéine à sept domaines transmembranaires analogue aux récepteurs couplés aux protéines G. SMO s'associe notamment aux protéines G α_i . La levée d'inhibition de SMO induit alors l'activation des facteurs de transcription Gli régulant l'expression de nombreux gènes. Les facteurs Gli sont des protéines en doigt de zinc régulées par SUFU (supressor of fused homolog) qui agit comme répresseur. En présence d'un ligand, SMO active une kinase qui phosphoryle SUFU pour l'inhiber. Les facteurs Gli transloquent alors dans le noyau pour entraîner la transcription des gènes cibles. En absence de ligand, SUFU forme un complexe avec Gli2/3 permettant à des kinases, la PKA notamment, de phosphoryler Gli 2/3. Cette phosphorylation induit la protéolyse partielle de Gli par le protéasome. La partie non protéolysée est transloquée dans le noyau pour réprimer la transcription des gènes cibles de Gli.

b) Voies non canoniques Gli-indépendantes

Les voies non canoniques sont divisées en 2 types de signalisation :

- Une signalisation qui fait intervenir l'activation de SMO tout en restant indépendante de Gli1
- Une voie qui n'implique que le récepteur PTCH1, indépendante de SMO et de Gli1. En absence de ligand, PTCH1 interagit avec la cycline B1, régulateur de la division cellulaire, et induit l'apoptose. La

fixation des ligands sur PTCH1 entraîne la libération de la cycline B1 lui permettant de migrer dans le noyau entraînant la stimulation de la prolifération cellulaire.

3. Rôle dans le système cardiovasculaire adulte

a) Dans les vaisseaux

Le rôle de la signalisation Hedgehog dans la biologie vasculaire a d'abord été mis en évidence dans les embryons par Pepicelli et al. en 1998 et Rowitch et al. en 1999 (Pepicelli, Lewis, et McMahon 1998 ; Rowitch et al. 1999). Le rôle proangiogénique du ligand SHH a été ensuite confirmé chez l'adulte, en particulier dans des conditions pathologiques comme les maladies ischémiques ou le cancer. De plus, il a été démontré que la protéine recombinante SHH favorise l'angiogenèse dans le test d'angiogenèse cornéenne chez la souris (Roberto Pola et al. 2001 ; M.-A. Renault et al. 2010 ; Fujita, Miyamoto, et Saika 2009). En outre, les ligands Hedgehog ont été suggérés comme favorisant la maturation des vaisseaux sanguins et la différenciation artérielle. Plus récemment, la signalisation Hedgehog a été également démontrée comme régulant l'intégrité vasculaire (Caradu, Couffinhal, et al. 2018).

(1) Perméabilité

Le rôle de la voie de signalisation Hedgehog dans le maintien de l'intégrité des jonctions entre les CE notamment celles de la barrière hématoencéphalique (BHE) a été mis en avant pour la première fois en 2011 par Alvarez et al (Jorge Ivan Alvarez et al. 2011). L'activation de la voie dans les CE diminue, en effet, la perméabilité de la BHE en favorisant l'interaction de la cadhérine 5 avec la β -caténine et en augmentant l'expression des protéines de jonctions serrées comme l'occludine (Jorge Ivan Alvarez et al. 2011; Y. Wang et al. 2014).

L'intégrité de l'endothélium chez l'adulte dépend de DHH qui est produit par les CE (Hollier et al. 2021). DHH régule l'intégrité des jonctions entre les CE à la fois dans le cerveau, mais aussi au niveau du nerf sciatique (Chapouly et al. 2016), le cœur et les poumons. La délétion endothéliale de DHH chez des souris entraîne, en effet, une perméabilité vasculaire anormale dans le cerveau, les poumons et le cœur avec perturbation de l'interaction de la cadhérine 5 avec la β -caténine (Hollier et al. 2021; Caradu, Couffinhal, et al. 2018).

L'intégrité de la BHE dépend aussi de SHH : son expression est modulée dans plusieurs conditions pathologiques. SHH est, en effet, surexprimé dans des conditions de stress comme dans la sclérose en plaques, l'accident vasculaire cérébral et l'hémorragie sous-arachnoïdienne (J. I. Alvarez et al. 2011) (Y. Xia et al. 2013) (Chechneva et al. 2014). Cependant, SHH a des effets opposés à ceux de la protéine endogène DHH dans les CE. SHH favorise notamment l'angiogenèse alors que DHH l'inhibe et perturbe l'intégrité de la BHE (diminution de l'expression de la cadhérine 5, perméabilité à l'albumine et au fibrinogène accrue). SHH semble alors agir en empêchant DHH de se lier à PTCH1 (Hollier 2021).

Le rôle de la voie de signalisation Hedgehog dans la perméabilité vasculaire a aussi été démontré avec l'administration d'agonistes Hedgehog (Smoothened agonist [SAG], purmorphamine, N-Shh recombinant) qui augmentent l'expression des protéines de jonctions serrées et diminue la perméabilité de la BHE (Y. Xia et al. 2013) (Chechneva et al. 2014) (Singh et al. 2016 ; 2017).

(2) Activation des CE

DHH prévient également l'activation des CE en inhibant l'expression, par la CE, des molécules d'adhésion comme ICAM1 (Hollier et al. 2021) et l'expression des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6. Des souris délétées pour *Dhh* dans les CE traitées par lipopolysaccharide présentent, en effet, une infiltration de neutrophiles augmentée par rapport aux souris contrôles. En outre, l'augmentation de VCAM1 induite par le TNF α peut être prévenue par administration de DHH ou de SAG (Caradu, Couffinhal, et al. 2018; Y. Yang et al. 2011).

(3) Vasomotricité

Il semblerait aussi que les protéines Hedgehog ont un rôle sur la vasomotricité en stimulant l'expression de la NOS3 (Benameur et al. 2010; AgouTii et al. 2007). De plus, des microparticules contenant SHH permettent d'empêcher l'altération de la vasorelaxation induite par l'Ang II (Marrachelli et al. 2013).

b) Dans le cœur

La voie de signalisation Hedgehog joue un rôle important dans le cœur et cela dès le développement embryonnaire.

(1) Développement embryonnaire

Dans le cœur, SHH est nécessaire pour l'expression de *Vegfa*, *Vegfb*, *Vegfc* et *angpt2* induite par le FGF9 (fibroblast growth factor) dans les cardiomyocytes et les cellules périvasculaires (Lavine et al. 2006). La cascade de signalisation FGF-HH-VEGF/ANG contrôle la croissance des vaisseaux sous épicaudiques et intramyocardiques (Lavine et al. 2006). La signalisation Hedgehog dans les cardiomyocytes régule le développement des veines coronaires à partir des vaisseaux sous-épicaudiques, tandis que la signalisation des cellules périvasculaires régule la croissance artérielle coronaire à partir des vaisseaux intramyocardiques (Lavine et al. 2008).

La voie Hedgehog est aussi nécessaire au développement du second champ cardiaque nécessaire à la voie d'éjection et au ventricule droit (Varjosalo et Taipale 2008). Une perte du récepteur SMO induit, en effet, de sévères défauts de formation du tube cardiaque (X. M. Zhang, Ramalho-Santos, et McMahon 2001). Chez l'embryon, une perte de SHH entraîne notamment des défauts du déploiement du second champ cardiaque, avec altération du ventricule droit et de la voie d'éjection, et induit un défaut de septation résultant en un seul et unique ventricule (Washington Smoak et al. 2005).

(2) Régénération cardiaque

La régénération cardiaque est elle aussi médiée par Hedgehog notamment chez les poissons-zèbres. La régénération épicaudique est, en effet, stoppée lors de l'administration d'un antagoniste de

Hedgehog. En outre, une transplantation de billes imprégnées de SHH permet de stimuler la régénération cardiaque (J. Wang et al. 2015).

SHH régule aussi la réparation cardiaque chez les mammifères après lésion (résection apicale ou infarctus du myocarde). SHH est fortement exprimé dans la zone de lésion, principalement dans les fibroblastes (60 %), mais pas dans les cardiomyocytes. Il permet ainsi le recrutement des cellules inflammatoires au niveau de la lésion. SHH augmente la prolifération des cardiomyocytes et monocytes/macrophages et réduit la fibrose (Kawagishi et al. 2018).

(3) Fonction cardiaque

La voie de signalisation Hedgehog est également importante dans le maintien de la fonction cardiaque. Une délétion de *Smo* dans les cardiomyocytes entraîne, en effet, une raréfaction vasculaire avec hypoxie tissulaire ainsi qu'une mort des cardiomyocytes induisant une insuffisance cardiaque. Une perte de CML est également associée à la raréfaction capillaire. La perte de Hedgehog mène aussi à une diminution des facteurs proangiogéniques tels que VEGFa. La voie de signalisation Hedgehog est ainsi importante pour le maintien des petits vaisseaux artériels.

Dans le modèle d'infarctus du myocarde chez la souris, la taille de la zone infarctée est augmentée quand la voie Hedgehog est bloquée avec un anticorps anti-Shh. Hedgehog joue donc un rôle important dans la réponse à l'ischémie et semble préserver la fonction cardiaque et minimiser les lésions (Lavine, Kovacs, et Ornitz 2008).

En outre, une injection de SHH augmente l'expression de Gli1 dans les cardiomyocytes, tout comme la purmorphamine, agoniste de SMO et activateur de la voie Hedgehog. Cet effet est inhibé par la cyclopamine. Ces résultats prouvent que les cardiomyocytes répondent à Hedgehog. De plus, si on bloque les protéines G α i et qu'on stimule par SHH, Gli1 n'est pas aussi augmenté que chez les souris contrôles donc les protéines G α i sont nécessaires au bon fonctionnement de la voie Hedgehog. Après ischémie-reperfusion, une augmentation de Gli1 est observée chez les souris contrôles, mais pas chez les souris dont les protéines Gi sont délétées génétiquement. La signalisation Hedgehog dans les cardiomyocytes est donc dépendante de l'activation des G α i par Smo (Carbe et al. 2014).

4. Régulation

a) Régulation physiologique par les co-récepteurs

En plus des récepteurs PTCH1 et SMO, plusieurs autres récepteurs, agonistes et antagonistes physiologiques de la voie Hedgehog, ont été identifiés chez les mammifères.

La liaison des ligands Hedgehog à PTCH1 est notamment régulée par plusieurs co-récepteurs. Parmi ceux-ci, Cell adhesion molecule-related/downregulated by oncogenes (CDON), Brother of Cdon (BOC) et Growth arrest specific 1 (GAS1) sont proposés comme favorisant l'interaction du ligand Hedgehog avec PTCH1 tandis que Hedgehog interacting protein (HHIP) l'inhiberait (Ramsbottom et Pownall 2016).

(1) Boc et Cdon

CDON et BOC sont des glycoprotéines de surface appartenant aux molécules d'adhésion cellulaires de la famille des immunoglobulines. Elles possèdent un ectodomaine contenant des domaines de type Ig suivis de 3 répétitions de fibronectine de type 3 (FNIII), d'un domaine transmembranaire et d'une région intracellulaire de longueur variable. La partie fibronectine est essentielle à la liaison des ligands Hedgehog.

Chez l'embryon, CDON et BOC fonctionnent comme des régulateurs positifs de l'activité de la voie Hedgehog en s'associant aux ligands et en régulant leur gradient de concentration à la membrane.

À l'inverse, dans les CE, CDON agit comme un régulateur négatif de la voie Hedgehog en empêchant DHH de se lier à PTCH1 et donc d'activer la voie de signalisation. L'expression de Cdon est notamment augmentée dans les CE par les cytokines pro-inflammatoires TNF α et IL1 β et entraîne une déstabilisation des jonctions adhérentes et l'expression de molécules d'adhésion. En conséquence, quand CDON est inhibé, l'extravasation du fibrinogène et des IgG induite par l'IL-1 est diminuée et l'expression de la VE-Cadhérine est augmentée (Chapouly et al. 2020).

(2) Growth arrest specific 1

Le gène *Gas1* code une protéine appartenant à la famille des glycoprotéines liées à la membrane par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI).

Chez l'embryon, il a récemment été établi que BOC, CDON et GAS1 jouent un rôle coopératif dans la maintenance et la spécification des progéniteurs neuronaux (Allen et al. 2011 ; Allen, Tenzen, et McMahon 2007) et que l'absence concomitante de ces trois molécules entraîne une perturbation de la prolifération cellulaire en réponse à SHH (Izzi et al. 2011).

Dans les CE, GAS1 semble un régulateur positif de la voie. Une surexpression d'ICAM1 et de VCAM1 est, en effet, observée quand GAS1 est inhibé spécifiquement dans les CE. De plus, GAS1 favorise la liaison de DHH au récepteur SMO et potentialise ses effets (Chapouly et al. 2020).

(3) Hedgehog interacting protein

La protéine HHIP a été caractérisée chez l'embryon de souris comme une glycoprotéine membranaire, capable de se lier à SHH avec une affinité comparable à celle décrite entre Shh et son principal récepteur PTCH1. Elle constitue donc un second récepteur de SHH (Chuang et McMahon 1999). Les études de surexpression et de perte de fonction chez la souris ont révélé que HHIP est un antagoniste direct des protéines Hedgehog en se liant à elles. Elle empêche leur interaction avec PTCH1 et par conséquent la transmission du signal à l'intérieur de la cellule cible (Chuang, Kawcak, et McMahon 2003). HHIP est aussi impliqué dans le développement et joue un rôle important dans la morphogénèse. Bloquer PTCH1 ou HHIP dans des embryons entraîne, en effet, de sévères défauts morphogénétiques et le rétrocontrôle de l'action des morphogènes Hedgehog est exercé conjointement par PTCH1 et HHIP dans plusieurs tissus (Jeong et McMahon 2005).

Dans les CE, où HHIP est très exprimé, il agit en inhibant l'induction de PTCH1 par SHH. De plus, HHIP est sous-exprimé dans les cellules en pleine angiogénèse. Ces données suggèrent que la baisse d'HHIP

dans la néo-vascularisation tumorale peut contribuer à la suractivation de la voie Hedgehog dans la tumeur et favorise l'angiogenèse par manque d'inhibition par Hhip (Olsen et al. 2004).

(4) Hhip1

Un autre régulateur de la voie Hedgehog connu est Hedgehog interacting protein like-1 (HHIPL1). Cette protéine est un analogue de HHIP et est supposée avoir les mêmes effets.

HHIPL1 serait impliqué dans les maladies coronariennes. Des études ont identifié le locus 14q32 du chromosome 14 comme locus associé à la maladie coronarienne. Les variants associés à la maladie se situent dans le gène *Hhip1*.

Contrairement à ce qui est attendu, les analyses *in vitro* ont révélé que HHIPL1 interagit avec SHH et promeut l'activité de la signalisation Hedgehog. La délétion d'*Hhip1* provoque une réduction de plus de 50 % de l'athérosclérose. Ainsi, HHIPL1 semble une protéine proathérogène qui potentialise la signalisation Hedgehog et régule la prolifération et la migration des CML. L'inhibition de la fonction de la protéine HHIPL1 pourrait offrir une nouvelle stratégie thérapeutique pour la maladie coronarienne (Aravani et al. 2019).

Cependant, dans des résultats non publiés, nous avons montré *in vitro* qu'HHIPL1 empêchait l'interaction de DHH avec PTCH1 conduisant à une inactivation de la voie dans les CE. Cette inactivation conduit à une augmentation de la perméabilité et de l'activation endothéliale avec surexpression de molécules d'adhésion.

b) Dérégulations pathologiques

La voie de signalisation Hedgehog peut aussi être modulée dans des conditions pathologiques.

(1) Dans les maladies ischémiques

La voie Hedgehog est dérégulée positivement dans des conditions ischémiques, notamment dans l'infarctus du myocarde où SHH, PTCH1 et GLI1 sont surexprimés. Cette activation entraîne une raréfaction capillaire et est associée à une zone infarctée plus large (Xiao et al. 2012).

La voie Hedgehog est également activée dans l'ischémie du membre inférieur. *Shh*, *Gli1*, *Gli2* et *Gli3* sont, en effet, surexprimés dans le muscle ischémique par rapport au muscle contrôle (R. Pola et al. 2003) (M. A. Renault, Chapouly, et al. 2013) (Palladino et al. 2011) (M. A. Renault et al. 2009).

La réactivation de Hedgehog favoriserait la revascularisation des tissus ischémiques. L'administration d'anticorps bloquant Hedgehog entraîne, en effet, une diminution de la densité capillaire et de la reperfusion (R. Pola et al. 2003). De plus, la suractivation de Hedgehog par administration de SHH ou de SAG provoque une augmentation de la densité capillaire dans le muscle ischémique (Caradu, Guy, et al. 2018), (Benameur et al. 2010), (Qin et al. 2016).

(2) Dans le diabète

La signalisation Hedgehog joue un rôle dans l'organogenèse précoce du pancréas. Chez l'adulte, la signalisation Hedgehog intervient dans la régulation de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques notamment via l'activation du facteur de transcription de l'insuline Pdx1 (Pancreatic and duodenal homeobox) (Hebrok et al. 2000; M. K.Thomas et al. 2000 ; 2001 ; Kawahira et al. 2003 ; Nakayama et al. 2008).

Dans le diabète de type 2, la voie de signalisation Hedgehog est dérégulée entraînant une réduction de l'expression de Pdx1 provoquant une hyperglycémie (Ahlgren et al. 1998; Dutta et al. 1998 ; Lau, Kawahira, et Hebrok 2006).

Le diabète de type 1 peut entraîner une dysfonction diastolique (diminution E/A et allongement de la relaxation) de manière concomitante avec une diminution de SHH, PTCH1 et GLI (Xiao et al. 2012). La diminution de SHH et PTCH1 dans le diabète pourrait être responsable de la dysfonction cardiaque, car elle entraîne une dysfonction endothéliale avec raréfaction capillaire via une inactivation de la voie. Le lien entre la voie Hedgehog et la dysfonction cardiaque est confirmé avec un traitement par SAG, agoniste de la voie, qui prévient la dysfonction cardiaque chez les souris diabétiques (Xiao et al. 2012). Dans la neuropathie diabétique, la dérégulation de la voie Hedgehog peut être empêchée par l'administration systémique de la protéine SHH. Cette thérapie rétablit la densité vasculaire et augmente le nombre de péricytes autour des vaisseaux épineuraux et périneuraux (Kusano 2005).

(3) Dans le vieillissement

L'activation de Hedgehog après ischémie du membre inférieur est supposée altérée dans un contexte de vieillissement. Gli1 est, en effet, diminué dans le muscle ischémique de souris âgées (Palladino et al. 2011) (M. A. Renault, Robbesyn, et al. 2013). DHH et SMO sont également moins exprimés. L'altération de l'activation de Hedgehog chez les souris âgées semble compromettre l'angiogenèse induite par l'ischémie qui devrait avoir lieu grâce aux propriétés pro-angiogéniques des ligands Hedgehog. Ces résultats sont cohérents avec le fait qu'une administration de ligands Hedgehog chez des souris âgées induit une augmentation de la densité capillaire ainsi qu'une meilleure perfusion au niveau du muscle ischémique (R. Pola et al. 2001, Palladino et al. 2011, M. A. Renault, Robbesyn, et al. 2013).

(4) Dans les cancers

Dans certains cancers comme le carcinome basocellulaire ou le méningiome, la voie de signalisation Hedgehog est dérégulée (Taipale and Beachy 2001, Hahn 1996). Elle est, en effet, suractivée et contribue au développement de tumeurs malignes (Murone 1999) en stimulant la prolifération cellulaire (Taipale and Beachy 2001). Cette activation anormale de la voie peut être induite par des mutations des gènes codant les protéines de la voie soit par la surexpression d'un des ligands Hedgehog ou des facteurs de transcription Gli (Stecca 2007, Ji 2007, Johnson 2011).

Parmi les mutations possibles, des mutations inactivant le récepteur PTCH1 ont été identifiées dans le carcinome basocellulaire (Hahn 1996). Elles entraînent une activation constitutive du récepteur SMO en l'absence de PTCH1.

Dans les cancers avec surexpression des ligands Hedgehog, tels que le cancer bronchique à petites cellules ou le gliome, les ligands agissent de façon autocrine ou paracrine pour stimuler la prolifération des cellules tumorales (Watkins 2003, Dierks 2007).

Cette suractivation de la voie correspond à une importante angiogenèse au niveau de la tumeur avec une densité microvasculaire augmentée ainsi qu'une surexpression de VEGF et VEGFR (Lou et al. 2012 ; Di Mauro et al. 2017).

(5) Dans l'inflammation

DHH est sous-exprimé par les cytokines inflammatoires (Caradu, Couffinal, et al. 2018) et dans l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (Mora et al. 2020) alors que SHH est surexprimé dans les astrocytes activés dans un contexte de neuro-inflammation comme la sclérose en plaques (Jorge Ivan Alvarez et al. 2011).

(6) Dans d'autres pathologies

La voie Hedgehog est également dérégulée dans la rétinopathie du prématuré et dans la néovascularisation choroïdienne où *Shh* et *Ptch1* sont surexprimés dans les yeux (Surace et al. 2006) (H. He et al. 2010) et provoquent une angiogenèse pathologique. Une inhibition de Hedgehog par cyclopamine réduit l'angiogenèse ainsi que les niveaux de VEGF.

c) Stratégies thérapeutiques

Suite à la mise en évidence du rôle de la voie Hedgehog dans diverses pathologies, en particulier le cancer, la recherche d'agonistes et d'antagonistes de cette voie s'est développée (Fig 28).

(1) Antagonistes de Smo

La cyclopamine et la jervine sont des molécules naturelles issues de *Veratrum californicum*. Les deux composants sont tératogènes, induisant une holoprosencéphalie ou une cyclopie chez les petits des animaux qui ingèrent le *Veratrum californicum*. La cyclopamine est un alcaloïde ciblant le récepteur SMO. Sa fixation sur SMO induit un changement de conformation de la protéine qui devient inactive (J. K. Chen et al. 2002). L'inactivation de Smo conduit à l'inhibition de la voie de signalisation Hedgehog et empêche ainsi la transcription des gènes *Gli1*, *Gli2* et *Ptch1*.

Le GDC-0449 (HhAntag691 ou Vismodegib, Genetech/Roche/Curis), inhibiteur de SMO également, se lie directement au domaine extracellulaire de SMO et est un inhibiteur très sélectif de la voie de signalisation Hedgehog notamment pour la transcription dépendante de Gli (Rudin et al. 2009). Cet inhibiteur est notamment indiqué dans le traitement du cancer basocellulaire. Les antagonistes de

SMO 1, 2, 3 et 4 (SANT1, 2, 3 et 4), quant à eux, inhibent l'activation de SMO et la transduction de la voie Hedgehog (J. K. Chen et al. 2002).

Il existe aussi des inhibiteurs qui ne ciblent pas SMO comme la robotnikinine. Elle cible SHH et l'empêche de se fixer à PTCH1. Elle inhibe de manière dose-dépendante la transcription de Gli induite par Shh dans différents types cellulaires, tels que les kératinocytes (Stanton et al. 2009). D'autres inhibiteurs bloquent la transcription de GLI comme les GANT 58 et 61 (Lauth 2007).

(2) Agonistes de Smo

Contrairement aux antagonistes, les agonistes de la voie Hedgehog ne sont pas utilisés en clinique pour l'instant.

Il existe des activateurs naturels de la voie tels que le cholestérol et certains oxystérols qui activent SMO en se liant à son domaine extracellulaire (Huang 2016, Nedelcu 2013).

Deux agonistes de synthèse, le SAG et la purmorphamine, se fixent directement sur le récepteur SMO, entraînant son activation via un changement de conformation protéique. Leur effet agoniste a principalement été caractérisé dans des cellules en culture telles que les fibroblastes et les cellules mésenchymateuses (Stanton et Peng 2010). En outre, le laboratoire a précédemment montré l'efficacité du SAG pour prévenir la dysfonction endothéliale en diminuant l'expression des molécules d'adhésion et l'infiltration de macrophages, en diminuant la perméabilité à l'albumine et en améliorant la perfusion microvasculaire après ischémie chez des souris diabétiques (Caradu, Couffinal, et al. 2018). L'utilisation de cette molécule pour prévenir la dysfonction endothéliale a été brevetée (Methods and pharmaceutical compositions for the treatment of endothelial dysfunction. (2017) (ref# RENA17116MC)).

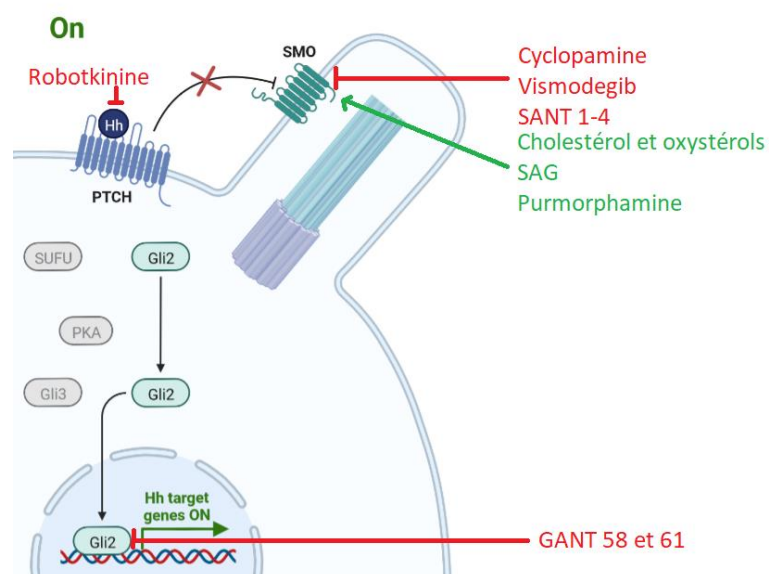


Figure 28 Antagonistes et agonistes de la voie Hedgehog

Les régulations de la voie de signalisation Hedgehog permettent ainsi plusieurs approches pour moduler l'activité de l'endothélium et étudier son impact sur la fonction cardiaque dans le contexte d'ICFep. CDON étant un régulateur de la voie provoquant une dysfonction endothéliale, des molécules ciblant et bloquant CDON peuvent être utilisées pour préserver l'intégrité de l'endothélium. Le laboratoire a, en effet, démontré que bloquer CDON permet de prévenir la déstabilisation des jonctions adhérentes, la perméabilité vasculaire et l'expression de molécules d'adhésion chez des souris après un stress inflammatoire aigu (Chapouly et al. 2020). L'utilisation d'une molécule bloquant CDON pour traiter la dysfonction endothéliale a été brevetée (Use of Cdon inhibitors for the treatment of endothelial dysfunction. (2020) (ref# RENAULT18554MC)).

5. Conclusion

Les travaux précédents du laboratoire (Caradu, Couffinhal, et al. 2018; Chapouly et al. 2020) démontrent le potentiel thérapeutique de cibler la voie Hedgehog pour améliorer la fonction endothéliale. Pour étudier le rôle de la dysfonction endothéliale dans la physiopathologie de l'ICFep, nous avons décidé de prévenir cette dysfonction en utilisant la délétion de *Cdon* dans un premier modèle de dysfonction diastolique, les souris HFD+L-NAME, et en utilisant le SAG dans un second modèle, les souris *Lepr^{db/db}*.

OBJECTIFS

L'ICFEP est une des principales causes d'hospitalisation. De plus, sa prévalence est en constante augmentation avec le vieillissement de la population et l'accroissement de ces principales comorbidités, notamment l'obésité et le diabète de type 2. Cependant, sa physiopathologie reste mal comprise et aucun traitement spécifique n'existe encore pour prendre en charge les patients atteints de cette maladie.

Cette thèse entre dans le cadre de l'étude de la physiopathologie de l'ICFEP dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Le paradigme proposé par Paulus en 2013 suggère que c'est la dysfonction des microvaisseaux cardiaques qui entraîne la dysfonction diastolique. Cette théorie repose sur le fait que la dysfonction microvasculaire est fortement retrouvée chez les patients atteints d'ICFEP. Cependant, le rôle causal de la dysfonction endothéliale dans la physiopathologie de l'ICFEP n'a toujours pas été démontré.

L'objectif de cette thèse est donc de mieux comprendre le rôle des cellules vasculaires (péricytes et cellules endothéliales) dans la physiopathologie de l'ICFEP.

Le rôle des péricytes sur le phénotype des cellules endothéliales cardiaques et la fonction cardiaque a été évalué par une stratégie de perte de fonction. Dans un premier temps, un modèle de souris déplétées de leurs péricytes a été mis en place. Plus précisément, l'ablation des péricytes a été induite chez des souris adultes en induisant l'expression de la toxine diphtérique dans les péricytes sous le contrôle du promoteur *Pdgrfb*. Ensuite, l'impact de l'ablation des péricytes sur le phénotype des vaisseaux cardiaques, des cardiomyocytes et sur la fonction cardiaque a été évalué.

Dans le but d'étudier le rôle des cellules endothéliales et plus précisément l'impact de la dysfonction endothéliale sur le développement de la dysfonction diastolique associée à l'ICFEP, nous avons choisi d'utiliser à l'inverse une stratégie de gain de fonction. Notre question est de savoir si la dysfonction endothéliale participe au développement de la dysfonction diastolique induite par un régime HFD combiné à un traitement par L-NAME chez la souris. Dans un premier temps, nous avons mis en place le modèle d'ICFEP au laboratoire et nous avons vérifié si, dans ce modèle, la dysfonction diastolique était bien associée à une dysfonction endothéliale. De plus, en considérant l'importance du dimorphisme sexuel associé aux maladies cardiovasculaires, nous avons réalisé cette étude chez des mâles, des femelles et des femelles ovariectomisées pour mimer la ménopause.

Pour mettre en évidence le rôle de la dysfonction endothéliale dans ce modèle, nous avons utilisé un modèle de souris récemment développé au laboratoire chez lequel la fonction endothéliale est « préservée » dans des conditions de stress. Il s'agit des souris déficientes pour CDON, un récepteur leurre de DHH, spécifiquement dans les cellules endothéliales.

En parallèle, pour conforter nos résultats, nous avons étudié le rôle de la dysfonction endothéliale dans un second modèle d'ICFEP, les souris diabétiques et obèses déficientes pour le récepteur à la leptine

Lepr^{db/db}, modèle précédemment caractérisé au laboratoire. Chez ces souris la dysfonction endothéliale a été corrigée en utilisant un agoniste de SMO, le SAG.

Enfin, nous avons évalué le rôle de l'inflammation, proposée comme étant causale de la dysfonction endothéliale dans le paradigme de Paulus, mais qui peut aussi être induite en aval de la dysfonction endothéliale dans la physiopathologie de la dysfonction diastolique dans le modèle HFD+L-NAME. Nous avons choisi de limiter l'inflammation dans ce modèle à l'aide de la colchicine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Modèles murins

A. Souris HFD+L-NAME

Nous avons choisi d'utiliser le modèle développé par Schiattarella, car c'est un modèle multihit de dysfonction diastolique proche de la pathologie humaine. Ce modèle récapitule plusieurs facteurs de risque retrouvés chez les patients atteints d'ICFep : la dyslipidémie, l'obésité, l'hypertension ainsi que le sexe féminin. De plus, la pathologie étant retrouvée davantage chez les femmes ménopausées, nous avons choisi d'ovariectomiser nos souris pour être au plus proche de la pathologie humaine. Pour étudier l'impact du dimorphisme sexuel, nous avons également traité des mâles et des femelles non ovariectomisées par HFD+L-NAME. Des souris femelles C57Bl/6J ont été ovariectomisées à 8 semaines puis ont été nourries par un régime riche en graisses (60 %) (HFD, 260 HF, U8978A01R 00019, Safe) pendant 12 semaines dès l'âge de 8 semaines. Le HFD était associé à du L-NAME (N5751-10G, Sigma Aldrich, Merck) dans l'eau de boisson à 1 g/L pendant 10 semaines, de l'âge de 10 à 20 semaines. Le L-NAME a été administré 4 jours par semaine, du lundi au jeudi. Le weekend, les souris avaient de l'eau sans traitement (Fig 29).

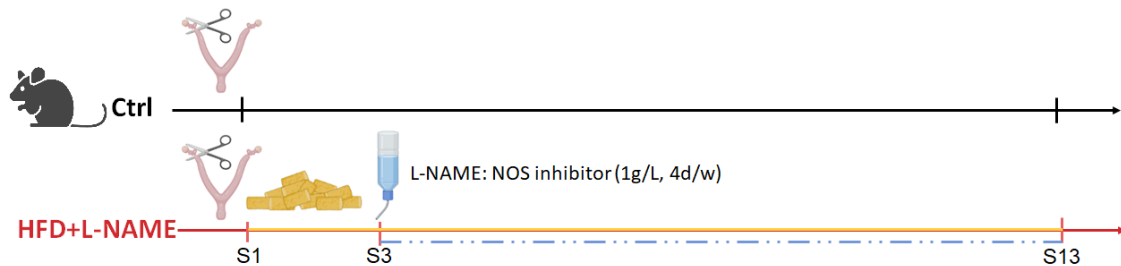


Figure 29 Schéma d'administration du régime HFD et du L-NAME

B. Souris diabétiques et obèses *Lepr^{db/db}*

Pour confirmer les résultats obtenus à l'aide des souris *Cdon^{ECKO}*, nous avons utilisé un autre modèle murin d'ICFep : les souris femelles déficientes pour le récepteur à la leptine *Lepr^{db/db}*. Ces souris récapitulent 3 FRCV de l'ICFep : le diabète, l'obésité et le sexe féminin.

Les souris diabétiques *Lepr^{db/db}* dérivent à l'origine d'une mutation spontanée autosomique récessive dans le gène *Lepr*, localisé sur le chromosome 4, découverte par Coleman et Hummel en 1967 (Hummel, Coleman et al. 1972). Cette mutation appelée « db » consiste dans le remplacement d'une guanidine par une thymidine et crée un site d'épissage anormal qui conduit à l'insertion de 106 nucléotides dans le transcrit. Cette insertion provoque la perte de fonction du récepteur à la leptine. Les souris *Lepr^{db/db}*, sous le fond génétique C57BL/KsJ, ont été obtenues au Jackson Laboratories (USA). Les animaux homozygotes sont spontanément hyperphagiques et hypersécrètent

de l'insuline, ils deviennent obèses, hyperglycémiques, hyperinsulinémiques et insulino-résistants dans les premiers mois de leur vie puis, plus tard, développent une hypo-insulinémie associée à une hyperglycémie avec un pic entre 3 et 4 mois.

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

c. Souris *Cdh5-cre/ERT2; Cdon^{F/F}*

Pour mettre en évidence le rôle de la dysfonction endothéliale dans l'installation de la dysfonction diastolique dans le modèle HFD+L-NAME, nous avons utilisé un modèle d'endothélium dit préservé développé au laboratoire : les souris *Cdon^{ECKO}*. Nous avons, en effet, déjà démontré que bloquer CDON, un co-récepteur négatif de la voie Hedgehog, permet de maintenir l'intégrité endothéliale en cas d'inflammation (Fig 30) (Chapouly et al. 2020).

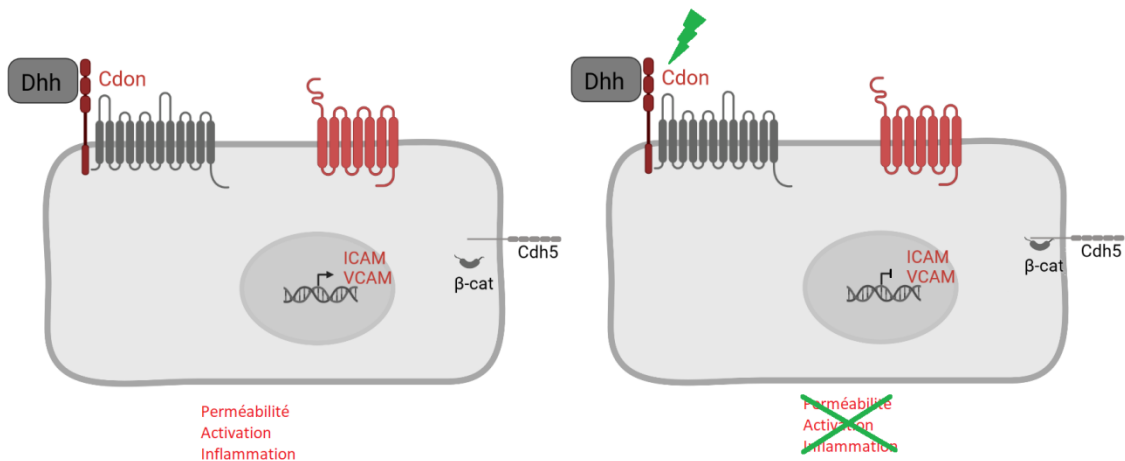


Figure 30 Bloquer *Cdon* protège l'endothélium

Les souris *Cdon^{flox}* ont été obtenues à l'Institut Clinique de la Souris via le consortium international de phénotypage de souris à partir d'un vecteur généré par le European conditional mice mutagenesis program, EUCOMM (Fig 31). Les souris *Cdh5-cre/ERT2* ont été obtenues grâce à RH. Adams.

La Cre recombinase des souris *Cdh5-cre/ERT2* a été activée par injection intrapéritonéale de 1 mg de tamoxifène pendant 5 jours consécutifs à 8 semaines. Les souris ont été phénotypées 12 semaines plus tard, à 20 semaines. Seules les femelles ont été utilisées pour les expériences.

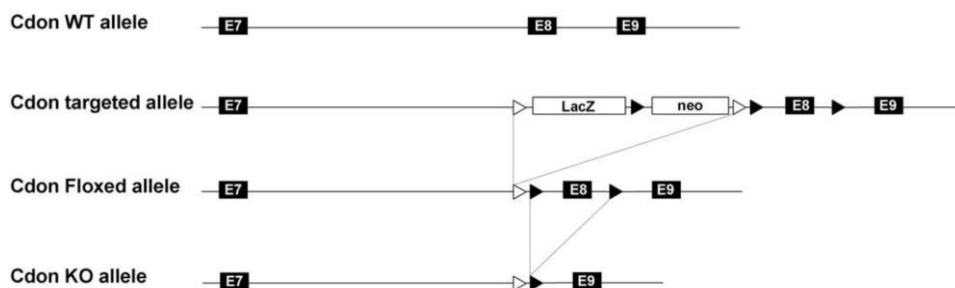


Figure 31 Schéma de l'allèle floxé de *Cdon* (Chapouly et al. 2020)

D. Souris *Pdgfrb-cre/ERT2*; *RosaDTA*

Pour déterminer l'impact d'une perte de péricytes sur la fonction cardiaque, nous avons créé un modèle inductible au tamoxifène de déplétion de péricytes grâce au croisement de souris *RosaDTA* exprimant la toxine diphtérique et de souris *Pdgfrb-cre/ERT2* permettant une recombinaison dans les péricytes grâce au promoteur *Pdgfrb* (récepteur présent à la surface des péricytes). Quand la cre est activée par le tamoxifène, la toxine diphtérique entraîne la mort des cellules PDGFRB+ (Fig 32).

Les souris B6.Cg-Tg (*Pdgfrb-cre/ERT2*) 6096Rha/J (souche n° 029684), Gt (*ROSA*) 26Sortm4 (ACTB-tdTomato, -EGFP) Luo/J (souche n° 007576) et B6.129P2-Gt (*ROSA*) 26Sortm1 (DTA) Lky/J (souche n° 009669) ont été obtenus auprès du laboratoire Jackson.

La Cre recombinase des souris *Pdgfrb-cre/ERT2* a été activée par injection intrapéritonéale de 1 mg de tamoxifène pendant 5 jours consécutifs à 8 et 10 semaines. Les souris ont été phénotypées 2 semaines plus tard, c'est-à-dire à 12 semaines. Les mâles et les femelles ont été utilisés pour les expériences.

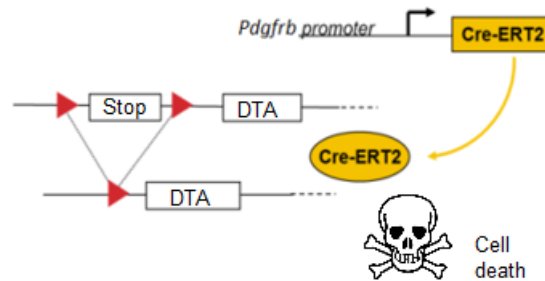


Figure 32 Construction génétique des souris *Pdgfrb-cre/ERT2* ; *RosaDTA*

E. Hébergement

Les souris sont hébergées en animalerie conventionnelle avec une photopériode de 12 h, en cages communes sur portoirs ventilés, ont accès à de l'enrichissement dans chaque cage, et à l'eau et à la nourriture *ad libitum*, en accord avec les protocoles internationaux d'hébergement des animaux de laboratoire. Les souris ont été traitées conformément aux directives 2010/63/EU du Parlement européen sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et approuvées par le Comité d'éthique en expérimentation animale local.

II. Traitements

A. Colchicine

Pour évaluer l'impact de l'inflammation sur la dysfonction diastolique associée à l'ICFep, nous avons traité les souris HFD+L-NAME par de la colchicine.

Les souris C57Bl/6J traitées par HFD et L-NAME ont reçu soit l'anti-inflammatoire à 1 mg/L soit 200 µg/kg/j dans l'eau de boisson soit de l'eau seule pendant 10 semaines dès l'âge de 10 semaines.

B. Smoothened Agonist (SAG)

Pour étudier l'impact de la dysfonction endothéliale sur la dysfonction diastolique associée à l'ICFep, nous avons traité les souris *Lepr^{db/db}* par du SAG.

Les souris *Lepr^{db/db}* ont reçu soit l'agoniste du récepteur smoothened de la voie Hedgehog à 25 mg/L soit 5 mg/kg/j soit du NaCl en une injection péritonéale par jour pendant 28 jours à partir de 2 mois pour un traitement préventif ou à partir de 5 mois pour un traitement curatif.

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

RÉSULTATS

I. Rôle des péricytes cardiaques

Dans le but de tester si une atteinte des péricytes pourrait participer au développement de la dysfonction endothéliale et de la dysfonction diastolique associée à l'ICFep, nous avons mis en place un modèle de souris déplétées de leurs péricytes (les souris *Pdgfrb-cre/ERT2* ; Rosa-DTA) et évalué l'impact de cette déplétion sur le phénotype des microvaisseaux cardiaques et des cardiomyocytes et sur la fonction cardiaque.

A. Mise en place du modèle

Afin d'induire une diminution du nombre de péricytes chez nos souris, nous leur avons administré du tamoxifène à 8 semaines pour activer la recombinaise permettant l'action de la toxine diphtérique. Après une semaine d'injections quotidiennes, nous avons sacrifié les souris pour vérifier la déplétion. Les souris présentaient alors une diminution importante de péricytes d'environ 75 %. Pour étudier l'impact de cette déplétion sur la fonction cardiaque, nous avons ensuite sacrifié des souris un mois après l'injection de tamoxifène c'est-à-dire à 12 semaines. De façon inattendue, les souris ne présentaient plus de diminution de péricytes suggérant une régénération. Les péricytes cardiaques seraient donc capables de se renouveler. Cette hypothèse est cohérente avec l'augmentation de cellules PDGFRB+ que nous avons observée chez nos souris.

Pour étudier l'impact d'une perte de péricytes sur le cœur, nous avons alors choisi d'effectuer 2 semaines d'injection à 8 et 10 semaines afin de maintenir une diminution de péricytes autour de 50 % au cours du temps.

B. Effets sur les CE *in vivo* et *in vitro*

Pour étudier les effets des péricytes sur les CE, nous avons, dans un premier temps, caractérisé les péricytes dans un modèle murin sauvage et en culture cellulaire. *In vivo*, la plupart des microvaisseaux cardiaques sont recouverts de péricytes et *in vitro*, quand ils sont cultivés avec des CE, ils préviennent l'activation endothéliale et la perméabilité en stabilisant les jonctions notamment.

Dans un second temps, nous avons étudié les effets sur les CE dans notre modèle de souris déplétées en péricytes, la perte de péricytes a provoqué une activation endothéliale avec une augmentation des molécules d'adhésion et de manière cohérente, une augmentation de l'inflammation cardiaque avec infiltration de leucocytes. La perte de péricytes induit également une élévation anormale de la perméabilité, ce qui est cohérent avec les résultats *in vitro* de co-culture péricytes-CE.

C. Effets sur les cardiomyocytes et la fonction cardiaque

Pour étudier le rôle des péricytes sur le cœur, nous avons caractérisé la fonction cardiaque de nos souris déplétées en péricytes. Concernant le remodelage cardiaque, la déplétion des péricytes n'est pas associée à une hypertrophie ni à une fibrose. En revanche, une dédifférenciation des cardiomyocytes s'est effectuée avec une augmentation de l'expression de Myh7 et une diminution de l'expression de la Cx43. Cette dédifférenciation entraîne une dysfonction systolique avec une diminution de la fraction d'éjection ventriculaire gauche et de la contractilité à l'échographie et au niveau du cycle calcique. De façon intéressante, la FEVG est corrélée à la couverture péricytaire : moins il y a de péricytes et plus la FEVG est diminuée. Une dysfonction diastolique avec élévation de la pression télédiastolique ventriculaire gauche est aussi présente avec altération de la relaxation. La perte de péricytes induit également une modification de la rigidité des cardiomyocytes avec changement d'isoforme de la titine.

D. Limites du modèle

La délétion de *Pdgfrb* entraîne une diminution de péricytes, mais également une perte de CML autour des gros vaisseaux confirmant que PDGFRB n'est pas spécifique des péricytes.

E. Conclusion

Pour résumer, les péricytes cardiaques jouent un rôle important dans l'intégrité microvasculaire cardiaque notamment sur la perméabilité et l'activation, mais aussi dans la fonction cardiaque en régulant la contractilité et la relaxation des cardiomyocytes. Ces résultats suggèrent que des modifications dans la fonction ou la structure des péricytes pourraient participer à la physiopathologie de maladies cardiovasculaires.

Title

Cardiac pericytes are necessary for coronary vasculature integrity and cardiomyocyte differentiation

Authors and affiliations

Lauriane Cornuault, MS¹, François-Xavier Hérion, MD¹, Paul Rouault, MS¹, Ninon Foussard, MD¹, Philippe Alzieu, BS¹, Candice Chapouly, PharmD, PhD¹, Alain-Pierre Gadeau, PhD¹, Thierry Couffinhal, MD, PhD¹ and Marie-Ange Renault, PhD¹

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

Running title

Pericytes preserve cardiac function

Corresponding author

Marie-Ange Renault

Inserm U1034

1, avenue de Magellan

33604 Pessac

France

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

Tel : (33) 5 57 89 19 79

Abstract

Introduction: While the critical role of pericytes in maintaining vascular integrity has been extensively demonstrated in the brain and in the retina, very little is known about their role in the heart. **Objective:** We aim to investigate structural and functional consequences of partial pericyte depletion (about 60%) in the heart of adult mice. **Methods:** To deplete pericyte in adult mice, we used *Pdgfrb-Cre/ERT2*; *Rosa-DTA* mice and compared their phenotype to the one of control mice (*Rosa-DTA*) chosen among their littermates. Cardiac function was assessed via echocardiography and left ventricle (LV) catheterization one month after the first tamoxifen injection. **Results:** Mice depleted with pericytes displayed increased coronary endothelium leakage and activation which was associated with increased CD45 + cell infiltration in the heart. Pericyte depletion also modified the phenotype of cardiomyocytes with an increased expression of Myosin Heavy Chain 7, a decreased expression of ATPase Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} Transporting 2, Connexin 43 and a decreased phosphorylation of Phospholamban suggesting cardiomyocyte dedifferentiation and impaired contractility. As a consequence, mice depleted with pericytes had a reduced LV ejection fraction and an increased end-diastolic pressure demonstrating both systolic and diastolic dysfunction. Consequently, mice depleted with pericytes presented a decreased LV contractility and an increased LV relaxation time ($\text{dP}/\text{dt}_{\text{min}}$). Besides this study reveals that cardiac pericytes may undergo strong remodeling upon injury. **Conclusion:** Cardiac pericyte depletion induces both systolic and diastolic dysfunction suggesting that pericyte dysfunction may contribute to the occurrence of cardiac diseases.

Keywords

Pericytes, heart, coronary micro-vasculature, cardiac function

Introduction

Pericytes are perivascular cells that reside in the microvasculature and share a basement membrane with the underlying endothelial cells. Pericyte density varies between different organs. In the brain, the endothelial cell–pericyte ratio varies between 1:1 and 3:1 which makes it the organ with the highest density of pericytes (Armulik, Abramsson, et Betsholtz 2005). Accordingly, the brain is also the organ in which the role of pericyte has been the most investigated. Notably, in this organ, pericytes are thought to play a role in regulating permeability across the blood–brain barrier (Armulik et al. 2010; Daneman et al. 2010) since mice deficient in pericytes or exhibiting decreased pericyte function have increased vascular permeability (Armulik et al. 2010; Daneman et al. 2010). Notably, pericyte function and maintenance depends on PDGFB (platelet derived growth factor B) expression by quiescent adult microvascular brain endothelium (Vazquez-Liebanas et al. 2022).

The pericyte content of the cardiac micro-vasculature is thought to be closer to the one of the cerebral vasculature with an endothelial–pericyte ratios of 2:1–3:1 (Su et al. 2021). It is also likely that pericytes contribute to the maintenance of microvascular function in the heart given that loss of pericytes has been associated with increased vascular permeability (Chintalgattu, Rees, Culver, Goel, Jiffar, Zhang, Dunner, et al. 2013) (Siao et al. 2012), endothelial activation (Siao et al. 2012) and altered vasomotricity (Chintalgattu, Rees, Culver, Goel, Jiffar, Zhang, Dunner, et al. 2013). In particular in mice treated with PDGF receptor inhibitors (sunitinib and CP-673451), decreased pericyte coverage of cardiac capillaries was associated with increased permeability, impaired endothelium-dependent vasodilation and decreased coronary flow reserve (Chintalgattu, Rees, Culver, Goel, Jiffar, Zhang, Dunner, et al. 2013). Besides, expression of a mutant form of ProNGF (pro nerve growth factor), unable to be matured and which may target pericytes, was shown to induce endothelial activation and vascular leakage (Siao et al. 2012). Finally, pericyte loss observed in both *Sirt3* (X. He, Zeng, et Chen 2016) and *Notch3* (Tao et al. 2017) deficient mice was associated with decreased coronary flow reserve. Importantly, in each of these studies impaired microvascular integrity and function has been also associated with cardiac dysfunction, Notably, administration of the PDGF receptor specific inhibitor CP-673451 was shown to decrease ejection fraction (EF) (Chintalgattu, Rees, Culver, Goel, Jiffar, Zhang, Dunner, et al. 2013), expression of the mutant form of ProNGF induced dilated cardiomyopathy, cardiac fibrosis, and contractile dysfunction (Siao et al. 2012), *Sirt3* deficient mice showed decreased EF and fractional shortening after myocardial infarction (X. He, Zeng, et Chen 2016) while *Notch3* deficient mice were shown to exhibit cardiac hypertrophy (Tao et al. 2017). Altogether these studies suggest that pericyte may be beneficial to the coronary vasculature which may have a direct or indirect impact on cardiac function. However, in the heart pericytes were also proposed to have deleterious effects including becoming myofibroblasts and contributing to fibrosis (Greenhalgh, Iredale, et Henderson 2013). Also, capillary pericytes are suggested to be responsible for coronary no-reflow after myocardial ischemia by inducing capillary constriction (O’Farrell et al. 2017) via a mechanism involving GPR39 (G-protein coupled receptor 39) (Methner et al. 2021, 39).

In pathophysiological conditions, cardiac pericytes have been shown to either decrease or increase in number. Loss of pericytes has been shown to constitute a remarkable feature of aging in several organs including the heart in both mice and humans (J. Chen et al. 2021). Also high-fat diet was shown to induce pericyte loss in the heart of mice (Zeng et al. 2015). On the contrary, cardiac pericytes were shown to be disorganized and more numerous in obese and hypertensive ZSF1 rats (van Dijk et al. 2016). In other conditions, such as SARS-CoV-2 infection, the phenotype of pericytes is proposed to be modified by the acquisition of a more contractile phenotype (Robinson et al. 2020). Finally, pericyte dedifferentiation leading to increased endothelial permeability is proposed to be induced by the downregulation of Hypoxia-Induced Endoplasmic Reticulum Stress Regulating lncRNA in human heart failure (Bischoff et al. 2017).

In conclusion, cardiac pericytes may participate in the pathophysiology of cardiac diseases through a wide range of mechanisms. However, studies performed so far are mainly descriptive and their conclusions are based on associations. The purpose of this study is to investigate the specific consequences of pericyte depletion on cardiac structure and function.

Methods

Mice

B6.Cg-Tg(Pdgfrb-cre/ERT2)6096Rha/J (strain# 029684), Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J (Strain # 007576) and B6.129P2-Gt(ROSA)26Sortm1(DTA)Lky/J (Strain#009669) were obtained from the Jackson laboratory.

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

Echocardiography

Left-ventricular ejection fraction and LV dimension were measured on a high-resolution echocardiographic system equipped with a 30-MHz mechanical transducer (VEVO 2100, VisualSonics Inc.) as previously described (M. A. Renault et al. 2009; Roncalli et al. 2011). Mice were anchored to a warming platform in a supine position, limbs were taped to the echocardiograph electrodes, and chests were shaved and cleaned with a chemical hair remover to minimize ultrasound attenuation. UNI'GEL ECG (Asept Inmed), from which all air bubbles had been expelled, was applied to the thorax to optimize the visibility of the cardiac chambers. Ejection fractions were evaluated by planimetry as recommended (Schiller et al. 1989). Two-dimensional, parasternal long-axis and short-axis views were acquired, and the endocardial area of each frame was calculated by tracing the endocardial limits in the long-axis view, then the minimal and maximal areas were used to determine the left-ventricular

end-systolic (ESV) and end-diastolic (EDV) volumes, respectively. The system software uses a formula based on a cylindrical-hemiellipsoid model ($\text{volume} = 8 \cdot \text{area}^2 / 3\pi / \text{length}$) (Mohan et al. 1992). The left-ventricular ejection fraction was derived from the following formula: $(\text{EDV} - \text{ESV}) / \text{EDV} \cdot 100$. The cardiac wall thickness, left ventricular posterior wall (LVPW), inter-ventricular septum (IVS) and left ventricular internal diameter (LVID) were calculated by tracing wall limits in both the long and short axis views.

LV pressure /systolic blood pressure measurement

LV diastolic pressure measurement was assessed via an invasive catheterization technique. Mice were anesthetized with Isoflurane. A Scisense pressure catheter (Transonic) was inserted into the LV through the common carotid artery. Pressure was recorded using LabChart software. End diastolic pressure, dP/dt minimum and maximum, Tau and heart rate were automatically calculated by a curve fit through end-systolic and end-diastolic points on the pressure plot.

Blood sampling for biochemical marker analysis/NFS

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

Tissue staining/Immunostaining

Capillary density was evaluated in sections stained with anti-CD31 or anti-Podocalyxin (PODXL) antibodies by quantifying the number of CD31+ or PODXL+ elements. Muscularized vessels were identified using anti- α -smooth muscle actin (SMA) antibodies. Pericyte were identified using anti-NG2 or anti-PDGFRB antibodies. Leucocyte, macrophage, T-cell and B-cell infiltrations were quantified using anti-CD45, anti-CD68, anti-CD3 and anti-B220 antibodies, respectively. Endothelial adherens junction was characterized using anti-CDH5 antibodies. Edema was measured after FGB (fibrinogen) staining of muscle sections and quantified as the mean FGB-positive areas. (See Supplemental table 1 for antibody references.)

Cardiomyocyte mean surface area was measured using ImageJ software after membrane staining with Wheat Germ Agglutinin (WGA), Alexa Fluor™ 488 Conjugate (Invitrogen). Fibrosis was assessed after sirius red staining of heart sections by quantifying the percentage of red stained area.

Quantifications were done on images acquired with an Axiozoom V16 or axioscope A1 (Zeiss) under 200x magnification. They were conducted on 10 randomly selected images and performed using ImageJ/Fiji v2.0.0-rc-59 software (National Institute of Health, USA) by an investigator blinded to genotype. More precisely, each sample received a unique number. At the end of the experiment, the genotype/treatment for each sample was revealed to enable data analysis.

For immunohistochemical analyses, primary antibodies were sequentially coupled with biotin-conjugated secondary antibodies and streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) complex (Amersham). Staining was then revealed with a DAB substrate kit (Vector Laboratories) and tissue sections were counterstained with hematoxylin (see Supplemental table 2 for secondary antibody references).

For immunofluorescence analyses, primary antibodies were resolved with Alexa-Fluor–conjugated secondary polyclonal antibodies (see Supplemental table 2). Nuclei were counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

For both immunohistochemical and immunofluorescence analyses, negative control experiments to check for antibody specificity were performed using secondary antibodies.

Cell culture

Human cardiac microvascular endothelial cells (HMVEC-C) (Lonza) were cultured in endothelial basal medium-2 (EBM-2) supplemented with EGM™-2 BulletKits™ (Lonza). Cells at passage 3 were used.

Mouse pericytes were isolated from 10-day-old pups. Hearts were dissociated using 2 mg/mL type IV collagenase (Gibco™, ThermoFisher) for 1 hour at 37°C and the resulting dissociated cells were filtrated on a 30 µm strainer. Pericytes were labelled with rat anti-mouse CD146 microbeads (Miltenyi Biotec). Labelled cells were then isolated magnetically, plated and cultured in pericyte Growth Medium 2 (PromoCell). Cells at passage 1 and 2 were used.

HMVEC-C and mouse pericytes were co-cultured in 0.4 µm-pored Transwells in 6-well plates (Corning)

Quantitative RT-PCR

RNA was isolated using Tri Reagent® (Molecular Research Center Inc) as instructed by the manufacturer, from heart tissue that had been snap-frozen in liquid nitrogen and homogenized. For quantitative RT-PCR analyses, total RNA was reverse transcribed with M-MLV reverse transcriptase (Promega) and amplification was performed on an AriaMx Real Time PCR system (Agilent Technologies) using B-R SYBER® Green SuperMix (Quanta Biosciences). Primer sequences are reported in Supplementary table 3.

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

Western blot analysis

ICAM1 and VCAM1 protein levels were evaluated by SDS PAGE using goat anti-Icam-1 (R&D systems Cat# AF-796) and rabbit anti-Vcam-1 (abcam, Cat# ab134047) antibodies respectively. ATP2A2 protein level was evaluated by SDS PAGE using rabbit anti-ATP2A2 antibodies (Badrilla, Cat# A010-80). PLN phosphorylation at Serine 16 and Threonin 17 was evaluated by SDS PAGE using rabbit anti-phospho-PLN Ser16 (Badrilla, Cat# A010-12), rabbit anti-phospho-PLN Thr17 (Badrilla, Cat# A010-13) and mouse anti-total PLN (Badrilla, Cat# A010-14). RYR2 phosphorylation was evaluated by SDS PAGE using rabbit anti-phosphoRYR2 antibodies (Badrilla, Cat# A010-31).

Human CDH5 and ICAM1 protein levels were evaluated by SDS PAGE using rabbit anti-CDH5 (Cell signaling technology Cat# 2500) and mouse anti-ICAM1 (Santa Cruz biotechnology, Cat# sc-8439) antibodies respectively.

Protein loading quantity was controlled using mouse monoclonal anti- α -tubulin antibodies (Sigma, Cat# T5168).

Statistics

Results are reported as mean \pm SEM. Comparisons between groups were analysed for significance with the non-parametric Mann-Whitney test using GraphPad Prism v8.0.2 (GraphPad Inc, San Diego, Calif). The normality and variance were not tested. Differences between groups were considered significant when $p \leq 0.05$ (*: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$).

Results

Cardiac capillaries are covered by SMA-, NG2+ pericytes

In the heart less than 2% of vessels, essentially arterioles, are covered by smooth muscle myosin heavy chain (smMHC) positive SMC (smooth muscle cells). Indeed, the vast majorities of capillaries, i.e. 95% of them, are covered by NG2 positive, SMA negative pericytes (Figure 1A-C). Cardiac pericytes are stellate shaped cells with cytoplasmic processes contacting several capillaries (Figure 1D-F).

Pdgfrb-DTA mice display a 60% pericyte depletion in the heart.

To investigate the role of cardiac pericytes, we have chosen to measure the pathophysiological consequences of partial pericyte depletion on cardiac microvasculature, cardiomyocytes and heart function. To do so, we specifically induced diphtheria toxin (DTA) expression under the *Pdgfrb* promoter in adult mice. At first, we verified that *Pdgfrb* promoter was active in cardiac pericytes in adult mice, by crossing *Pdgfrb-Cre/ERT2* mice with *Rosa-mTmG* mice. As shown in supplemental Figure 1A-B, GFP (green fluorescent protein) expression, in the heart was detected in most NG2+ pericytes but also, as expected, by SMA+ smooth muscle cells.

In the meantime, we have examined GFP expression in several other organs, notably the aorta, in which GFP expression was detected in few smooth muscle cells of the media; in the brain, in which GFP was detected in perivascular cells but also unexpectedly in glial cells, in the kidney in which GFP expression was detected in some SMA+ cells of arterioles but not in NG2 + cells within the glomerulus. Also, GFP expression was detected in capillaries within the lacteals but not in SMCs surrounding the intestine. In the lung GFP expression was detected in both arterial and capillary mural cells, however, mural cells covering lung capillaries did not express NG2. Finally, in the skeletal muscle, similarly to what we found in the heart, GFP expression was detected in every pericytes and a few SMCs (Supplemental Figure 2).

Pericyte depletion was then induced by tamoxifen injections in 8-week-old *Pdgfrb-Cre/ERT2; Rosa-DTA* mice. Notably, to maintain constant pericyte depletion in the heart over time, we had to repeat tamoxifen administrations every 2 weeks. Indeed, in mice administered with tamoxifen once during 5 consecutive days, while the percentage of NG2 positive vessels was about 20%, 7 days after the first tamoxifen injection, it was back to 90% after 28 days (Supplemental Figure 3A-B).

After 2 series of tamoxifen injections, i.e. one month after the first one, the percentage of cardiac capillaries covered by pericytes was reduced by about 60% in Cre positive mice compared to Cre negative mice (Figure 1G-H) and the number of arterioles covered by SMCs was reduced by about 50% (Figure 1I-J). SMC coverage of coronary arteries was sparser (Figure 1I).

In parallel, we have examined the effectiveness of mural cell depletion in other organs. The most severe phenotypes were observed in the aorta, in which the media was strongly decellularized and in the intestine lacteals and the skeletal muscle in which NG2+ pericytes have been totally depleted (Supplemental Figure 4). These “side” depletions induced significant weight loss (Supplemental Figure 5A-B) associated with circulating markers of malnutrition including decreased hemoglobin levels, triglyceride, cholesterol and proteins levels together with decreased Aspartate aminotransferase and Alkaline phosphatase levels (Supplemental Figure 5C-K). As expected, the smooth muscle cell loss in the aorta decreased diastolic blood pressure. Systolic blood pressure and heart rate were not modified (Supplemental Figure 5L-O). Finally, consistent with pericyte loss in the skeletal muscle, mice were severely intolerant to exercise (Supplemental Figure 5P).

Altogether these results demonstrate that *Pdgfrb-DTA* mice display successful pericyte depletion in the heart. However, considering the absence of pericyte specific marker and/or the absence of cardiac mural cell specific markers allowing pericyte depletion in the heart only, the interpretation of the data presented may have some limitations.

Cardiac Pericyte are renewed

While performing a thorough histological analysis of the heart of *Pdgfrb-DTA* mice, we were surprised to see that the number of small vessels (with a diameter <25 μm) covered by SMA+ cells was significantly increased in the heart of *Pdgfrb-DTA* mice compared to control mice (Figure 2A -B). These SMA+ cells were actually NG2 positive, suggesting that the remaining pericytes in these mice displayed

an activated phenotype characterized by SMA expression (Figure 2C). Besides, the hearts of *Pdgfrb*-DTA mice displayed an increased number of Vimentin (VIM) positive mesenchymal cells (Figure 2D-E). Notably, among VIM positive cells, the number of PDGFRB negative cells (fibroblasts) did not increase (Figure 2F-G) while the number of PDGFRB positive cells significantly increased (Figure 2H). These results suggest that the number of cardiac fibroblasts did not change while the remaining pericytes became activated pericytes and proliferated. These PDGFRB responsive cells did not all express NG2 (Figure 2H).

Accordingly, when we quantified cardiac fibrosis after sirius red staining of cardiac sections we found that interstitial fibrosis was not significantly modulated; only perivascular fibrosis was (Supplemental Figure 6A-C). Moreover, the expression of several markers of fibrosis including *Col1a1*, *Col3a1*, *Tgfb1* and *Ctgf* mRNA was not significantly different between *Pdgfrb*-DTA mice and control mice (Supplemental Figure 6D-G).

Altogether these results suggest that partial pericyte depletion induces activation and proliferation of the remaining pericytes.

Pericyte depletion modifies the phenotype of cardiac capillary

We then measured the consequences of mural cell depletion on cardiac microvasculature. As mentioned above, this was done one month after induction of pericyte depletion. As shown in figure 3A-B, pericyte depletion did not induce microvessel rarefaction, since capillary density was equivalent in both *Pdgfrb*-DTA and Ctrl mice. However, pericyte depletion led to an increased endothelial activation characterized by a significant increase in ICAM1 and VCAM1 expression. This phenotype was proved via immunostaining (Figure 3C-E) and confirmed by western blot analyses of total heart extracts (Figure 3F-H). Also, pericyte depletion led to altered endothelial intercellular junctions since we observed that CDH5 staining was discontinuous in pericyte depleted mice (Figure 3I-J). We confirmed that endothelial intercellular junction integrity was altered in *Pdgfrb*-DTA mice since Fibrinogen (FGB) extravasation was significantly increased in *Pdgfrb*-DTA mice compared to control mice (Figure 3K-L) revealing that capillary permeability increased abnormally in pericyte depleted mice.

We confirmed the critical role of cardiac pericytes in maintaining endothelial integrity and immune quiescence *in vitro*. To do so we co-cultured mouse cardiac pericytes with human micro-vascular cardiac endothelial cells (HMVEC-C) (Supplemental figure 7A). HMVECs co-cultured with pericytes expressed significantly higher CDH5 protein level, while CDH2 mRNA was downregulated (Supplemental Figure 7B-D) meaning increased endothelial differentiation. Consistent with *in vivo* data, pericytes prevented HMVEC-C activation by decreasing ICAM1, VCAM1 and IL-6 levels (Supplemental Figure 7E-I).

Consistent with endothelial activation *Pdgfrb*-DTA mice displayed cardiac inflammation with significantly increased IL-6 mRNA level (Supplemental Figure 8A) and increased CD45⁺ leucocyte infiltration (Supplemental Figure 8B-C) in the heart. Notably, neither CD68⁺ macrophage nor CD3⁺ T-

cell infiltration was increased (Supplemental Figure 8D-H), while B220 B-cells infiltration was significantly increased (Supplemental Figure 8I-J).

Overall these results confirm association studies and demonstrate that pericytes are necessary for cardiac capillary integrity and immune quiescence, just as they are in the brain.

Pericyte depletion modifies the phenotype of cardiomyocytes

To assess the phenotype of cardiomyocytes, we first performed WGA staining of heart cross sections and found that the cardiomyocytes did not show hypertrophy (Figure 4A-B). Consistent with this, the heart weight over tibia length ratio was not modified and so were cardiac dimensions (i.e. interventricular septum (IVS), left ventricular posterior wall (LVPW) thickness, LV internal diameter (LVID) in diastole) measured via echocardiography (Figure 4D-F). However, WGA staining revealed that Pdgfrb-DTA had expanded cardiac interstitial space (Figure 4A), which is consistent with increased vascular leakage.

Also, cardiomyocytes showed impaired differentiation with increased Myosin Heavy Chain 7 (Myh7) mRNA expression (Figure 4G) and decreased Connexin 43 (CX43) levels (Figure 4I-J). To test whether cardiomyocyte contractility was affected by pericyte depletion, we first measured ATPase Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} Transporting 2 (ATP2A2) expression and found it significantly downregulated both at mRNA and protein level in Pdgfrb-DTA mice compared to control mice (Figure 5A-C). This was associated with diminished Phospholamban (PLN) both at Serine 16 and Threonine 17. (Figure 5D-F). In contrast, Ryanodine Receptor 2 (RYR2) phosphorylation at Serine 2814 was not significantly different in both groups (Figure 5G-H). To assess cardiomyocyte stiffness, we quantified mRNA expression of each Titin (Ttn) isoforms. Expression of stiff Ttn isoform N2B was significantly diminished while expression of Ttn N2BA isoform tended to increase. Therefore, the N2BA/N2B ratio was significantly increased (Figure 5I-H).

Altogether these results demonstrate that pericyte depletion induces impaired cardiomyocyte differentiation, contractility and mice display a Titin isoform ratio consistent with heart failure in humans (Borbély et al. 2009). In order to test whether pericytes may directly affect cardiomyocyte biology, we performed co-culture assays. However, when co-cultured with human cardiomyocytes, mouse cardiac pericytes modified neither ATP2A2 nor CX43 protein levels (Supplemental Figure 9) suggesting that pericytes may not directly affect the phenotype of cardiomyocytes. Impaired cardiomyocyte differentiation and contractility are then more likely the consequences of endothelium dysfunction or cardiac inflammation.

Pericyte depletion impairs both systolic and diastolic function

Finally, in order to test whether pericyte depletion and the associated cardiac remodeling result in cardiac dysfunction, we performed an echocardiography and a left ventricular catheterization. As shown in figure 6, left ventricular ejection fraction (LVEF) was significantly reduced in Pdgfrb-DTA mice

indicating systolic dysfunction (Figure 6A). LVEF was interestingly positively correlated with pericyte coverage (Figure 6B). Consistent with systolic dysfunction, cardiac contractility (attested by dP/dt max and contractility index) significantly decreased (Figure 6C-E) while LV end systolic volume significantly increased (Figure 6F-G) in pericyte depleted mice compared to control mice.

Mice depleted from cardiac pericytes also displayed diastolic dysfunction attested by increased end diastolic pressure (EDP) (Figure 6H,I) and decreased dP/dt min (Figure 6J-K). Relaxation constant Tau tended to increase in Pdgfrb-DTA mice but the difference did not reach significance (Figure 6L).

In conclusion, this study demonstrates for the first time that pericytes are necessary for proper cardiac function.

Discussion

The present study demonstrates for the first time that, just like in the brain, pericytes are necessary for endothelium integrity and immune quiescence in the heart. Importantly, in this organ, pericytes are not only necessary for coronary vasculature integrity but also for proper cardiac function suggesting that modifications of pericyte properties may participate in the pathophysiology of cardiac diseases.

Besides, this study reveals that cardiac pericytes may undergo strong remodeling upon injury (e.i. renewal, expression of SMA). This is consistent with what has been observed in obese and hypertensive ZSF1 rats (van Dijk et al. 2016) in which pericytes were shown to be disorganized and more numerous. This piece of data actually suggests that, even though pericytes may induce similar effects in the brain and in the heart by maintaining microvasculature integrity, pericyte turnover and biology in these organs may be very different. Indeed, in the central nervous system, pericyte impairment seems to be essentially characterized by pericyte loss. Notably, one of the earliest hallmarks of diabetic retinopathy is the loss of pericytes. The diabetic microenvironment is suggested to be particularly detrimental to pericyte survival in the retina since during the early stages of retinopathy, the pericyte to EC ratio decreases from 1:1 to 1:4 (Robison, Kador, et Kinoshita 1985). In the brain, pericyte number and coverage in the cortex and hippocampus of subjects with Alzheimer's disease compared with neurologically intact controls were shown to be reduced by 59% and 60% (Sengillo et al. 2013), respectively. Similarly, in the spinal cord, immunostaining for PDGFRB, has indicated a 54 % ($p < 0.01$) reduction in the number of pericytes in amyotrophic lateral sclerosis patients compared to controls (Winkler et al. 2013). However, in the heart, pericyte impairment is more likely characterized by phenotypic changes with acquisition of an 'activated' phenotype. Notably, the number of pericytes was shown to increase in the heart of mice infused with angiotensin-2. Moreover these pericytes express higher levels of SMA (Su et al. 2020). As mentioned above, cardiac pericytes were shown to be disorganized and more numerous in obese and hypertensive ZSF1 rats (van Dijk et al. 2016). In our model, pericyte depletion induced pericyte activation and renewal.

Pericyte loss has been previously associated with reduced LVEF (Chintalgattu et al. 2013) (He, Zeng, and Chen 2016), dilated cardiomyopathy, cardiac fibrosis, contractile dysfunction (Siao et al. 2012) and

cardiac hypertrophy (Tao et al. 2017). Our study confirms that pericytes are necessary for proper cardiac contractility and systolic function, while pericyte loss does not seem to promote cardiac fibrosis, hypertrophy or dilation. In Siao et al. study, cardiac fibrosis and dilation may then be due to the effect of the mutant form of ProNGF on other cell types, notably cardiomyocytes and/or fibroblasts (Siao et al. 2012), while in Tao et al. study (Tao et al. 2017), cardiac hypertrophy may be due to Notch3 deletion in cardiomyocytes (Øie et al. 2010).

Whether or not pericytes may dialogue with cardiomyocytes directly remains to be further investigated, while our data suggest that pericyte associated deregulation of ATP2A2 and CX43 expression in cardiomyocyte require at least a third cell type, another study suggest that pericytes may dialogue with cardiomyocytes directly via MiR-132 transfer (R. Katare et al. 2011).

One of the main limitations of this study is technical because a mouse model only targeting cardiac pericytes still needs to be created to obtain robust and specific characterization of the role of cardiac pericytes. Indeed, *Pdgfrb* promoter does not only target pericytes but also SMCs and *Pdgfrb* promoter does not only target cardiac mural cells but mural cells of the entire body. However, several mouse models targeting pericytes have been used especially in the brain and most of these models are based on PDGFB-PDGFRB signaling which is crucial for pericyte recruitment and survival (Hoch et Soriano 2003). At first, developmental studies were performed on *Pdgfrb* (Levéen et al. 1994) and *Pdgfrb* (Soriano 1994) deficient embryos, which are not viable. Then mice harboring mutations within the *Pdgfrb* gene (the *Pdgfrb*^{redeye/redeye} mutant (Jadeja et al. 2013) and the *Pdgfrb*^{F7/F7} mutant (Angeliki Maria Nikolakopoulou et al. 2017)) were used. These mutants display progressive pericyte loss especially in the central nervous system (brain and retina). Mouse models with inducible pericyte depletion have been developed. These models are tamoxifen inducible, and use either Diphtheria toxin A (DTA) or its receptor DTR to induce cell ablation (Eilken et al. 2017, 1). These last models allow the exploration of the role of pericytes in adults excluding the potential consequences of developmental defects. The *Pdgfrb*-Cre/ERT2; Rosa iDTR model is proposed to induce a less severe pericyte depletion than the *Pdgfrb*-Cre/ERT2; Rosa iDTA model however, it requires administration of both tamoxifen and Diphtheria toxin (Eilken et al. 2017, 1). Alternatively to the *Pdgfrb* promoter, the *Cspg4* (also known as NG2) promoter has been proposed to induce pericyte depletion. However, its induction efficiency is lower than the one of *Pdgfrb* and just like *Pdgfrb* promoter, it induces recombination in SMCs (Mayr et al. 2022, 2). Finally, a strategy utilizing a double-promoter approach with *Pdgfrb* and the *Cspg4* has been used (Angeliki M. Nikolakopoulou et al. 2019) to target pericytes more specifically, but both of promoters also target SMCs as described above.

Acknowledgments

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

Sources of funding

This study was supported by grants from the Fondation pour la Recherche Médicale (équipe FRM), and the Agence Nationale pour la Recherche (Appel à Projet Générique). Additionally, this study was co-funded by the “*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*” (Inserm), and by the University of Bordeaux. François-Xavier Héron received a fellowship from the CHU de Bordeaux.

Disclosures

none

References

- Armulik, Annika, Alexandra Abramsson, and Christer Betsholtz. 2005. “Endothelial/Pericyte Interactions.” *Circulation Research* 97 (6): 512–23. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7>.
- Armulik, Annika, Guillem Genové, Maarja Mäe, Maya H. Nisancioglu, Elisabet Wallgard, Colin Niaudet, Liqun He, et al. 2010. “Pericytes Regulate the Blood–Brain Barrier.” *Nature* 468 (7323): 557–61. <https://doi.org/10.1038/nature09522>.
- Berger, Mario, Gabriele Bergers, Bernd Arnold, Günter J. Hämmerling, and Ruth Ganss. 2005. “Regulator of G-Protein Signaling-5 Induction in Pericytes Coincides with Active Vessel Remodeling during Neovascularization.” *Blood* 105 (3): 1094–1101. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2315>.
- Bischoff, Florian C., Astrid Werner, David John, Jes-Niels Boeckel, Maria-Theodora Melissari, Phillip Grote, Simone F. Glaser, et al. 2017. “Identification and Functional Characterization of Hypoxia-Induced Endoplasmic Reticulum Stress Regulating LncRNA (HyperInc) in Pericytes.” *Circulation Research* 121 (4): 368–75. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.310531>.
- Borbély, Attila, Ines Falcao-Pires, Loek van Heerebeek, Nazha Hamdani, István Edes, Cristina Gavina, Adelino F. Leite-Moreira, et al. 2009. “Hypophosphorylation of the Stiff N2B Titin Isoform Raises Cardiomyocyte Resting Tension in Failing Human Myocardium.” *Circulation Research* 104 (6): 780–86. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.193326>.
- Chen, Junyu, Unnikrishnan Sivan, Sin Lih Tan, Luciana Lippo, Jessica De Angelis, Rossella Labella, Amit Singh, et al. 2021. “High-Resolution 3D Imaging Uncovers Organ-Specific Vascular Control of Tissue Aging.” *Science Advances* 7 (6). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd7819>.
- Chintalgattu, Vishnu, Meredith L. Rees, James C. Culver, Aditya Goel, Tilahu Jiffar, Jianhu Zhang, Kenneth Dunner, et al. 2013. “Coronary Microvascular Pericytes Are the Cellular Target of Sunitinib Malate-Induced Cardiotoxicity.” *Science Translational Medicine* 5 (187): 187ra69. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005066>.
- Daneman, Richard, Lu Zhou, Amanuel A. Kebede, and Ben A. Barres. 2010. “Pericytes Are Required for Blood-Brain Barrier Integrity during Embryogenesis.” *Nature* 468 (7323): 562–66. <https://doi.org/10.1038/nature09513>.
- Dijk, Christian G.M. van, Nynke R. Oosterhuis, Yan Juan Xu, Maarten Brandt, Walter J. Paulus, Loek van Heerebeek, Dirk J. Duncker, et al. 2016. “Distinct Endothelial Cell Responses in the Heart and Kidney Microvasculature Characterize the Progression of Heart Failure With Preserved Ejection

- Fraction in the Obese ZSF1 Rat With Cardiorenal Metabolic Syndrome." *Circulation: Heart Failure* 9 (4): e002760. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002760>.
- Eilken, Hanna M., Rodrigo Diéguez-Hurtado, Inga Schmidt, Masanori Nakayama, Hyun-Woo Jeong, Hendrik Arf, Susanne Adams, Napoleone Ferrara, and Ralf H. Adams. 2017. "Pericytes Regulate VEGF-Induced Endothelial Sprouting through VEGFR1." *Nature Communications* 8 (1): 1574. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01738-3>.
- Greenhalgh, Stephen N., John P. Iredale, and Neil C. Henderson. 2013. "Origins of Fibrosis: Pericytes Take Centre Stage." *F1000Prime Reports* 5 (September): 37. <https://doi.org/10.12703/P5-37>.
- He, Xiaochen, Heng Zeng, and Jian-Xiong Chen. 2016. "Ablation of SIRT3 Causes Coronary Microvascular Dysfunction and Impairs Cardiac Recovery Post Myocardial Ischemia." *International Journal of Cardiology* 215 (July): 349–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.04.092>.
- Hoch, Renée V., and Philippe Soriano. 2003. "Roles of PDGF in Animal Development." *Development* 130 (20): 4769–84. <https://doi.org/10.1242/dev.00721>.
- Jadeja, Shalini, Richard L. Mort, Margaret Keighren, Alan W. Hart, Russell Joynson, Sara Wells, Paul K. Potter, and Ian J. Jackson. 2013. "A CNS-Specific Hypomorphic Pdgfr-Beta Mutant Model of Diabetic Retinopathy." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 54 (5): 3569–78. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-11125>.
- Katara, Rajesh, Federica Riu, Kathryn Mitchell, Miriam Gubernator, Paola Campagnolo, Yuxin Cui, Orazio Fortunato, et al. 2011. "Transplantation of Human Pericyte Progenitor Cells Improves the Repair of Infarcted Heart Through Activation of an Angiogenic Program Involving Micro-RNA-132." *Circulation Research* 109 (8): 894–906. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.251546>.
- Levéen, P., M. Pekny, S. Gebre-Medhin, B. Swolin, E. Larsson, and C. Betsholtz. 1994. "Mice Deficient for PDGF B Show Renal, Cardiovascular, and Hematological Abnormalities." *Genes & Development* 8 (16): 1875–87. <https://doi.org/10.1101/gad.8.16.1875>.
- Mayr, Daniela, Julia Preishuber-Pflügl, Andreas Koller, Susanne M. Brunner, Christian Runge, Anja-Maria Ladek, Francisco J. Rivera, Herbert A. Reitsamer, and Andrea Trost. 2022. "Characterization of the Two Inducible Cre Recombinase-Based Mouse Models NG2-CreERTM and PDGFRb-P2A-Cre/ERT2 for Pericyte Labeling in the Retina." *Current Eye Research*, March, 1–7. <https://doi.org/10.1080/02713683.2021.2002910>.
- Methner, Carmen, Zhiping Cao, Anusha Mishra, and Sanjiv Kaul. 2021. "Mechanism and Potential Treatment of the 'No Reflow' Phenomenon after Acute Myocardial Infarction: Role of Pericytes and GPR39." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 321 (6): H1030–41. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00312.2021>.
- Mohan, J. C., K. K. Sethi, R. Arora, and M. Khalilullah. 1992. "Cross Sectional Echocardiographic Left Ventricular Ejection Fraction: Method Based Variability." *Indian Heart Journal* 44 (1): 23–28.
- Nikolakopoulou, Angeliki M., Axel Montagne, Kassandra Kisler, Zhonghua Dai, Yaoming Wang, Mikko T. Huuskonen, Abhay P. Sagare, et al. 2019. "Pericyte Loss Leads to Circulatory Failure and Pleiotrophin Depletion Causing Neuron Loss." *Nature Neuroscience* 22 (7): 1089–98. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0434-z>.
- Nikolakopoulou, Angeliki Maria, Zhen Zhao, Axel Montagne, and Berislav V. Zlokovic. 2017. "Regional Early and Progressive Loss of Brain Pericytes but Not Vascular Smooth Muscle Cells in Adult Mice

- with Disrupted Platelet-Derived Growth Factor Receptor- β Signaling." *PloS One* 12 (4): e0176225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176225>.
- O'Farrell, Fergus M., Svetlana Mastitskaya, Matthew Hammond-Haley, Felipe Freitas, Wen Rui Wah, and David Attwell. 2017. "Capillary Pericytes Mediate Coronary No-Reflow after Myocardial Ischaemia." *ELife* 6 (November): e29280. <https://doi.org/10.7554/eLife.29280>.
- Øie, Erik, Wiggo J. Sandberg, Mohammad Shakil Ahmed, Arne Yndestad, Ole Didrik Lærum, Håvard Attramadal, Pål Aukrust, and Hans Geir Eiken. 2010. "Activation of Notch Signaling in Cardiomyocytes during Post-Infarction Remodeling." *Scandinavian Cardiovascular Journal: SCJ* 44 (6): 359–66. <https://doi.org/10.3109/14017431.2010.511256>.
- Renault, M. A., J. Roncalli, J. Tongers, S. Misener, T. Thorne, K. Jujo, A. Ito, et al. 2009. "The Hedgehog Transcription Factor Gli3 Modulates Angiogenesis." *Circ Res* 105 (8): 818–26.
- Robinson, Fulton A., Ryan P. Mihealsick, Brant M. Wagener, Peter Hanna, Megan D. Poston, Igor R. Efimov, Kalyanam Shivkumar, and Donald B. Hoover. 2020. "Role of Angiotensin-Converting Enzyme 2 and Pericytes in Cardiac Complications of COVID-19 Infection." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 319 (5): H1059–68. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00681.2020>.
- Robison, W. G., P. F. Kador, and J. H. Kinoshita. 1985. "Early Retinal Microangiopathy: Prevention with Aldose Reductase Inhibitors." *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association* 2 (3): 196–99. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.1985.tb00635.x>.
- Roncalli, J., M. A. Renault, J. Tongers, S. Misener, T. Thorne, C. Kamide, K. Jujo, et al. 2011. "Sonic Hedgehog-Induced Functional Recovery after Myocardial Infarction Is Enhanced by AMD3100-Mediated Progenitor-Cell Mobilization." *J Am Coll Cardiol* 57 (24): 2444–52.
- Schiller, N. B., P. M. Shah, M. Crawford, A. DeMaria, R. Devereux, H. Feigenbaum, H. Gutgesell, N. Reichek, D. Sahn, and I. Schnittger. 1989. "Recommendations for Quantitation of the Left Ventricle by Two-Dimensional Echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms." *Journal of the American Society of Echocardiography: Official Publication of the American Society of Echocardiography* 2 (5): 358–67. [https://doi.org/10.1016/s0894-7317\(89\)80014-8](https://doi.org/10.1016/s0894-7317(89)80014-8).
- Sengillo, Jesse D., Ethan A. Winkler, Corey T. Walker, John S. Sullivan, Mahlon Johnson, and Berislav V. Zlokovic. 2013. "Deficiency in Mural Vascular Cells Coincides with Blood-Brain Barrier Disruption in Alzheimer's Disease." *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 23 (3): 303–10. <https://doi.org/10.1111/bpa.12004>.
- Siao, Chia-Jen, Christina U. Lorentz, Pouneh Kermani, Tina Marinic, John Carter, Kelly McGrath, Victoria A. Padow, et al. 2012. "ProNGF, a Cytokine Induced after Myocardial Infarction in Humans, Targets Pericytes to Promote Microvascular Damage and Activation." *The Journal of Experimental Medicine* 209 (12): 2291–2305. <https://doi.org/10.1084/jem.20111749>.
- Soriano, P. 1994. "Abnormal Kidney Development and Hematological Disorders in PDGF Beta-Receptor Mutant Mice." *Genes & Development* 8 (16): 1888–96. <https://doi.org/10.1101/gad.8.16.1888>.
- Su, Han, Aubrey C. Cantrell, Heng Zeng, Shai-Hong Zhu, and Jian-Xiong Chen. 2021. "Emerging Role of Pericytes and Their Secretome in the Heart." *Cells* 10 (3): 548. <https://doi.org/10.3390/cells10030548>.

- Su, Han, Heng Zeng, Bo Liu, and Jian-Xiong Chen. 2020. "Sirtuin 3 Is Essential for Hypertension-induced Cardiac Fibrosis via Mediating Pericyte Transition." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 24 (14): 8057–68. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15437>.
- Tao, Yong-Kang, Heng Zeng, Guo-Qiang Zhang, Sean T. Chen, Xue-Jiao Xie, Xiaochen He, Shuo Wang, Hongyan Wen, and Jian-Xiong Chen. 2017. "Notch3 Deficiency Impairs Coronary Microvascular Maturation and Reduces Cardiac Recovery after Myocardial Ischemia." *International Journal of Cardiology* 236 (June): 413–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.01.096>.
- Vazquez-Liebanas, Elisa, Khayrun Nahar, Giacomo Bertuzzi, Annika Keller, Christer Betsholtz, and Maarja Andaloussi Mäe. 2022. "Adult-Induced Genetic Ablation Distinguishes PDGFB Roles in Blood-Brain Barrier Maintenance and Development." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 42 (2): 264–79. <https://doi.org/10.1177/0271678X211056395>.
- Winkler, Ethan A., Jesse D. Sengillo, John S. Sullivan, Jenny S. Henkel, Stanley H. Appel, and Berislav V. Zlokovic. 2013. "Blood-Spinal Cord Barrier Breakdown and Pericyte Reductions in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Acta Neuropathologica* 125 (1): 111–20. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1039-8>.
- Zeng, Heng, Venkata Ramana Vaka, Xiaochen He, George W Booz, and Jian-Xiong Chen. 2015. "High-Fat Diet Induces Cardiac Remodelling and Dysfunction: Assessment of the Role Played by SIRT3 Loss." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 19 (8): 1847–56. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12556>.

Figures and Figure legends

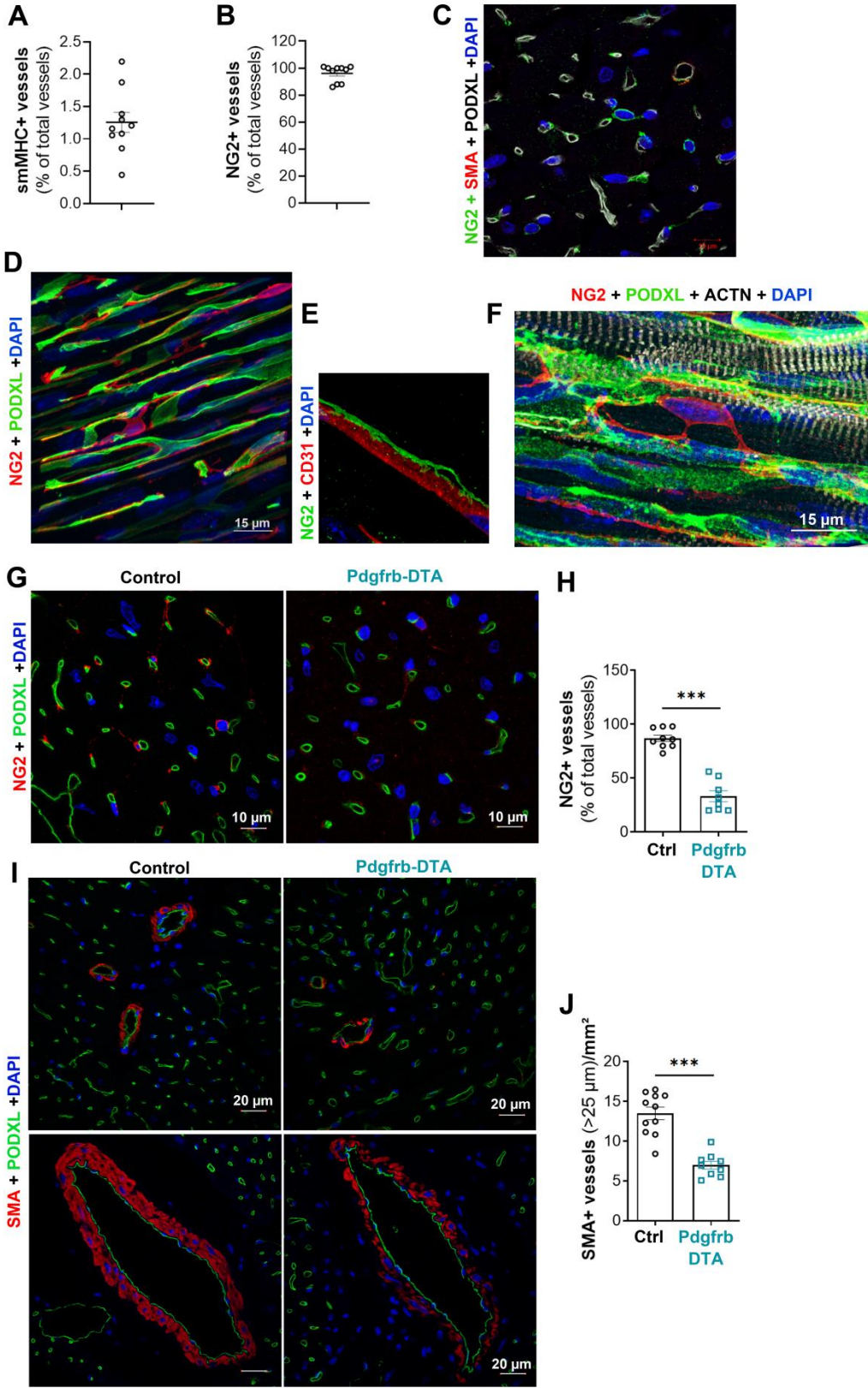


Figure 1: 95 % of the cardiac vasculature is covered by pericytes. (A) Heart cross sections were co-immunostained with anti-smMHC and anti-PODXL antibodies to identify SMCs and ECs respectively. The percentage of smMHC+ vessels over total PODXL+ vessels was calculated. (B) Heart cross sections were co-immunostained with anti-NG2 and anti-PODXL antibodies to identify pericytes and ECs respectively. The percentage of NG2+ vessels over total PODXL+ vessels was calculated. (C) Heart cross section were co-immunostained with anti-SMA (in red), anti-NG2 (in green) and anti-PODXL (in white) antibodies to identify SMCs, pericytes and ECs respectively. (D) Heart thick sections were co-immunostained with anti-NG2 (in red) and anti-PODXL (in green) antibodies to identify pericytes and ECs respectively. (E) Heart thick sections were co-immunostained with anti-NG2 (in green) and anti-CD31 (in red) antibodies to identify pericytes and ECs respectively. (E) Heart thick sections were co-immunostained with anti-NG2 (in red), anti-PODXL (in green) and anti-ACTN2 (in white) antibodies to identify pericytes, ECs and cardiomyocyte respectively. (G-J) Pdgfrb-Cre/ERT2; RosaDTA (Pdgfrb-DTA) and RosaDTA (Control) mice were administered with tamoxifen. Mice were sacrificed 28 days after the first injection. (G) Heart cross sections were co-immunostained with anti-NG2 (in red) and anti-PODXL (in green) antibodies to identify pericytes and ECs respectively. (H) The percentage of NG2+ vessels over total PODXL+ vessels was calculated (n=8 and 9). (I) Heart cross sections were co-immunostained with anti-SMA (in red) and anti-PODXL (in green) antibodies to identify SMCs and ECs respectively. (J) The number of SMA+ vessels per mm² was counted (n=9 and 11). ***: p≤0.001 (Mann Whitney test)

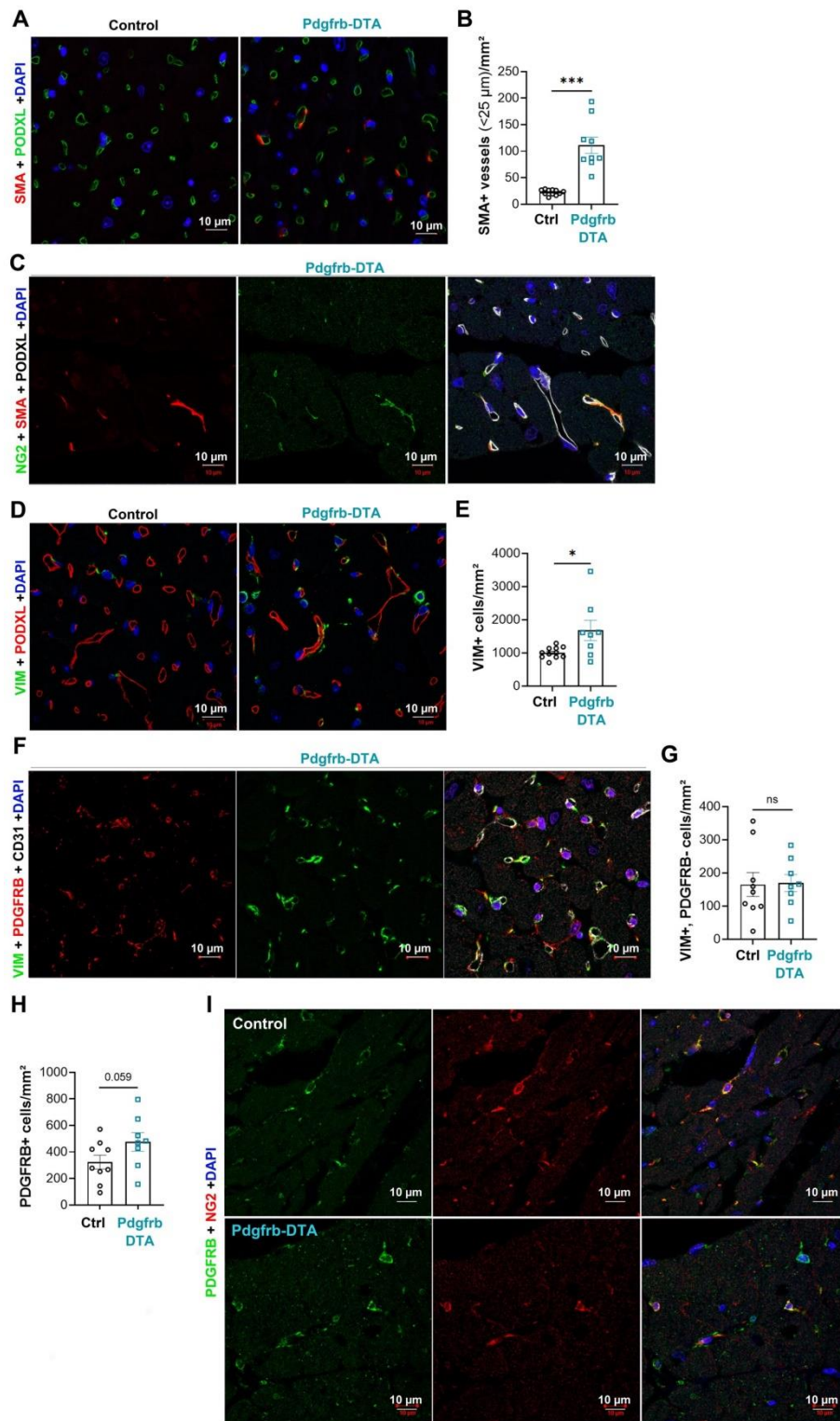


Figure 2: Pdgfrb-Cre/ERT2; RosaDTA (Pdgfrb-DTA) and RosaDTA (Control) mice were administered with tamoxifen. Mice were sacrificed 28 days after the first injection. **(A)** Heart cross sections were co-immunostained with anti-SMA (in red) and anti-PODXL (in green) antibodies to identify SMCs and ECs respectively. **(B)** The number of SMA+ vessels with a diameter $\leq 25 \mu\text{m}$ per mm² was counted (n=9 and 11). **(C)** Heart cross sections were co-immunostained with anti-SMA (in red), anti-NG2 (in green) and

anti-PODXL (in white) antibodies to identify SMCs, pericytes and ECs respectively. **(D)** Heart cross sections were co-immunostained with anti-VIM (in green) and anti-PODXL (in red) antibodies to identify fibroblasts and ECs, respectively. **(E)** The number of VIM+ cells per mm² was counted (n=9 and 11). **(F)** Heart cross sections were co-immunostained with anti-PDGFRB (in red), anti-VIM (in green) and anti-CD31 (in white) antibodies. **(G)** The number of VIM+, PDGFRB- cells per mm² was counted (n=9 and 8). **(H)** The number of PDGFRB+ cells per mm² was counted (n=9 and 8). **(I)** Heart cross sections were co-immunostained with anti-PDGFRB (in green), anti-NG2 (in red) antibodies. *: p≤0.05, ***: p≤0.001, ns: not significant (Mann Whitney test).

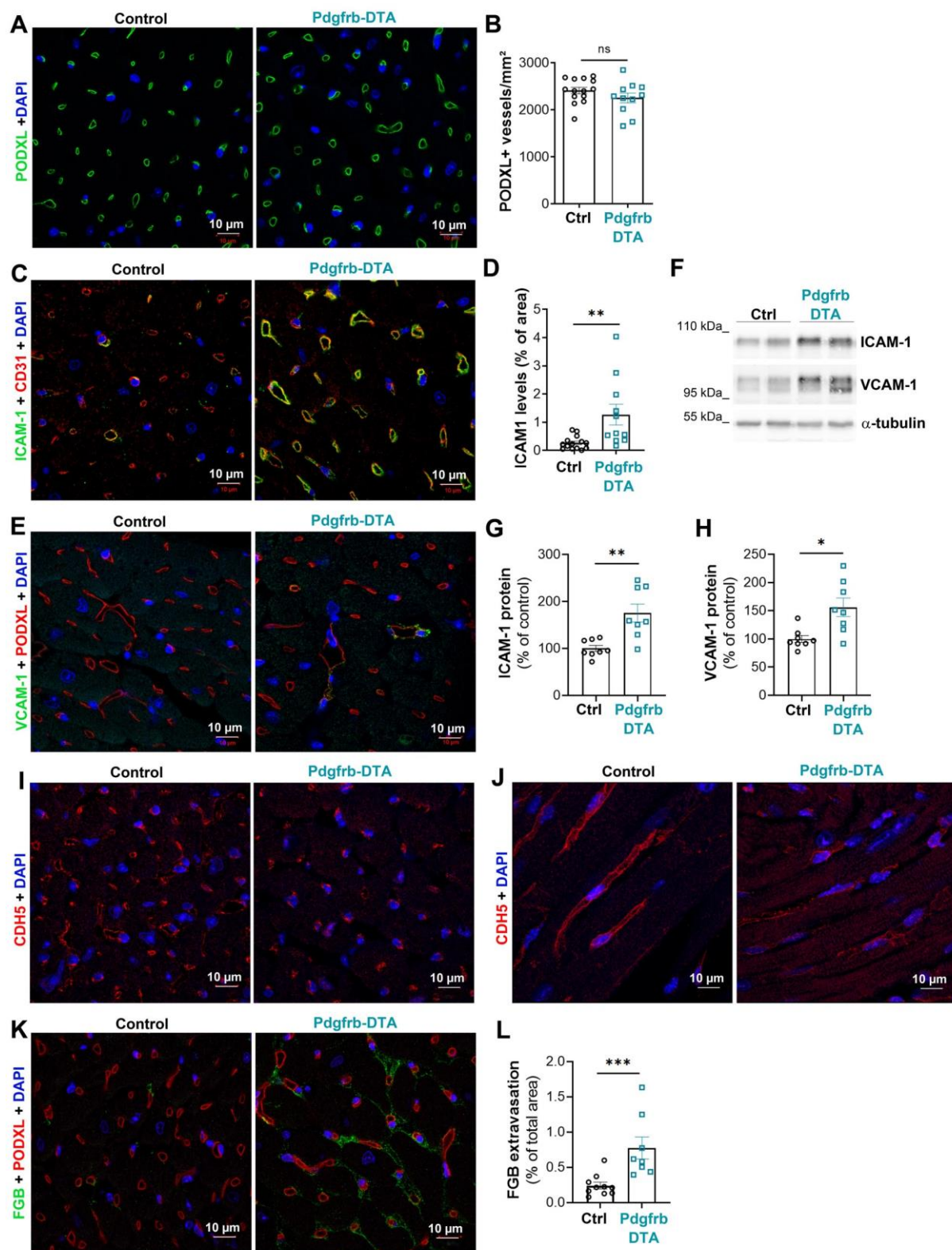


Figure 3: Pericyte are necessary to maintain cardiac capillary integrity. Pdgfrb-Cre/ERT2; RosaDTA (Pdgfrb-DTA) and RosaDTA (Control) mice were administered with tamoxifen. Mice were sacrificed 28 days after the first injection. (A) Heart cross sections were immunostained with anti-PODXL antibodies to identify ECs. (B) The number of PODXL+ capillary per mm² was counted (n=14 and 11). (C) Heart cross sections were co-immunostained with anti-ICAM1 (in green) and anti-CD31 (in red) antibodies.

(D) ICAM1 + surface area was quantified using Image J software (n=13 and 10). (E) Heart cross sections were co-immunostained with anti-VCAM1 (in green) and anti-PODXL (in red) antibodies. (F) ICAM1 and VCAM1 protein expression was quantified in total heart extract by western blot analysis. ICAM1 (G) and VCAM1 (H) protein was quantified using image J software and normalized to α -tubulin (n=8 per group). (I-J) Heart cross sections were immunostained with anti-CDH5 antibodies to identify adherens junctions. (K) Heart cross sections were co-immunostained with anti-FGB and anti-PODXL antibodies. (L) FGB+ surface area was measured using Image J software (n=10 and 8). *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ns: not significant (Mann Whitney test).

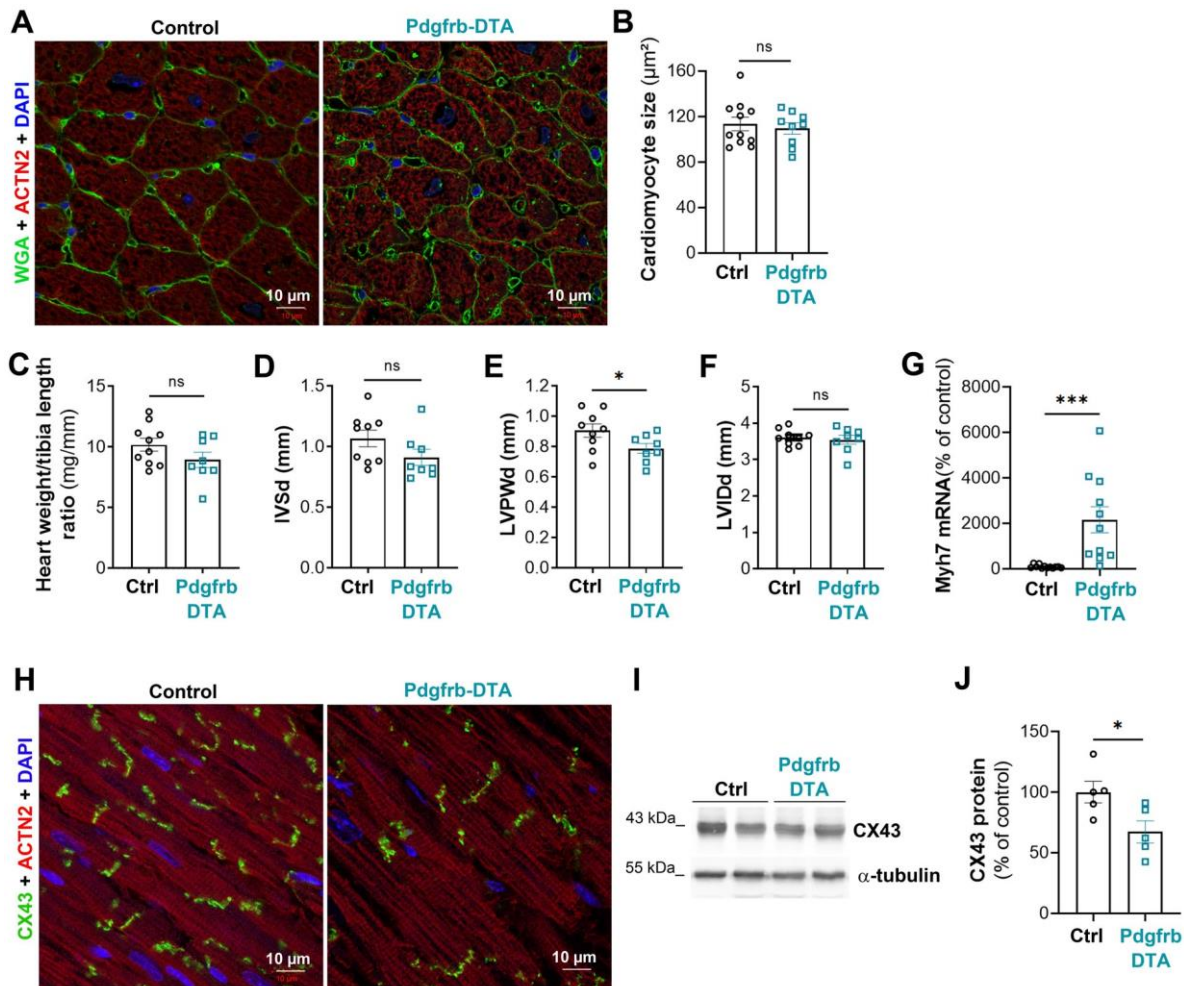


Figure 4: Pericyte depletion induces cardiomyocyte dedifferentiation but not cardiomyocyte hypertrophy. Pdgfrb-Cre/ERT2; RosaDTA (Pdgfrb-DTA) and RosaDTA (Control) mice were administered with tamoxifen. Mice were sacrificed 28 days after the first injection. (A) Heart cross sections were co-stained with WGA (in green) and anti-ACTN2 (in red) antibodies. (B) Cardiomyocyte cross section area was measured using Image J software (n=11 and 9). (C) The heart weight over tibia length was measured (n=10 and 8). Interventricular septum (IVS) (D), left ventricular posterior wall (LVPW) (E) thickness and left ventricular internal diameter (F) were measured by echocardiography in diastole. (G) Myh7 mRNA expression was quantified by RT-qPCR in total heart extract and normalized to 18S rRNA. (H) Heart cross sections were co-immunostained with anti-CX43 (in green) and anti-ACTN2 (in red) antibodies. (I) CX43 protein expression was analyzed by western blot and (J) quantified using Image J software. *: $p \leq 0.05$, ***: $p \leq 0.001$, ns: not significant (Mann Whitney test).

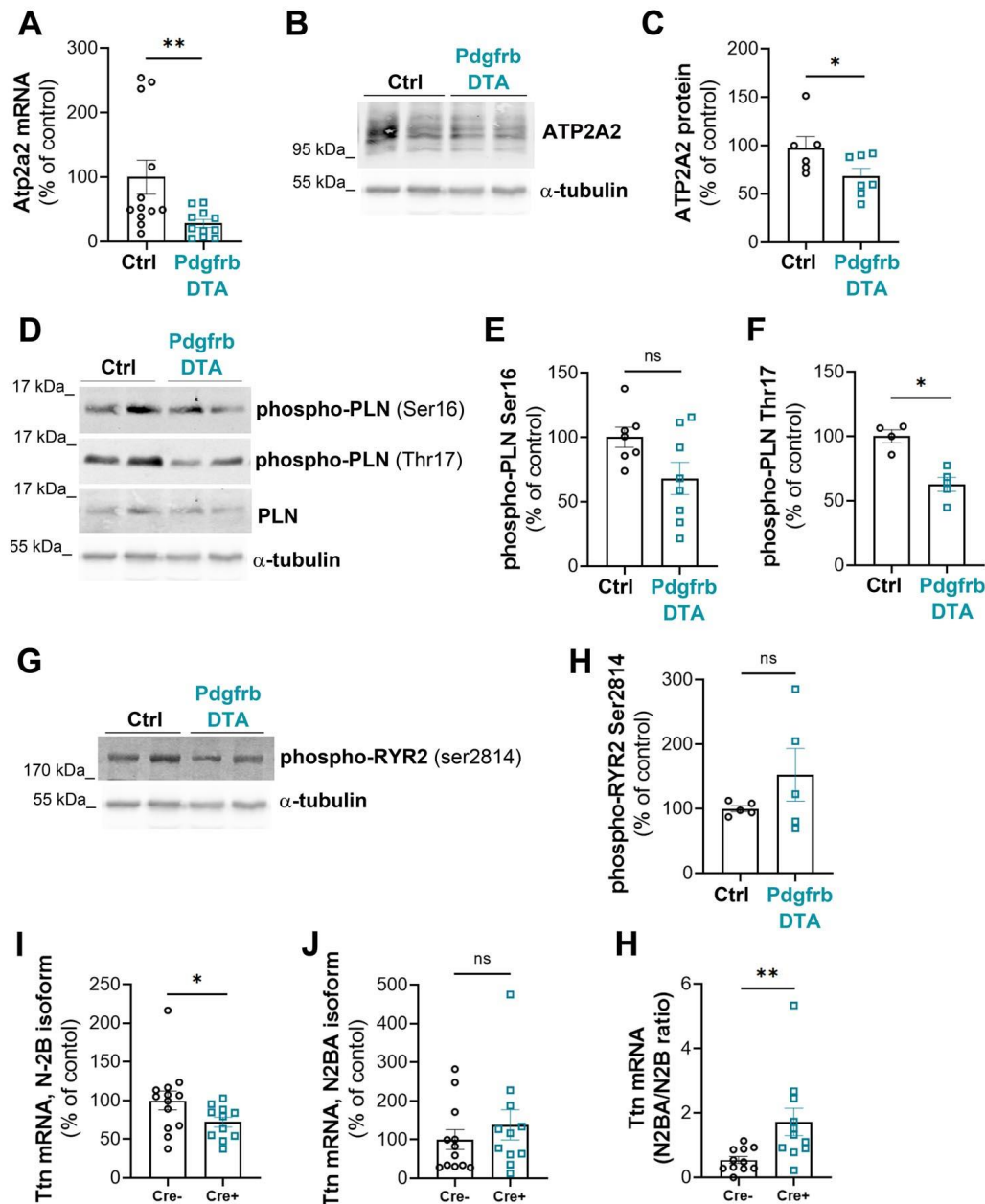


Figure 5: Pericyte depletion modifies Ca^{2+} homeostasis and Ttn splicing in cardiomyocytes. Pdgfrb-Cre/ERT2; RosaDTA (Pdgfrb-DTA) and RosaDTA (Control) mice were administered with tamoxifen. Mice were sacrificed 28 days after the first injection. **(A)** Atp2a2 mRNA expression was quantified by RT-qPCR in total heart extract and normalized to 18S rRNA (n=11 and 12). **(B)** ATP2A2 protein expression was analysed by western blot in total heart extract and **(C)** quantified using Image J software (n=7 and 6). **(D)** PLN phosphorylation was assessed by western blot analyses and **(E,F)** quantified using Image J software (n=5 to 8). **(G)** RYR2 phosphorylation was assessed by western blot analyses and **(H)** quantified using Image J software (n=5 in each group). Ttn, isoform N-2B **(I)** and N2BA **(J)** mRNA expression was quantified by RT-qPCR in total heart extract and normalized to 18S rRNA (n=11 and 12). **(H)** N2BA mRNA/N2B mRNA ratio was calculated. *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ns: not significant (Mann Whitney test).

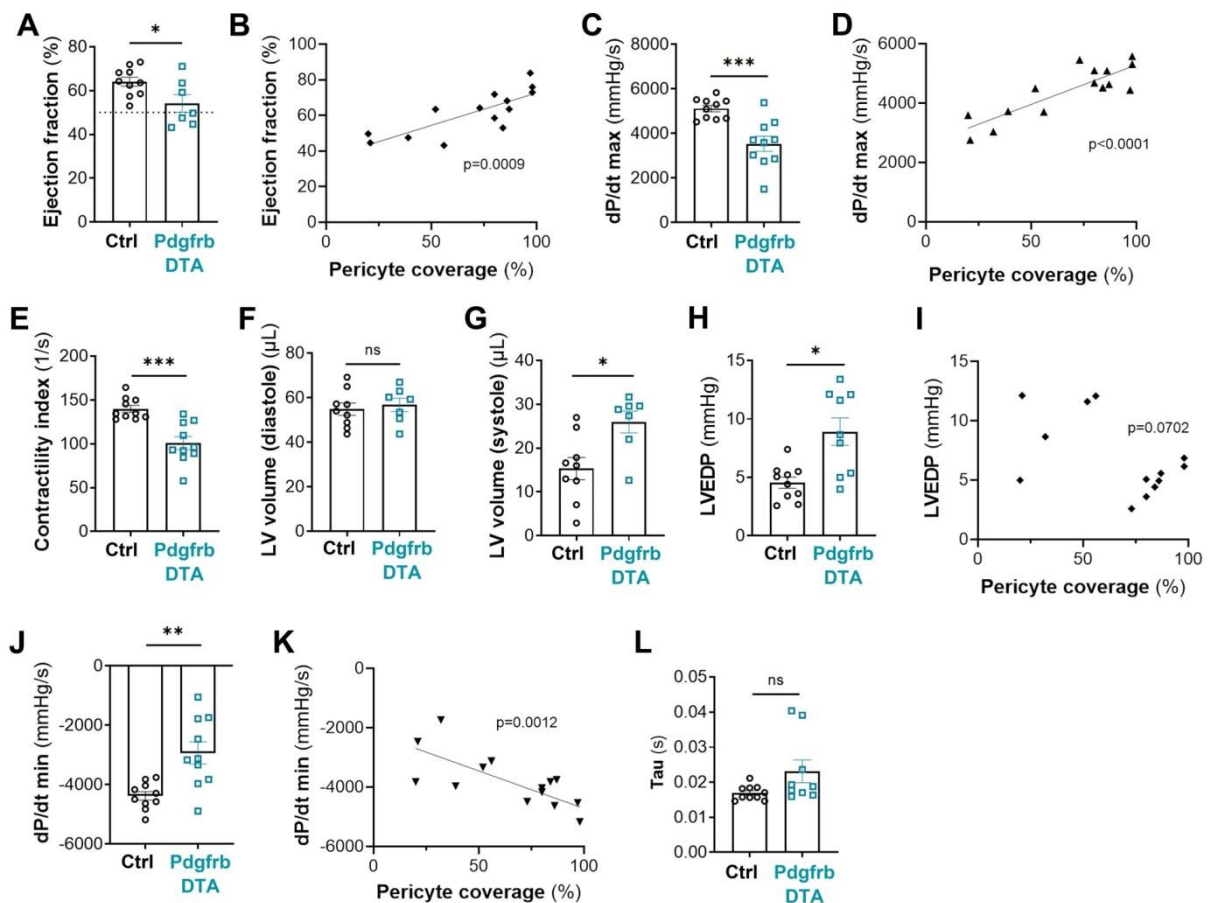


Figure 6: Pericyte depletion induces both systolic and diastolic dysfunction. Pdgfrb-Cre/ERT2; RosaDTA (Pdgfrb-DTA) and RosaDTA (Control) mice were administered with tamoxifen. Mice were sacrificed 28 days after the first injection. (A) Ejection fraction was assessed via echocardiography (n=7 and 10) and (B) correlated with pericyte coverage. (C) dP/dT max was measured by left ventricular catheterization (n=10 in each group) (D) correlated with pericyte coverage. (E) Contractility index was measured by left ventricular catheterization (n=10 in each group). LV volumes were measured in diastole (F) and systole (G) via echocardiography (n=7 and 10). (H) LV end diastolic pressure (EDP) was measured by left ventricular catheterization (n=10 in each group) (I) correlated with pericyte coverage. (J) dP/dT min was measured by left ventricular catheterization (n=10 in each group) (K) correlated with pericyte coverage. (L) Tau was measured by left ventricular catheterization (n=10 in each group). *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, ns: not significant (Mann Whitney test).

Supplementary data

Supplemental tables

A/ List of primary antibodies

Target antigen	Vendor or Source	Catalog #	Working concentration
mouse PECAM-1 (CD31)	BMA Biomedicals	T-2001	2 µg/mL
mouse PODXL	R&D systems	AF1556	4 µg/mL
mouse Cy3-anti-smα-actin	Sigma	C6198	5 µg/mL
mouse NG2	Chemicon	AB 5320	
mouse ACTN2	Sigma	A 2172	
mouse VIM	Cell signaling technology	5741	
mouse ICAM1 (CD54)	BD Pharmingen	550287	2.5 µg/mL
mouse VCAM1	Invitrogen	14-1061-82	
mouse CDH5	R&D systems	AF1002	
mouse FGB	Abcam	ab227063	
mouse COL1A1	Abcam	ab21285	
mouse CX43	Sigma	C6219	
mouse CD41	Proteintech	18308-1-AP	3.5 µg/mL
mouse Myh7	Atlas antibodies	HPA001239	1 µg/mL
mouse Desmin	DB Biotech	DB148-0.1	0.5 µg/mL
mouse CD45	BD Pharmingen	550539	0.625 µg/mL
mouse CD68	Biolegend	137001	5 µg/mL
mouse CD3	Santa-Cruz Biotechnology	sc-1127	
mouse B220	R&D systems	MAB1217	
GFP	Novus	NB100-1770SS	
GFP	Invitrogen	A6455	
mouse ATP2A2	Badrilla	A010-80	
phospho-PLN (Ser16)	Badrilla	A010-12	
phospho-PLN (Thr17)	Badrilla	A010-13	
total-PLN	Badrilla	A010-14	
phospho-RYR2 (Ser2814)	Badrilla	A010-31	
α-tubulin	Sigma	T5168	
human CDH5	Cell signaling technology	2500	
human ICAM1	Santa-Cruz Biotechnology	sc-8439	

B/ List of secondary antibodies

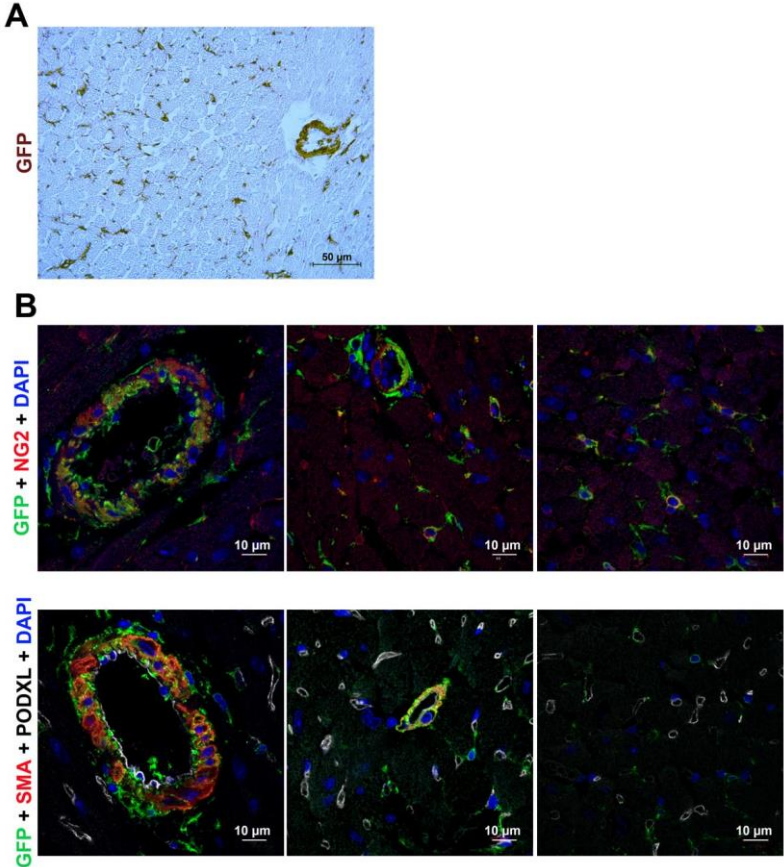
Target antigen	Conjugate	Vendor or Source	Catalog #	Working concentration
Rat IgG	Biotin	Jackson ImmunoResearch	712-065-153	Dilution 1/500
Rabbit	Biotin	Jackson ImmunoResearch	711-065-152	Dilution 1/500
Goat IgG	Alexa Fluor 568	Invitrogen	A-11057	10 µg/mL
Rat IgG	Alexa Fluor 647	Invitrogen	A-48265	10 µg/mL
Hamster IgG	Biotin	Jackson ImmunoResearch	127-065-160	Dilution 1/500
Goat IgG	Alexa Fluor 488	Invitrogen	A-11055	10 µg/mL
Rabbit IgG	Alexa Fluor 488	Invitrogen	A-21206	10 µg/mL
Rabbit IgG	Alexa Fluor 568	Invitrogen	A-10042	10 µg/mL

Supplemental Table 1: List of antibodies used for immunostainings

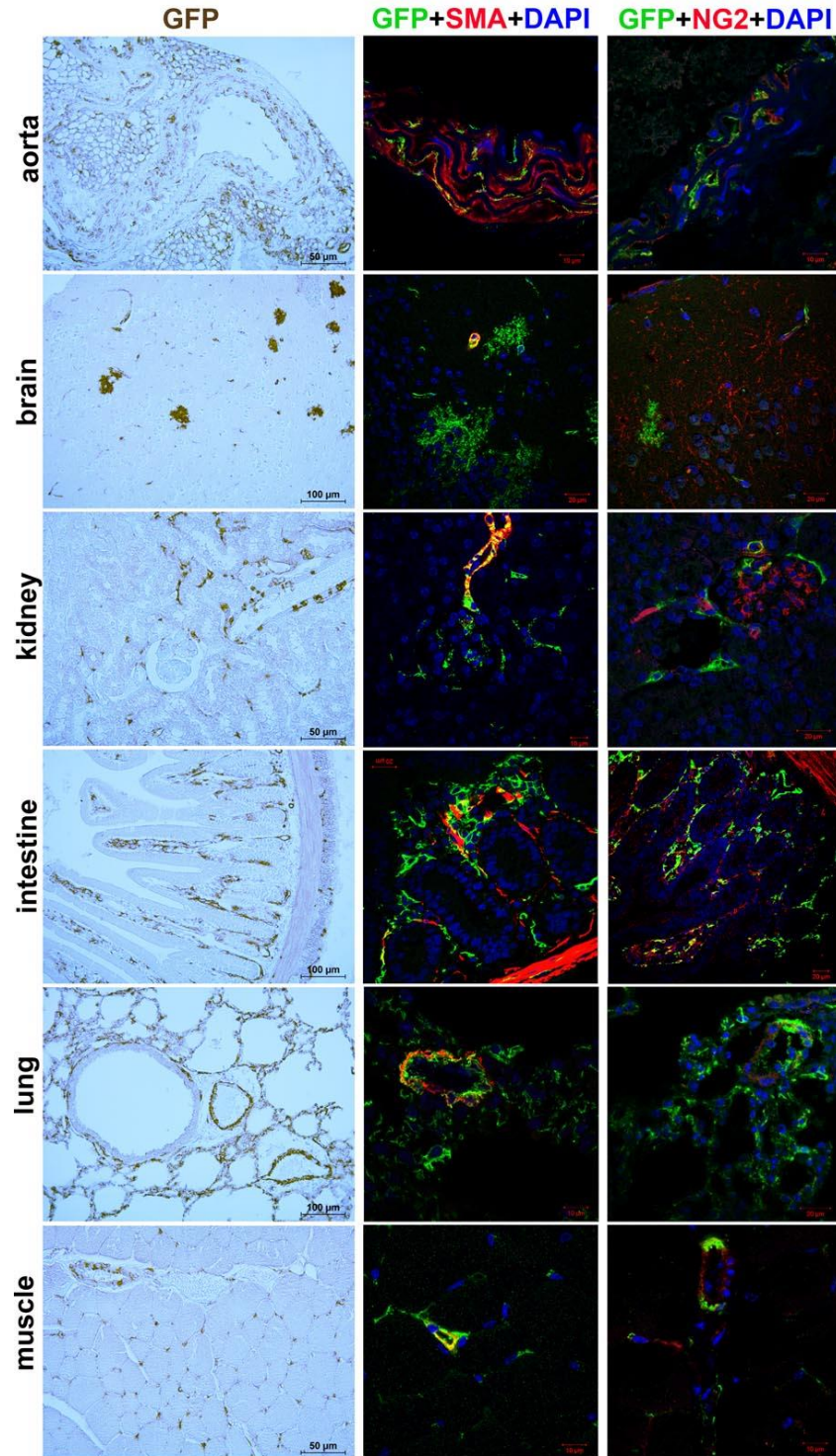
mouse 18S	F	5' -CGCGGTTCTATTTTGTGGT-3'
	R	5' -AGTCGGCATCGTTTATGGTC-3'
mouse Col1a1	F	5' -CAACCTCAAGAAGGCCCTGC-3'
	R	5' -TGTCCAAGGGAGCCACATCG-3'
mouse Col3a1	F	5' -AGCACGAGGTCTTGCTGGAC-3'
	R	5' -ACCAGCTGTACCAGGCTGAC-3'
mouse Tgfb1	F	5' -GCTAATGGTGGACCGCAACAAC-3'
	R	5' -CAC'TGC'TTCCGAATGTCTGAC-3'
mouse Myh7	F	5' -GGATGACGTCACCTCCAACA-3'
	R	5' -AGATCAGAGCCTCCTTCTCGT-3'
mouse Ctgf	F	5' -GACCCAACATATGATGCCGAGCC-3'
	R	5' -TCCCACAGGTCTTAGAACAGG-3'
mouse Ttn N-2B	F	5' -ACAGTGGGAAAGCAAAGACATC-3'
	R	5' -AGGTGGCCAGAGCTACTTC-3'
mouse Ttn N2BA	F	5' -GAGACATTGCTCCGCTTTTC-3'
	R	5' -GATCTCCAAAGAGGCTGTC-3'
mouse Atp2a2 (Serca2a)	F	5' -GATCCTCTACGTGGAACCTTTG-3'
	R	5' -GGTAGATGTGTTGCTAACAACG-3'
human ACTB (β -actin)	F	5' -GGAGGAGCTGGAAGCAGCC-3'
	R	5' -GCTGTGCTACGTCGCCCTG-3'
human ICAM1	F	5' -ACGCCGGAGGACAGGGCATT-3'
	R	5' -GGGGCTATGTC'TCCCCACCA-3'
human VCAM1	F	5' -GGCCCAGTTGAAGGATGCGGG-3'
	R	5' -AGAGCACGAGAAGCTCAGGAGAA-3'
human CDH2	F	5' -CCGGTTTCATTTGAGGGCAC-3'
	R	5' -CCCAT'TGAGGGCAT'TGGGAT-3'
human IL-6	F	5' -GAAGAT'TCCAAAGATGTAGCCGC-3'
	R	5' - GGTGTTTTCTGCCAGTGCCTC-3'

Supplemental Table 2: List of primers used for reverse transcription (RT) quantitative polymer chain reaction (qPCR). F: forward; R: reverse

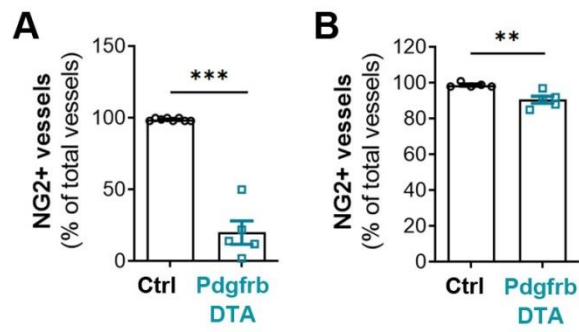
Supplemental figures and figure legends



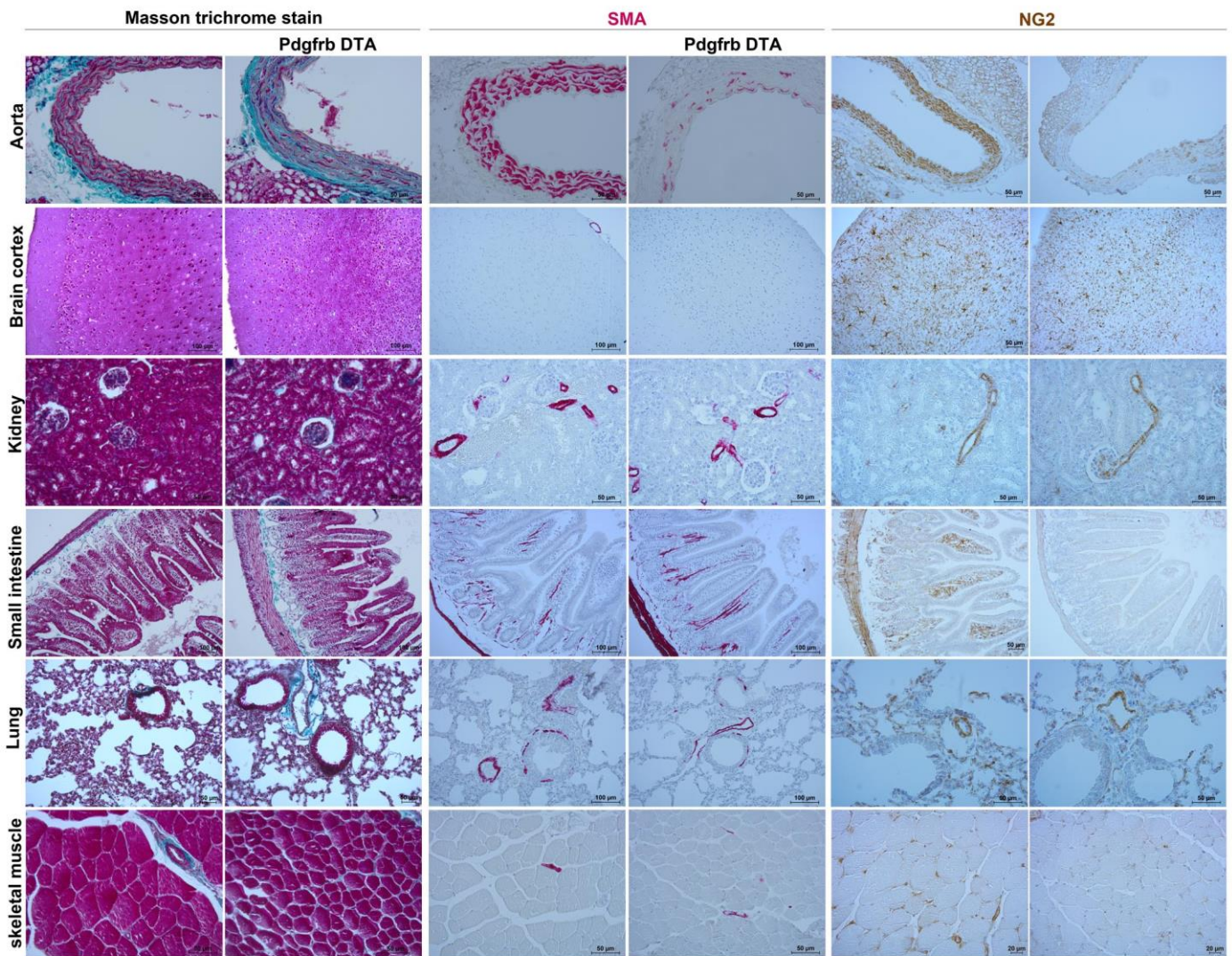
Supplemental Figure 1: (A-B): *Pdgfrb-Cre/ERT2; Rosa-mTmG* mice were administered with tamoxifen and sacrificed 7 days after the first injection. **(A)** Heart cross sections were immunostained with anti-GFP antibodies (in brown). **(B)** Heart cross sections were co-immunostained with anti-GFP antibodies (in green) together with anti-NG2 antibodies (in red) to identify pericytes or anti-SMA (in red) and anti-PODXL antibodies (in white) to identify SMCs and endothelial cells respectively.



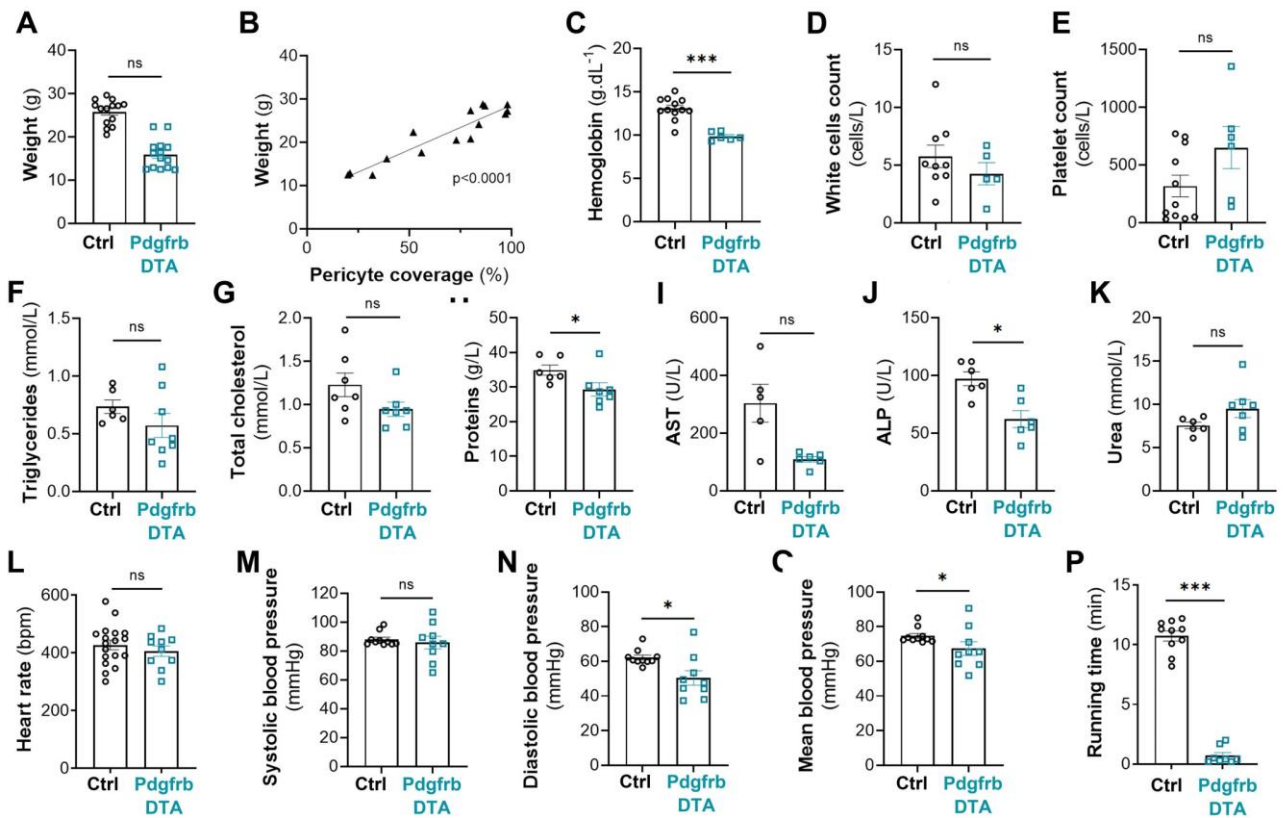
Supplemental Figure 2: *Pdgfrb-Cre/ERT2*; *Rosa-mTmG* mice were administered with tamoxifen and sacrificed 7 days after the first injection. (A) Tissue sections were immunostained with anti-GFP antibodies alone or together with anti-SMA antibodies to identify SMCs or anti-NG2 antibodies to identify pericytes.



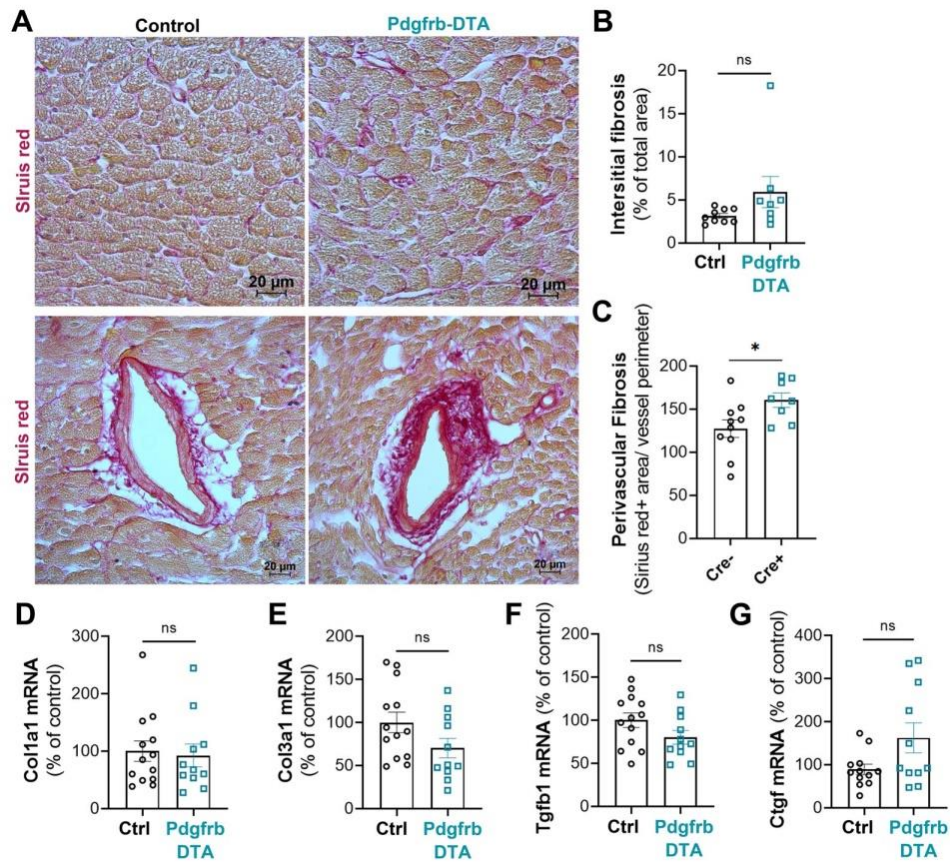
Supplemental Figure 3: Pdgrfb-Cre/ERT2; RosaDTA (Pdgrfb-DTA) mice were administered with tamoxifen. Mice were sacrificed 7 days (**A**) or 28 days after the first injection (**B**). Heart cross sections were co-immunostained with anti-NG2 antibodies (in red) together with anti-PODXL antibodies (in green), the percentage of NG2 positive vessel was counted. **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$ (Mann Whitney test).



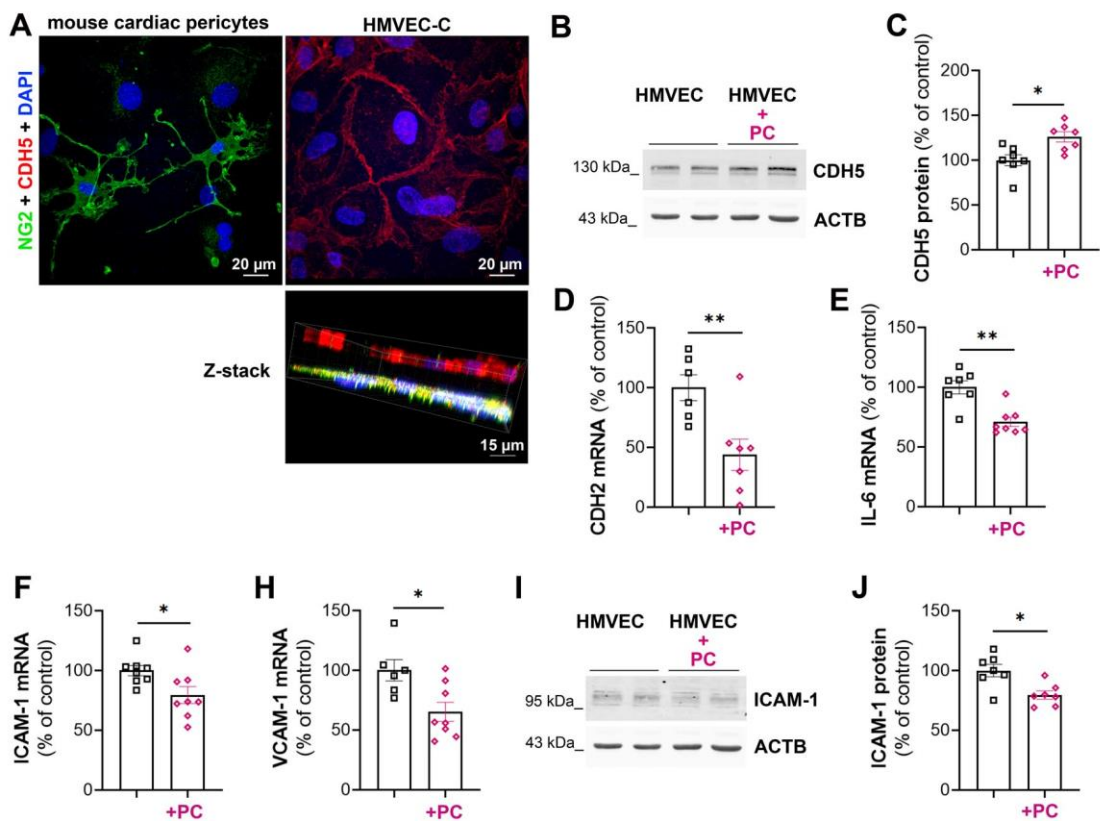
Supplemental Figure 4: Pdgfrb-Cre/ERT2; RosaDTA (Pdgfrb-DTA) mice were administered with tamoxifen and sacrificed 28 days after the first injection. Tissues sections were staining with Masson's trichrome stain, anti-SMA or anti-NG2 antibodies.



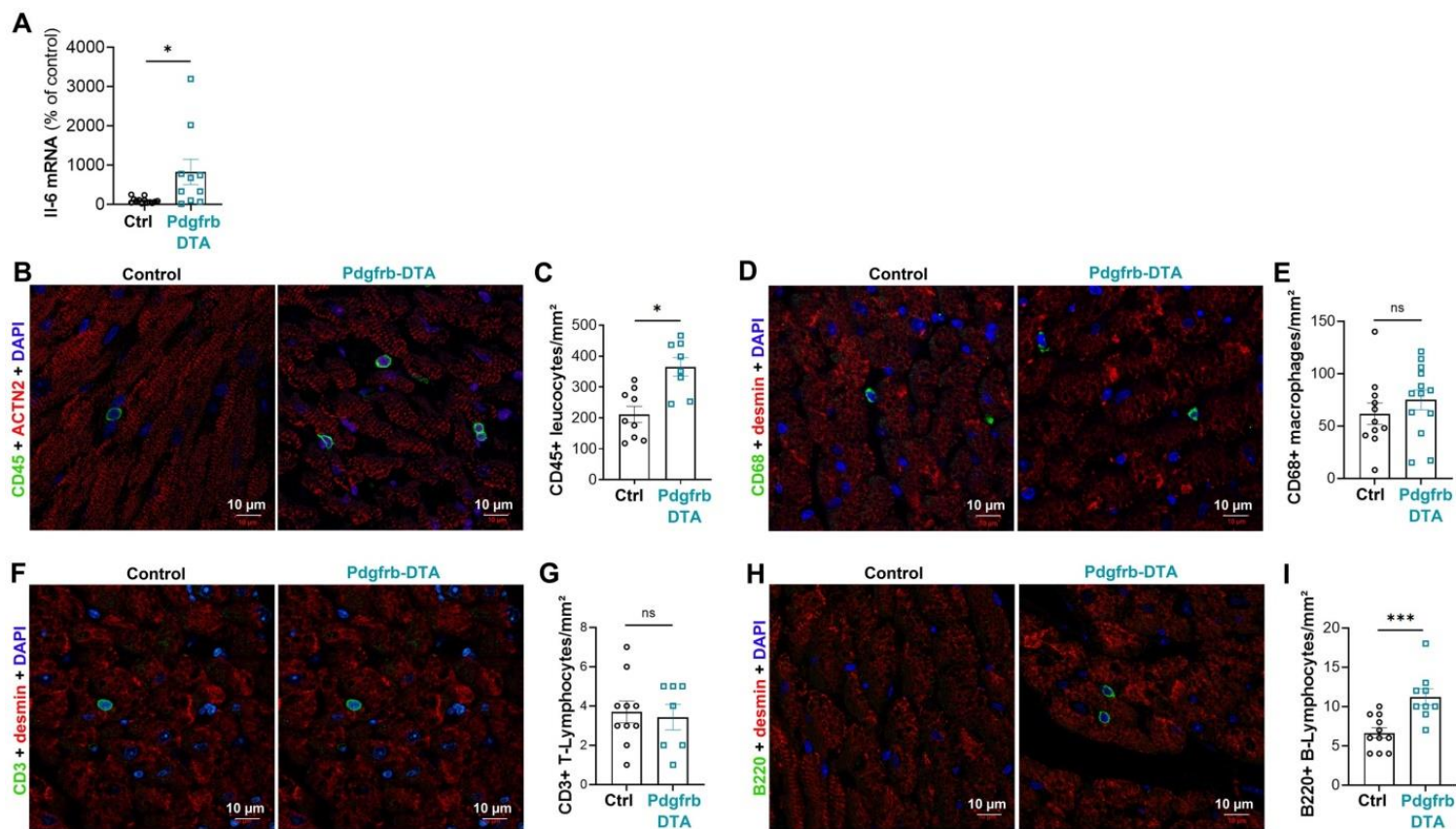
Supplemental Figure 5: Pdgfrb-Cre/ERT2; RosaDTA (Pdgfrb-DTA) and RosaDTA (Control) mice were administered with tamoxifen. Mice were sacrificed 28 days after the first injection. (A) The weight of mice was measured and (B) correlated with pericyte coverage. (C) Hemoglobin content, (D) white blood cells count and platelet count (E) was calculated in total blood samples. (F) Triglycerides, (G) total cholesterol, (H) proteins, (I) Aspartate aminotransferase (AST), (J) Alkaline phosphatase (ALP) and (K) urea levels were measured in plasma samples. (L) Heart rate, (M) systolic, (N) diastolic and (O) mean blood pressures were measured via left ventricular catheterization. (P) Exercise tolerance on a treadmill was assessed. *: $p \leq 0.05$, ***: $p \leq 0.001$, ns: not significant (Mann Whitney test).



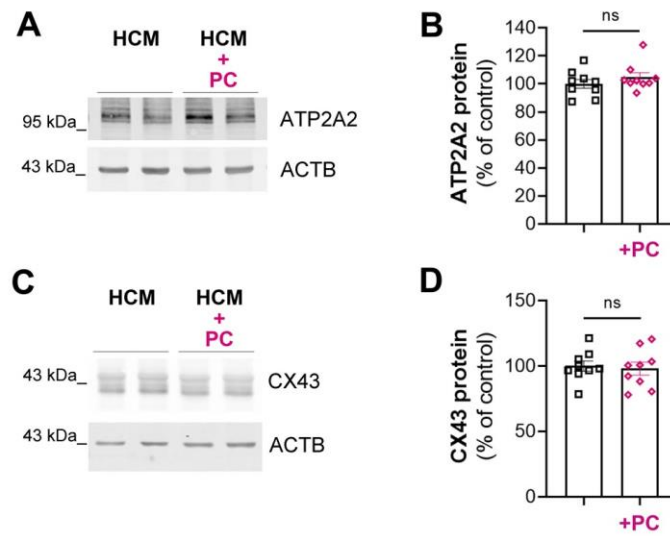
Supplemental Figure 6: Pdgfrb-Cre/ERT2; RosaDTA (Pdgfrb-DTA) and RosaDTA (Control) mice were administered with tamoxifen. Mice were sacrificed 28 days after the first injection. **(A)** Heart cross sections were stained with Sirius red to identify fibrosis. **(B)** Interstitial fibrosis was quantified using Image J software (n=9 and 11). **(C)** Perivascular fibrosis was quantified using Image J software (n=9 and 11). Col1a1 **(D)**, Col3a1 **(E)**, Tgfb1 **(F)** and Ctgf **(G)** mRNA was quantified by RT-qPCR in total heart extracts and normalized to 18S rRNA. *: $p \leq 0.05$, ns: not significant (Mann Whitney test).



Supplemental Figure 7: Cardiac HMVECs were co-cultured or not with mouse cardiac pericyte. Each cell type was plated on each side of a 0.4 μ m pored Transwell[®] membrane for 48 hours. **(A)** Pericytes were immunostained with anti-NG2 antibodies in green, HMVECs were immunostained with anti-CDH5 antibodies in red. **(B)** CDH5 protein level in HMVECs was evaluated via western blot analysis and **(C)** quantified using Image J software. *CDH2* **(D)**, *IL-6* **(E)**, *ICAM1* **(F)** and *VCAM1* **(H)** mRNA levels were quantified via RT-qPCR and normalized to *ACTB* mRNA. **(I)** ICAM1 protein level in HMVECs was evaluated via western blot analysis and **(J)** quantified using Image J software. *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$ (Mann Whitney test).



Supplemental Figure 8: Pdgfrb-Cre/ERT2; RosaDTA (Pdgfrb-DTA) and RosaDTA (Control) mice were administered with tamoxifen. Mice were sacrificed 28 days after the first injection. **(A)** *Il-6* mRNA level was quantified via RT-qPCR and normalized to 18S rRNA. **(B)** Heart cross sections were co-immunostained with anti-CD45 antibodies (in green) and anti-ACTN2 antibodies (in red). **(C)** The number of CD45 positive leucocytes/mm² was quantified using Image J software. **(D)** Heart cross sections were co-immunostained with anti-CD68 antibodies (in green) and anti-desmin antibodies (in red). **(E)** The number of CD68 positive macrophages/mm² was quantified using Image J software. **(F)** Heart cross sections were co-immunostained with anti-CD3 antibodies (in green) and anti-desmin antibodies (in red). **(G)** The number of CD3 positive T-lymphocytes/mm² was quantified using Image J software. **(H)** Heart cross sections were co-immunostained with anti-B220 antibodies (in green) and anti-desmin antibodies (in red). **(I)** The number of B220 positive B-lymphocytes/mm² was quantified using Image J software. *: $p \leq 0.05$, ***: $p \leq 0.001$, ns: not significant (Mann Whitney test).



Supplemental Figure 9: Human cardiac myocyte (HCM) were co-cultured or not with mouse cardiac pericytes. Each cell type was plated on each side of a 0.4 μm pored Transwell[®] membrane for 48 hours. **(A)** ATP2A2 protein level in HCMs was evaluated via western blot analysis and **(B)** quantified using Image J software. **(C)** CX43 protein level in HCMs was evaluated via western blot analysis and **(D)** quantified using Image J software. ns: not significant (Mann Whitney test).

II. Rôle des cellules endothéliales

L'ICFep est une pathologie complexe multifactorielle et la dysfonction endothéliale est proposée comme mécanisme central de son développement. Les patients atteints d'ICFep présentent une fonction vasculaire altérée avec notamment une expression accrue des molécules d'adhésion et un défaut de vasomotricité. Cette dysfonction microvasculaire entraînerait la dysfonction diastolique retrouvée dans l'ICFep notamment via une rigidité myocardique et via une hypertrophie ventriculaire. Cependant, les preuves du rôle central des CE dans la physiopathologie de l'ICFep restent minces. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier le rôle des cellules endothéliales et plus précisément l'impact de la dysfonction endothéliale sur le développement de la dysfonction diastolique associée à l'ICFep dans un modèle murin. Nous avons donc mis en place le modèle murin HFD+L-NAME. De plus, la microvasculature cardiaque n'avait pas encore été décrite dans ce modèle.

A. Dimorphisme sexuel

Pour déterminer l'impact du sexe dans le développement de la pathologie, nous avons caractérisé, dans le modèle HFD+L-NAME, le phénotype cardiaque et le phénotype des vaisseaux chez les mâles, les femelles et les femelles ovariectomisées. Les femelles non ovariectomisées ne présentent pas de dysfonction cardiaque tandis que les souris ovariectomisées HFD+L-NAME développent une dysfonction diastolique avec augmentation de la pression télédiastolique et de la relaxation associée à un remodelage cardiaque avec hypertrophie et fibrose. Quant aux mâles, ils développent une dysfonction cardiaque sans remodelage du myocarde ni inflammation. Au niveau microvasculaire, le régime entraîne une dysfonction endothéliale caractérisée par une activation endothéliale avec expression augmentée d'ICAM1, une augmentation de l'infiltration de leucocytes et de macrophages, une vasoconstriction artériolaire ainsi qu'une extravasation de fibrinogène et d'albumine chez les femelles, mais pas chez les mâles. Ces résultats confirment l'association entre dysfonction diastolique et dysfonction endothéliale retrouvée chez les patients atteints d'ICFep. Ces données suggèrent également le rôle important des hormones sexuelles dans les pathologies cardiovasculaires et notamment l'ICFep.

B. Prévenir la dysfonction endothéliale et l'inflammation ne prévient pas la dysfonction diastolique dans le modèle HFD+L-NAME

Pour mettre en évidence le rôle de la dysfonction endothéliale dans l'installation de la dysfonction diastolique dans le modèle HFD+L-NAME, nous avons utilisé un modèle d'endothélium dit préservé : les souris *Cdon*^{ECKO}. Bloquer *Cdon* dans les CE des souris HFD+L-NAME permet de prévenir la dysfonction endothéliale en diminuant l'activation endothéliale, l'infiltration de cellules inflammatoires, l'augmentation de la perméabilité et en empêchant la vasoconstriction.

Après phénotypage de l'endothélium, nous avons caractérisé la fonction cardiaque de ces souris afin de savoir si elles développent une dysfonction diastolique. La dysfonction diastolique n'est pas

prévenue dans le modèle *Cdon*^{ECKO} HFD+L-NAME. Les souris présentent, en effet, une pression télédiastolique élevée ainsi qu'une hypertrophie et une fibrose cardiaque. La dysfonction endothéliale, notamment la perméabilité et l'activation endothéliales accrues, ne participe donc pas à l'apparition de la dysfonction diastolique.

Ainsi, prévenir la dysfonction endothéliale ne suffit pas à prévenir la dysfonction diastolique. Il existerait donc d'autres mécanismes, en plus de la dysfonction microvasculaire, capables de provoquer la dysfonction diastolique et ceux-ci pourraient jouer un rôle dans le développement de la fibrose et de l'hypertrophie cardiaques.

L'inflammation ne participe pas non plus à l'apparition de la dysfonction diastolique puisque quand nous avons traité nos souris HFD+L-NAME avec de la colchicine, le traitement anti-inflammatoire a prévenu la dysfonction endothéliale, mais les souris avaient toujours une pression télédiastolique augmentée et une relaxation altérée. La colchicine a eu les mêmes effets sur le modèle HFD+L-NAME que la délétion endothéliale de *Cdon* et confirme nos précédents résultats.

C. Conclusion

Nos résultats révèlent que ni l'activation de l'endothélium ni la perméabilité vasculaire ne participent à la physiopathologie de l'ICFep dans le modèle HFD+L-NAME. Par ailleurs, nos travaux démontrent l'importance du sexe dans le développement de la maladie.

Full title

Increased endothelium activation and leakage do not promote diastolic dysfunction in the mouse model of HFpEF triggered by a high fat diet + L-NAME combination treatment.

Authors' names, academic degrees, and affiliations

Lauriane Cornuault, MS¹, Pierre Mora, PharmD¹, Paul Rouault, MS¹, Ninon Foussard, MD¹, Candice Chapouly, PharmD, PhD¹, Pilippe Alzieu, BS¹, Alain-Pierre Gadeau, PhD¹, Thierry Couffinhal, MD, PhD¹ and Marie-Ange Renault, PhD¹.

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

Running title

Increased endothelium activation and leakage does not promote HFpEF

Name, email address, and complete address of corresponding author

Marie-Ange Renault

marie-ange.renault@inserm.fr

Inserm U1034

1, avenue de Magellan

Entrée par l'Hôpital Haut-Lévêque

33604 Pessac

France

Tel: (33) 5 57 89 19 79

Abstract

Introduction: Coronary microvascular disease has been proposed to be responsible for heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) about 10 years ago. However, to date the role and phenotype of the coronary microvasculature has still been poorly considered and investigated in animal models of HFpEF. **Objective:** To determine whether endothelial dysfunction participates in the development of diastolic dysfunction in the mouse model of HFpEF triggered by a high fat diet (HFD) + L-NAME regimen. **Methods and results:** At first, we thoroughly phenotyped the coronary microvasculature in this model in male, female and ovariectomized (OVX) female mice considering the sexual dimorphism associated with this disease. We found that both OVX and non OVX females but not males display increased endothelial activation, leakage, and arteriole constriction upon the HFD + L-NAME regimen while both male and OVX females but not non OVX females develop diastolic dysfunction. With the aim to investigate the role of endothelial dysfunction in the pathophysiology of diastolic dysfunction in OVX female mice, we used Cdon deficient mice. Indeed, we previously demonstrated that endothelium integrity, upon inflammatory conditions, is preserved in these mice. Both OVX Cdh5-Cre/ERT2-Cdon^{Flox/Flox} (Cdon^{ECKO}) and Cdon^{Flox/Flox} (Ctrl) female mice were fed with the HFD + L-NAME regimen to induced diastolic dysfunction. Cardiac function was assessed via echocardiography and left ventricle catheterization 10 weeks later. Immediately after, mice were sacrificed for histological and gene expression analyses. As expected, Cdon^{ECKO} mice displayed improved endothelium integrity i.e. decreased endothelium permeability, decreased ICAM1 expression and decreased infiltration of CD45+ leukocytes in comparison to control mice. However, Cdon^{ECKO} mice displayed cardiac hypertrophy, cardiac fibrosis and increased end diastolic pressure just like control mice. Furthermore, we found that cardiac inflammation does not participate in the pathophysiology of HFpEF either by treating OVX female mice with colchicine. **Conclusion:** Improving endothelial dysfunction or cardiac inflammation does not prevent the occurrence of diastolic dysfunction in mice exposed to HFD+L-NAME supporting that small vessel disease is not the only key player in the pathophysiology of HFpEF.

Keywords

Heart failure, diastolic dysfunction, microvessels, cardiac remodeling, sexual dimorphism

INTRODUCTION

A significant proportion of patients with clinical syndrome of heart failure (HF) happen to have a normal left ventricular ejection fraction (EF) referred to as heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) as opposed to patients with reduced ejection fraction (HFrEF). HFpEF is characterized by increased arterial and myocardial stiffness and decreased left ventricular (LV) relaxation which causes increased LV end-diastolic pressure with impaired LV filling. This diastolic dysfunction is associated with abnormal ventricular-arterial coupling, pulmonary hypertension, chronotropic incompetence and cardiac reserve dysfunction (Zhou, Zhu, et Zeng 2021). Notably, HFpEF now accounts for more than 50% of all HF patients and has turned into the most common HF phenotype (Tsao et al. 2018). However, in contrast to HFrEF, where significant advances in understanding etiologies and mechanisms have been made, HFpEF pathophysiology is still poorly understood (Lyle et Brozovich 2018). HFpEF patients are generally older, more often females, with a high prevalence of cardiovascular and non-cardiovascular comorbidities, such as obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, hypertension, atrial fibrillation or renal dysfunction (Groenewegen et al. 2020). At molecular and cellular level, HFpEF has been associated with cardiac fibrosis, cardiomyocyte hypertrophy and stiffness, microvascular dysfunction, inflammation, decreased bioavailability of nitric oxide (NO) and oxidative stress (Zhou, Zhu, et Zeng 2021). In 2013, based on the reasoning that vascular and microvascular dysfunction is highly prevalent in HFpEF patients, WJ Paulus and C Tschöpe proposed the following paradigm: cardiovascular risk factors would lead to a systemic low-grade inflammation triggering endothelial cells (EC) dysfunction which would in turn be responsible for cardiac wall stiffening and diastolic dysfunction (W. J. Paulus et Tschöpe 2013). Over the last decades, the causal role of EC dysfunction has been supported by preclinical studies in which conditional knock out (KO) rodents have been used to demonstrate that modification of EC properties is sufficient to promote diastolic dysfunction. This is the case of Sirtuin 3 (X. He et al. 2017) (Zeng, He, et Chen 2020) or Sirtuin 1 (Maizel et al. 2014) disruption and β 3-Adrenergic Receptor (Dhot et al. 2020) or PDZ Domain Containing Ring Finger 3 (Abelanet et al. 2022) overexpression in ECs.

However, it is still actually not known whether EC dysfunction is responsible for diastolic dysfunction in patients or animal models with HFpEF (Cornuault et al. 2022). Notably, WJ Paulus's group proposed that decreased NOS3 activity in ECs would decrease NO available to activate soluble guanylate cyclase (sGC) in cardiomyocyte leading to decreased cGMP production, protein kinase cGMP-dependent 1 (PRKG1) activity and subsequently Titin phosphorylation, ultimately leading to cardiomyocyte stiffening (W. J. Paulus et Tschöpe 2013). However, the negative results of clinical trials aiming at restoring NO/sGC/cGMP signaling in HFpEF patients suggest that this pathway may not have a central role in the pathophysiology of HFpEF (Cornuault et al. 2022). Importantly, endothelial dysfunction does not only design endothelium-dependent vasodilation but any detrimental modification of the endothelial phenotype too. Notably, it also designs impaired endothelial barrier properties, endothelial activation, impaired endothelial paracrine activity and impaired endothelial or quiescence.

Therefore in this study, we further explored the phenotype of the cardiac microvasculature in the 2-hit model of HFpEF developed by Schiattarella G et al (Schiattarella et al. 2019) in which diastolic

dysfunction is induced by a high fat diet associated with a L-NAME treatment. The sexual dimorphism possibly associated with HFpEF was considered in this study by testing males, females and ovariectomized females. We also tested whether endothelial dysfunction, especially abnormal endothelial activation and permeability, participates in the development of diastolic dysfunction in ovariectomized female mice using endothelial specific cell adhesion associated, oncogene regulated (*Cdon*) deficient mice.

METHODS

Mice

C57BL/6J mice were obtained from Charles River laboratories and bred in our animal facility.

Cdon floxed (*Cdon*^{tm1c(EUCOMM)Hmgu}) (*Cdon*^{Flox}) (Chapouly et al. 2020) mice were created at the Institut Clinique de la Souris through the International Mouse Phenotyping Consortium from a vector generated by the European conditional mice mutagenesis program, EUCOMM. *Cdon* floxed mice were generated under a C57BL/6N background and backcrossed at least 6 times with C57BL/6J mice before they were used in any experiment.

Tg(*Cdh5-cre/ERT2*)1Rha, (*Cdh5-Cre/ERT2*) mice (Azzoni et al. 2014) which were a gift from RH. Adams, were maintained under a C57BL/6J background.

Cdh5-Cre/ERT2 mice were genotyped using the following primers: 5'-TAAAGATATCTCACGTACTGACGGTG-3' and 5'-TCTCTGACCAGAGTCATCCTTAGC-3' that amplify 300 bp of the Cre recombinase sequence. *Cdon* floxed mice were genotyped using the following primers: 5'-CTTCCCAGAGGGTGTGAGAGCAATG-3' and 5'-GAACCAGTAGCATGCATGATGCTGG-3' which amplifies a 385 bp fragment of the WT allele or a 494 bp fragment if the allele is floxed.

The Cre recombinase in *Cdh5-Cre/ERT2* mice was activated by intraperitoneal injection of 1 mg tamoxifen (Sigma-Aldrich) for 5 consecutive days at 8 weeks of age. To induce Cre, tamoxifen is injected IP 1 mg/mL 5 consecutive days at 8 weeks of age. Successful and specific activation of the Cre recombinase have been verified before (Chapouly et al. 2020).

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

Ovariectomy

Bilateral ovariectomy was performed at 7-8 weeks of age after anesthesia with 3% isoflurane. To minimize pain caused by the surgery, mice were subcutaneously administered 0.1 mg/kg buprenorphine 30 min before surgery.

HFD regimen/L-NAME treatment

Mice either had unrestricted access to a high fat diet containing 60% of the energy from fat (butter) (SAFE® 260 HF) for 12 weeks or were fed with regular chow diet (SAFE® A04).

L-NAME (Sigma Aldrich) was supplied in the drinking water at 1 mg/L concentration 4 days/7 for 10 weeks.

Treadmill Exercise Exhaustion Test

Before treadmill experiments, mice were accustomed to handling to reduce anxiety. Then, animals were familiarized with running on the treadmill (6-lane treadmill, UGO BASILE S.R.L, Italy) for 3 days: on the first day, mice trained for 12 minutes running sessions, gradually increasing the speed to a maximum of 18 m/minutes at a 10° inclination. On the second and the third days, mice were trained for 18 minutes running sessions gradually increasing the speed to a maximum of 24m/minutes at a 10° inclination. After 3 days of treadmill exercise training, exhaustion and fatigue tests were carried out. After 4 minutes of warm up at a speed of 5m/minutes with a slope fixed at 10° inclination, the speed was increased to 14 m/minutes for 2 minutes. The test consisted of a run with incrementally increased speed up to a maximum of 32 m/minutes: every 2 minutes the speed was increased by 2 m/minutes until the animals were exhausted. Exhaustion was defined when mice were unable to maintain the pace and spent 10 consecutive seconds in the “fatigue zone.” Therefore, mice were considered exhausted when they remained in the lower part of the treadmill (last third) for 10 seconds. The running time was measured.

Echocardiography

Left ventricular EF and LV dimension were measured on a high-resolution echocardiographic system equipped with a 30-MHz mechanical transducer (VEVO 2100, VisualSonics Inc) as previously described (M. A. Renault et al. 2009; Roncalli et al. 2011). Mice were anesthetized using 2% oxygenated isoflurane by inhalation. Mice were anchored to a warming platform in a supine position, limbs were taped to the echocardiograph electrodes, and chests were shaved and cleaned with a chemical hair remover to minimize ultrasound attenuation. UNI’GEL ECG (Asept Inmed), from which all air bubbles had been expelled, was applied to the thorax to optimize the visibility of the cardiac chambers. EF was evaluated by planimetry as recommended (Schiller et al. 1989). Two-dimensional, parasternal long-axis, and short-axis views were acquired, and the endocardial area of each frame was calculated by tracing the endocardial limits in the long-axis view, then the minimal and maximal areas were used to determine the left ventricular end-systolic and end-diastolic volumes, respectively. The system software uses a formula based on a cylindrical- hemi ellipsoid model ($\text{volume} = \frac{8 \times \text{area}^2}{3\pi / \text{length}}$). The left ventricular EF was derived from the following formula: $(\text{end-diastolic volume} - \text{end-systolic volume}) / \text{end-diastolic volume} \times 100$. The cardiac wall thickness, LV posterior wall, interventricular septum, and LV internal diameter were calculated by tracing wall limits in both the long and short axis views.

LV Pressure/Systolic Blood Pressure Measurement

LV diastolic pressure measurement was assessed via invasive catheterization technique. The mice were anesthetized with 2% isoflurane. A Scisense pressure catheter (Transonic) was inserted into the LV

through the common carotid artery. Pressure was recorded using LabChart software. End-diastolic pressure, dP/dt minimum and maximum, Tau, and heart rate were automatically calculated by a curve fit through end-systolic and end-diastolic points on the pressure plot.

Blood sampling for biochemical marker analysis/NFS

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

Lung and heart Edema Assessment

To assess water content, the whole lung and heart were weighed immediately after being harvested (wet weight) and then dried for 7 days in an oven at 60 °C (dry weight). Tissue edema was quantified by calculating percentage of water content.

Immunostaining

Prior to harvest, the heart was perfused with 8 g/L containing NaCl 0.9% to stop the heart in diastole, it was then fixed with methanol, paraffin-embedded and cut into 7 µm thick sections. Alternatively, heart was fresh frozen in OCT and then cut into 7 µm thick sections.

Capillary density was evaluated in sections stained with anti-CD31 or anti-Podocalyxin (PODXL) antibodies by quantifying the number of CD31+ or PODXL+ elements. Muscularized vessels were identified using anti- α -smooth muscle actin (SMA) antibodies. Leucocyte, macrophage, T-cell and B-cell infiltrations were quantified using anti-CD45, anti-CD68, anti-CD3 and anti-B220 antibodies, respectively. Endothelial adherens junction was characterized using anti-CDH5 antibodies. Edema was measured after FGB staining of muscle sections and quantified as the mean FGB-positive areas. Endothelial activation was identified using anti-ICAM1 and anti-VCAM1 antibodies and quantified as the % of ICAM1 and VCAM1 positive area respectively. Thrombi were identified using anti-CD41 antibodies and quantified as the number of CD41+ elements. (See Supplemental table 1 for antibody references.)

The cardiomyocyte mean surface area was measured using ImageJ software after membrane staining with Wheat Germ Agglutinin (WGA), Alexa Fluor™ 488 Conjugate (Invitrogen). Fibrosis was assessed

either after sirius red staining or type I collagen (COL1A1) staining of heart sections by quantifying the percentage of red stained area.

Quantifications were done on images acquired with an Axiozoom V16 or Axioscope A1 (Zeiss) under 200x magnification. They were conducted on 10 randomly selected images, with each receiving a unique number, and performed using ImageJ/Fiji v2.0.0-rc-59 software (National Institute of Health, USA) by an investigator blinded to genotype. At the end of the experiment, the genotype/treatment for each sample was revealed to enable data analysis.

For immunohistochemical analyses, primary antibodies were sequentially coupled with biotin-conjugated secondary antibodies and streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) complex (Amersham). Staining was performed with a DAB substrate kit (Vector Laboratories) and tissue sections were counterstained with hematoxylin (see Supplemental table 2 for secondary antibody references).

For immunofluorescence analyses, primary antibodies were resolved with Alexa-Fluor–conjugated secondary polyclonal antibodies (see Supplemental table 2). Nuclei were counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

For both immunohistochemical and immunofluorescence analyses, negative control experiments to check for antibody specificity were performed using secondary antibodies.

Representative confocal images were taken with a ZEISS LSM 700 scanning confocal microscope (Carl Zeiss, Germany).

Quantitative RT-PCR

RNA was isolated using Tri Reagent (Molecular Research Center Inc) as instructed by the manufacturer, from heart tissue that had been snap-frozen in liquid nitrogen and homogenized. For quantitative real time-polymerase chain reaction (PCR) analyses, total RNA was reverse transcribed with M-MLV reverse transcriptase (Promega), and amplification was performed on an AriaMx Real Time PCR system (Agilent Technologies) using B-R SYBER Green SuperMix (Quanta Biosciences). Primer sequences are reported in Supplemental table 3.

The relative expression of each mRNA was calculated by the comparative threshold cycle method and normalized to b-actin rRNA expression.

Western Blot Analysis

ATP2A2 protein level was evaluated by SDS PAGE using rabbit anti-ATP2A2 antibodies (Badrilla, Cat# A010-80). PLN phosphorylation at Serine 16 and Threonin 17 was evaluated by SDS PAGE using rabbit anti-phospho-PLN Ser16 (Badrilla, Cat# A010-12), rabbit anti-phospho-PLN Thr17 (Badrilla, Cat# A010-13) and mouse anti-total PLN (Badrilla, Cat# A010-14). RYR2 phosphorylation was evaluated by SDS PAGE using rabbit anti-phosphoRYR2 antibodies (Badrilla, Cat# A010-31).

Protein loading quantity was controlled using mouse monoclonal anti- α -tubulin antibodies (Sigma, Cat# T5168).

RNA Sequencing

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

The quality of raw data has been evaluated with FastQC 16. Poor quality sequences has been trimmed or removed with Trimmomatic 17 software to retain only good quality paired reads. Star v2.5.3a 18 has been used to align reads on mm10 reference genome using standard options. Quantification of gene and isoform abundances has been done with rsem 1.2.28, prior to normalisation with edgeR bioconductor package 19. Finally, differential analysis has been conducted with the glm framework likelihood ratio test from edgeR. Multiple hypothesis adjusted p-values were calculated with the Benjamini-Hochberg procedure to control FDR. The FPKM values of all transcripts of which expression was significantly different between both groups in Supplemental table 4.

Statistics

Results are reported as mean±SEM. Comparisons between groups were analysed for significance with the nonparametric Mann-Whitney test or the Kruskal-Wallis test followed by Dunn multiple comparison test (for >2 groups) using GraphPad Prism v8.0.2 (GraphPad Inc, San Diego, Calif). The normality and variance were not tested. Differences between groups were considered significant when $P \leq 0.05$ (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$).

RESULTS

Ovariectomized female mice fed with HFD+L-NAME display increased end diastolic pressure with preserved ejection fraction

In order to fit better with the HFpEF patient's population which includes a large proportion of menopausal women, we chose to submit ovariectomized female mice to the HFD + L-NAME regimen proposed by G. Schiattarella et al (Schiattarella et al. 2019). Specifically, C57BL/6 female were ovariectomized at 7 weeks of age, The HFD was initiated 1 week later and the L-NAME treatment 3 weeks later. Notably L-NAME (1 mg/L) was provided in the drinking water intermittently i.e. 4 days/week, to prevent mice from losing weight. Assessments were performed 12 weeks and 10 weeks after the HFD regimen and L-NAME treatment were initiated respectively.

Initially, we checked whether or not these mice developed hypertension, dyslipidemia and systemic low-grade inflammation. The L-NAME was not sufficient to induce significant elevation of blood pressure in OVX female mice (Supplemental Figure 1A-C). However, as expected, mice fed with HFD gained weight (Supplemental Figure 1D), associated with an elevation of total cholesterol, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol levels while triglycerides were not modified (Supplemental Figure 1E-H). Notably, HFD also induced low grade inflammation confirmed by significantly increased circulating

leucocytes (notably monocytes and lymphocytes) especially in HFD+L-NAME treated mice (Supplemental Figure 1I-K).

We then assessed cardiac function in these mice essentially via echocardiography and LV catheterization. In the four groups Left ventricular ejection fraction (LVEF) was normal and above 50% (Figure 1A). In contrast, HFD+L-NAME-treated OVX female mice displayed diastolic dysfunction attested by significantly elevated left ventricular end diastolic pressure (LVEDP) and relaxation constant Tau (Figure 1B-C). Mice treated with HFD or L-NAME alone displayed intermediate phenotypes. Consistent with heart failure HFD+L-NAME treated OVX female mice displayed exercise intolerance in the treadmill test (Figure 1D).

In conclusion, consistent with Schiattarella et al. data, a HFD regimen combined with a L-NAME treatment synergistically induce diastolic dysfunction in mice.

Diastolic dysfunction observed in HFD+L-NAME-treated OVX female mice was associated with cardiac hypertrophy, fibrosis and inflammation

To further characterize cardiac remodelling associated with diastolic dysfunction in HFD+L-NAME-treated OVX female mice; we performed morphometric, histological and gene expression analysis on the heart.

Assessment of heart weight/tibia length ratio showed HFD+L-NAME-treated OVX female mice developed cardiac hypertrophy (Figure 1E). This result was confirmed by echocardiographic measurements. Both the LV mass and the diastolic LV posterior wall thickness (LVPWd)/LV internal diameter (LVIDd) ratio were significantly increased in HFD+L-NAME-treated OVX female mice (Figure 1F-G) confirming and attesting cardiac concentric hypertrophy. Neither the HFD regimen nor L-NAME treatment alone induced cardiac hypertrophy.

At cellular level, cardiac hypertrophy in HFD+L-NAME-fed OVX female mice was associated with increased cardiomyocyte size (Supplemental Figure 2A-B). Besides, *Myh7* mRNA expression signing cardiomyocyte dedifferentiation was not modified (Supplemental Figure 2C) while *Nos2* mRNA previously shown to be increased in this model and to participate in the development of diastolic dysfunction by Schiattarella et al. (Schiattarella et al. 2019) was significantly increased (Supplemental Figure 2D).

Cardiomyocytes also showed altered Ca^{2+} homeostasis since we found HFD+L-NAME-fed OVX female had significantly decreased cardiac ATP2A2 protein levels (Supplemental Figure 2E,F). Phosphorylation of PLN on serine 16 was not affected while phosphorylation of PLN on threonine 17 tended to decreased (Supplemental Figure 2G-I). Phosphorylated RYR2 levels were not different between HFD+L-NAME-fed OVX female and control OVX female mice (Supplemental Figure 2J-K).

Notably, consistent with human HFpEF, diastolic dysfunction in HFD+L-NAME-fed OVX female mice was associated with increased perivascular and interstitial cardiac fibrosis (Supplemental Figure 3A-B).

Fibrosis was found to be evaluated by both Sirius red and type I Collagen staining of heart sections and confirmed by qPCR analysis of *Col1a1* and *Col3a1* mRNA expression (Supplemental Figure 3D-E).

Also CD45+ leukocyte infiltration in the cardiac tissue of HFD+L-NAME-treated OVX female mice was significantly increased (Supplemental Figure 3F-G). Infiltrated leukocytes were mostly CD68+ macrophages but also CD3+ T-cells and B220+ B-cells and all of these 3 populations of cells were significantly increased in the heart of HFD+L-NAME-treated OVX female mice in comparison to the control mice (Supplemental Figure 3H-J). Neither the HFD regimen nor L-NAME treatment alone induced cardiac fibrosis or inflammation.

Consistent with human HFpEF, HFD+L-NAME-fed OVX female mice display cardiac hypertrophy, fibrosis and inflammation. Besides, HFD+L-NAME-fed OVX female mice display decreased ATP2A2 levels consistent with impaired cardiomyocyte active. Importantly, the HFD regimen needs to be associated with L-NAME or vice versa to induce cardiac remodeling in OVX female mice.

Ovariectomized female mice fed with a HFD+L-NAME display cardiac small vessel disease

Since our model of HFpEF recapitulate most features of human HFpEF, we then phenotyped the cardiac microvasculature of HFD+L-NAME OVX female mice, by doing histological analyses.

First, we quantified cardiac capillary density and found that capillary rarefaction was not modified in any of the groups (Figure 2A-B). However, we found that the SMA+ arteriole mean diameter was significantly decreased in OVX mice treated either with L-NAME alone or HFD+L-NAME (Figure 2C-D) which is consistent with the vasoconstrictor effect of L-NAME. To assess vascular permeability, we measured fibrinogen and albumin extravasation and found that both HFD alone and HFD associated with L-NAME mice induced significant vascular leakage. Notably while L-NAME did not affect vascular permeability alone, it did exacerbate the effect of the HFD regimen (Figure 2E-G). Both L-NAME alone and L-NAME associated with HFD promoted endothelial cell activation attested by ICAM1 overexpression (Figure 2I-J). None of the groups showed increased small vessel thrombosis (Figure 2K).

Overall, these results show that diastolic dysfunction in HFD+L-NAME-fed OVX female mice is associated with endothelial dysfunction fully supporting Paulus et al. paradigm (W. J. Paulus et Tschope 2013).

While males develop diastolic dysfunction upon a HFD + L-NAME regimen, non OVX females do not

Considering the possible sexual dimorphism associated with HFpEF we tested whether the same phenotypes were also observed in male and non OVX female.

As expected, LVEF was not modified by the HFD+L-NAME treatment neither in male nor in non-OVX females (Supplemental Figure 4A). However, while male developed diastolic dysfunction attested by increased EDP and Tau, non OVX female did not (Supplemental Figure 4B, C) suggesting that female

hormones may be protective against HFpEF. Consistently, HFD+L-NAME treated male did show impaired exercise tolerance while non OVX female did not (Supplemental Figure 4D).

Notably, in contrast to OVX females, males did not develop cardiac or cardiomyocyte hypertrophy upon the HFD+L-NAME treatment (Supplemental Figure 4E-F) while they show significantly higher Myh7 mRNA expression suggesting cardiomyocyte dedifferentiation (Supplemental Figure 4G). Diastolic dysfunction in both male and OVX female was associated with increased NOS2 mRNA expression consistent with Schiatterella et al. results (Supplemental Figure 4G).

Cardiac fibrosis (both interstitial and perivascular) was increased only in OVX females under HFD+L-NAME regimen but not in male or non OVX female mice (Supplemental Figure 5A-B). Consistently Col1a1 and Col3a1 mRNA were also overexpressed only in OVX female mice (Supplemental Figure 5C-D).

Furthermore, the HFD+L-NAME regimen induced increased leucocyte infiltration in both non OVX and OVX females but not in males (Supplemental figure 5E).

Altogether, these results show that the cardiac remodeling associated with diastolic dysfunction upon a HFD+L-NAME regimen is different in males and females. In males, diastolic dysfunction was associated with increased Myh7 expression but not with cardiac hypertrophy, fibrosis or inflammation, while in OVX females diastolic dysfunction was associated with cardiac hypertrophy, and fibrosis. Notably cardiac inflammation was not associated with diastolic dysfunction since both OVX and non OVX females showed increased cardiac leukocyte infiltration while only OVX females developed diastolic dysfunction.

Males fed with a HFD + L-NAME regimen do not show cardiac small vessel disease

Then we assessed the phenotype of the cardiac microvasculature in male and non OVX females treated with HFD+L-NAME.

Capillary density was not modified by the HFD+L-NAME regimen in any of the groups (Figure 3A). However, the HFD+L-NAME treatment decreased the mean arteriole diameter in both OVX and non OVX female mice but not in males (Figure 3B). Similarly, FGB extravasation was increased in both OVX and non OVX females but not in males (Figure 3C) so was endothelial cell activation attested by increased *Sele* mRNA, and *Icam1* mRNA and protein expression (Figure 3D-F).

Altogether these results demonstrate that cardiac small vessel disease only develops in female mice upon the HFD+L-NAME regimen. However, similarly to cardiac inflammation, it does not seem to be associated with diastolic dysfunction since both OVX and non OVX female display cardiac small vessel disease while only OVX females develop diastolic dysfunction. Cardiac small vessel seems to not be sufficient to induce diastolic dysfunction or to participate in the development of diastolic dysfunction in this model. In order to investigate whether or not cardiac small vessel disease may participate in the development of diastolic dysfunction in OVX female mice, we used a mice model in which we have

previously shown endothelial integrity is preserved upon stress (Chapouly et al. 2020) i.e. endothelial specific *Cdon* deficient mice.

***Cdon* endothelial KO protects ECs in OVX female mice submitted to the HFD+L-NAME treatment**

We first verified that these mice are protected from endothelial dysfunction when fed with the HFD + L-NAME regimen.

Cdon endothelial KO (*Cdon*^{ECKO}) did not modify microvessel density (Figure 4A-B). However, it did increase arteriole diameter (Figure 4C-D) and prevent HFD+L-NAME-induced abnormal endothelium permeability and activation, attested by decreased fibrinogen extravasation (Figure 4E-F) and decreased ICAM1 levels respectively (Figure 4G-H). Consistent with the decreased endothelium activation, CD45+ leukocyte, especially CD68+ macrophage, recruitment was significantly decreased in OVX female *Cdon*^{ECKO} mice in comparison to control mice treated with HFD+L-NAME (Figure 4I-K).

These results showed that *Cdon* endothelial KO protects cardiac ECs and prevents cardiac inflammation in OVX female mice fed with a HFD+L-NAME regimen.

Improving cardiac small vessel disease does not prevent the occurrence of diastolic dysfunction in OVX female mice.

Then we tested whether the mice develop diastolic dysfunction. As expected, systolic function, attested by a LVEF above 50%, was normal in OVX *Cdon*^{ECKO} female mice treated with the HFD+L-NAME regimen (Figure 5A). Importantly, LVEDP and tau were elevated, and comparable to OVX *Cdon*^{WT} female mice fed with the HFD+L-NAME regimen, in OVX *Cdon*^{ECKO} female mice (Figure 5B-C) meaning that *Cdon*^{ECKO} mice develop diastolic dysfunction in the absence of endothelial dysfunction and cardiac inflammation. Consistently, OVX *Cdon*^{ECKO} female mice fed with the HFD+L-NAME regimen display exercise intolerance just like *Cdon*^{WT} mice (Figure 5D).

Notably, OVX *Cdon*^{ECKO} female mice develop cardiac hypertrophy and fibrosis just like the control mice. More specifically, Cardiac mass, measured either with a scale or via echocardiography was identically in OVX *Cdon*^{ECKO} mice and OVX *Cdon*^{WT} mice treated with the HFD+L-NAME regimen (Figure 5E-F) so was cardiomyocyte size measured after WGA staining (Figure 5G-H). Similarly, Sirius red staining showed that both interstitial and perivascular fibrosis was identical in OVX *Cdon*^{ECKO} mice and OVX *Cdon*^{WT} mice treated with the HFD+L-NAME regimen (Figure 5I-J).

Altogether, these results reveal that OVX *Cdon*^{ECKO} female mice fed with and HFD+L-NAME regimen develop cardiac fibrosis, hypertrophy and diastolic dysfunction even though they do not display

increased micro-vessel permeability and activation suggesting that micro-vessel permeability and activation do not participate in the development of diastolic dysfunction at least in OVX female mice fed with an HFD + L-NAME regimen.

Colchicine therapy does not prevent the development of diastolic dysfunction in OVX female mice.

Notably OVX *Cdon*^{ECKO} female mice displayed reduced cardiac inflammation upon HFD+L-NAME regimen suggesting that increased leucocyte infiltration in the heart may not promote the development of diastolic dysfunction. To test this hypothesis, OVX female mice were either treated with or not treated with colchicine, an anti-inflammatory drug widely used in cardiology, for 10 weeks. Colchicine treatment was initiated 2 weeks after the HFD regimen at the same time as the L-NAME treatment.

As expected colchicine treatment reduced both circulating and cardiac infiltrated leucocytes (Figure 6A-C). Cardiac dimensions and function were then assessed via echocardiography and LV catheterization. LVEF was not modified by the colchicine treatment neither were LVEDP and Tau in OVX female mice treated with the HFD+L-NAME regimen (Figure 6D-F) suggesting that cardiac infiltration with leucocyte is not necessary for diastolic dysfunction to appear. Consistently, colchicine treatment did not improve exercise tolerance in OVX female mice treated with the HFD+L-NAME regimen (Figure 6G).

Notably, colchicine administration did not modify either cardiac hypertrophy (Figure 6H-J) or fibrosis (Figure 6K-M).

Altogether the data demonstrate and confirm that increased leucocyte infiltration in the heart does not promote diastolic dysfunction in the mouse model of HFpEF triggered by a HFD+L-NAME combination treatment.

RNA seq data

To search for alternative mechanisms and/or strengthen some of our data, we performed a RNA sequencing analysis of total heart extracts in HFD+L-NAME fed OVX female mice and control OVX female mice. We found 110 genes were upregulated and 86 were downregulated (Supplemental table 4) by the HFD+L-NAME regimen. The representative heat map is shown Figure 7A. The main biological pathways modulated by the HFD + L-NAME regimen were “regulation of immune system process”, “ion transport”, “signaling”, “cell adhesion” and “response to stress” (Figure 7B) which confirms the association of inflammation with HFpEF. Also, as expected, signaling pathways upregulated by the HFD + L-NAME regimen included genes associated with metabolic changes (e.g. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (*Hmgsc2*)) or adipocytes (e.g. the adipose non-neuronal cholinergic signaling receptor cholinergic receptor nicotinic α 2 subunit (*Chrna2*)(Ma et al. 2022)). These genes were increased equally in males, non OVX and OVX female (Figure 7C-D). On the contrary, but

consistent with our histology data, gene known to be expressed by macrophages (e.g. C-X3-C Motif Chemokine Receptor 1 (*Cxcr3*) and nuclear receptor subfamily 4 group A member 1 (*Nr4a1*)) or B-cells (e.g. CD22 Molecule (*Cd22*)) were enriched only in the OVX female male fed with the HFD + L-NAME regimen but not in male or non OVX females (Figure 7E-G). Even though endothelial dysfunction was observed in both OVX and non OVX females under HFD + L-NAME, thrombospondin 1 (*Thbs1*) known to be associated endothelial dysfunction was only increased in OVX females (Figure 7H), suggesting that some features of endothelial dysfunction might be exacerbated by the absence of female hormones and thus specifically associated with diastolic dysfunction. Importantly, *Thbs1* mRNA was not downregulated in the heart of *Cdon^{ECKO}* or colchicine-treated mice (data not shown) suggesting *thbs1* upregulation may promote diastolic dysfunction in HFD+L-NAME fed OVX female mice. Finally, among genes upregulated in the heart of OVX female mice submitted to the HFD + L-NAME regimen, Sodium voltage-gated channel α subunit 4 (*Scn4a*) encode for a skeletal muscle sodium channel shown to be upregulated in cardiomyocytes upon ATP2A2 downregulation (S. X. Liu, Matthews, et Huang 2021). This gene was specifically increased in OVX female mice (Figure 7I).

DISCUSSION

Endothelial dysfunction has been proposed to be causing HFpEF since almost 10 years in the paradigm proposed by Paulus et al in 2013 (W. J. Paulus et Tschöpe 2013). The present study demonstrates for the first time that neither endothelium activation, nor endothelium leakage do participate in the pathophysiology of this disease at least in the mouse model of HFpEF triggered by a HFD + L-NAME regimen. Actually, we found that diastolic dysfunction still develops in OVX female mice fed by a HFD + L-NAME regimen and “protected” from endothelium leakage and activation. Interestingly, this is not the first time that endothelial dysfunction is suggested not to have a critical role in the pathophysiology of HFpEF since several therapies aiming at restoring the NO/cGMP pathway, another important feature of endothelium dysfunction, failed to improve HFpEF patient conditions (Tona et al. 2021).

Importantly the causal role of endothelial dysfunction in the pathophysiology of HFpEF has not been yet excluded since endothelial dysfunction may affect cardiomyocyte biology and cardiac function in many ways (Cornuault et al. 2022). Notably, ECs are essential cell components of blood vessels which are necessary to bring nutrients and oxygen to cardiomyocytes. Endothelial dysfunction may then cause cardiac hypoxia and subsequent cardiomyocyte dysfunction. OVX female mice fed with and HFD + L-NAME regimen did not show capillary rarefaction or increased capillary thrombosis suggesting capillary perfusion is not altered in these mice; however, the mean arteriole diameter was diminished. The importance of cardiac hypoxia remains to be identified. Besides, ECs were shown to produce signals necessary for cardiomyocyte homeostasis including NO. Whether or not modifications of such signals may participate in the pathophysiology of HFpEF remain to be tested. Finally, EC dysfunction may affect cardiomyocyte function indirectly by modifying the cardiomyocyte microenvironment. Notably, EC dysfunction may promote cardiac fibrosis, cardiac inflammation or cardiac edema via increased production of pro-fibrotic, pro-inflammatory signals or impaired barrier properties. Our data indicate that neither cardiac inflammation nor cardiac edema seems to promote diastolic dysfunction.

However, cardiac fibrosis which did develop in OVX *Cdon*^{ECKO} female mice fed with the HFD + L-NAME regimen may result from endothelial dysfunction (Xuetao Sun et al. 2020) and promotes HFpEF.

Also, in this study, we have further explored the possible sexual dimorphism associated with the pathophysiology of HFpEF. Notably, we found that cardiac remodeling associated with HFpEF differs in males and females. While diastolic dysfunction was associated with cardiomyocyte dedifferentiation attested with increased Myh7 mRNA expression in male. The HFD + L-NAME regimen induced endothelial dysfunction and cardiac inflammation only in females. Cardiomyocyte hypertrophy and fibrosis was specifically seen in OVX females but not in non OVX females or males. Importantly, these data seem to be relevant to humans, since women show higher inflammatory biomarkers including C-reactive protein (CRP) in several large-scale proteomic studies (Lau et al. 2022). Besides, women were reported to display more concentric cardiac hypertrophy while men display more eccentric remodeling (Lam et al. 2019). Also, pre-menopausal women are better protected against cardiac hypertrophy compared with men, but this protection was shown to be abolished following menopause and is partially restored after estrogen replacement therapy (Wu et al. 2020). Finally, women with HFpEF were shown to have significantly higher plasma levels of the propeptide for type I collagen than men with HFpEF (Garate-Carrillo et al. 2020). Additionally, women with hypertrophic cardiomyopathy were reported to display more fibrosis than male patients (Nijenkamp et al. 2020). Notably, estradiol was shown to diminish Col1a1 and Col3a1 in cultured-fibroblasts (Medzikovic, Aryan, et Eghbali 2019) possibly explaining why we only observed cardiac fibrosis in the heart of OVX females.

Consistent with Schiattarella et al. data, we found that diastolic dysfunction induced by a HFD + L-NAME regimen was associated with increased NOS2 levels (Schiattarella et al. 2019). This result was observed in both males and OVX females. Whether or not, HFpEF is induced by common or specific mechanisms, in males and females, remains to be determined.

In conclusion, the present paper reveals for the first time that neither endothelium activation, nor endothelium leakage participates in the pathophysiology of HFpEF at least in the mouse model of HFpEF triggered by a HFD + L-NAME regimen. These results together with the negative results of clinical trials targeting the NO/cGMP pathway weakens Paulus et al paradigm (W. J. Paulus et Tschope 2013) and suggest that neither endothelial dysfunction nor cardiac inflammation is causing HFpEF. However, considering HFpEF is an heterogeneous disease with multiple pheno-groups (Heinzel et Shah 2022), these results need to be verified in other animal models of HFpEF. Indeed, even though endothelial dysfunction does not seem to be necessary for diastolic dysfunction to develop upon a HFD + L-NAME regimen, EC protection was previously shown to prevent the occurrence of both diastolic and systolic dysfunction in other setting including pressure overload and hypertension (Cornuault et al. 2022). Modification of some EC properties was shown to be sufficient to induced diastolic dysfunction in the absence of any other cardiovascular risk factor (X. He et al. 2017, 3; Maizel et al. 2014; Dhot et al. 2020; Abelanet et al. 2022). Similarly while limiting cardiac inflammation with colchicine does not prevent

the occurrence of HFpEF in HFD + L-NAME fed OVX female mice, we previously found that mast cell stabilization was able to prevent the occurrence of diastolic dysfunction in diabetic obese *Lep^{db/db}* mice (Guimbal et al. 2021).

Finally this paper further highlight the importance of considering sex differences when investigating the pathophysiology of HFpEF.

Acknowledgments

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

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

Sources of funding

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

Disclosures

none

References

1. Zhou, Y., Zhu, Y. & Zeng, J. Research Update on the Pathophysiological Mechanisms of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Curr. Mol. Med.* (2021) doi:10.2174/1566524021666211129111202.
2. Tsao, C. W. et al. Temporal Trends in the Incidence of and Mortality Associated With Heart Failure With Preserved and Reduced Ejection Fraction. *JACC Heart Fail.* 6, 678–685 (2018).
3. Lyle, M. A. & Brozovich, F. V. HFpEF, a Disease of the Vasculature: A Closer Look at the Other Half. *Mayo Clin. Proc.* 93, 1305–1314 (2018).
4. Groenewegen, A., Rutten, F. H., Mosterd, A. & Hoes, A. W. Epidemiology of heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 22, 1342–1356 (2020).
5. Paulus, W. J. & Tschope, C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol* 62, 263–71 (2013).

6. He, X. et al. Endothelial Specific SIRT3 Deletion Impairs Glycolysis and Angiogenesis and Causes Diastolic Dysfunction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 112, 104–113 (2017).
7. Zeng, H., He, X. & Chen, J.-X. A Sex-Specific Role of Endothelial Sirtuin 3 on Blood Pressure and Diastolic Dysfunction in Female Mice. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 9744 (2020).
8. Maizel, J. et al. Sirtuin 1 ablation in endothelial cells is associated with impaired angiogenesis and diastolic dysfunction. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 307, H1691–H1704 (2014).
9. Dhot, J. et al. Overexpression of endothelial β 3 -adrenergic receptor induces diastolic dysfunction in rats. *ESC Heart Fail.* 7, (2020).
10. Abelanet, A. et al. Increased Capillary Permeability in Heart Induces Diastolic Dysfunction Independently of Inflammation, Fibrosis, or Cardiomyocyte Dysfunction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 101161ATVBAHA121317319 (2022) doi:10.1161/ATVBAHA.121.317319.
11. Cornuault, L., Rouault, P., Duplâa, C., Couffinal, T. & Renault, M.-A. Endothelial Dysfunction in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: What are the Experimental Proofs? *Front. Physiol.* 13, (2022).
12. Schiattarella, G. G. et al. Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction. *Nature* 568, 351–356 (2019).
13. Chapouly, C. et al. Desert Hedgehog-Driven Endothelium Integrity Is Enhanced by Gas1 (Growth Arrest-Specific 1) but Negatively Regulated by Cdon (Cell Adhesion Molecule-Related/Downregulated by Oncogenes). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 40, e336–e349 (2020).
14. Azzoni, E. et al. Hemogenic endothelium generates mesoangioblasts that contribute to several mesodermal lineages in vivo. *Development* 141, 1821–34 (2014).
15. Renault, M. A. et al. The Hedgehog transcription factor Gli3 modulates angiogenesis. *Circ Res* 105, 818–26 (2009).
16. Roncalli, J. et al. Sonic hedgehog-induced functional recovery after myocardial infarction is enhanced by AMD3100-mediated progenitor-cell mobilization. *J Am Coll Cardiol* 57, 2444–52 (2011).
17. Schiller, N. B. et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J. Am. Soc. Echocardiogr. Off. Publ. Am. Soc. Echocardiogr.* 2, 358–367 (1989).
18. Ma, Y., Liu, S., Jun, H. & Wu, J. CHRNA2: a new paradigm in beige thermoregulation and metabolism. *Trends Cell Biol.* 32, 479–489 (2022).
19. Liu, S. X., Matthews, H. R. & Huang, C. L.-H. Sarcoplasmic reticular Ca²⁺-ATPase inhibition paradoxically upregulates murine skeletal muscle Nav1.4 function. *Sci. Rep.* 11, 2846 (2021).
20. Tona, F., Montisci, R., Iop, L. & Civieri, G. Role of coronary microvascular dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction. *Rev. Cardiovasc. Med.* 22, 97–104 (2021).
21. Sun, X., Nkennor, B., Mastikhina, O., Soon, K. & Nunes, S. S. Endothelium-mediated contributions to fibrosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 101, 78–86 (2020).
22. Lam, C. S. P. et al. Sex differences in heart failure. *Eur. Heart J.* 40, 3859–3868c (2019).
23. Lau, E. S. et al. Sexual Dimorphism in Cardiovascular Biomarkers: Clinical and Research Implications. *Circ. Res.* 130, 578–592 (2022).

24. Nijenkamp, L. L. A. M. et al. Sex-specific cardiac remodeling in early and advanced stages of hypertrophic cardiomyopathy. *PLoS One* 15, e0232427 (2020).
25. Garate-Carrillo, A., Gonzalez, J., Ceballos, G., Ramirez-Sanchez, I. & Villarreal, F. Sex related differences in the pathogenesis of organ fibrosis. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* 222, 41–55 (2020).
26. Wu, J., Dai, F., Li, C. & Zou, Y. Gender Differences in Cardiac Hypertrophy. *J Cardiovasc. Transl. Res.* 13, 73–84 (2020).
27. Medzikovic, L., Aryan, L. & Eghbali, M. Connecting sex differences, estrogen signaling, and microRNAs in cardiac fibrosis. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 97, 1385–1398 (2019).
28. Heinzl, F. R. & Shah, S. J. The future of heart failure with preserved ejection fraction : Deep phenotyping for targeted therapeutics. *Herz* 47, 308–323 (2022).
29. Guimbal, S. et al. Mast Cells Are the Trigger of Small Vessel Disease and Diastolic Dysfunction in Diabetic Obese Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 41, e193–e207 (2021).

Figures and legends to figures

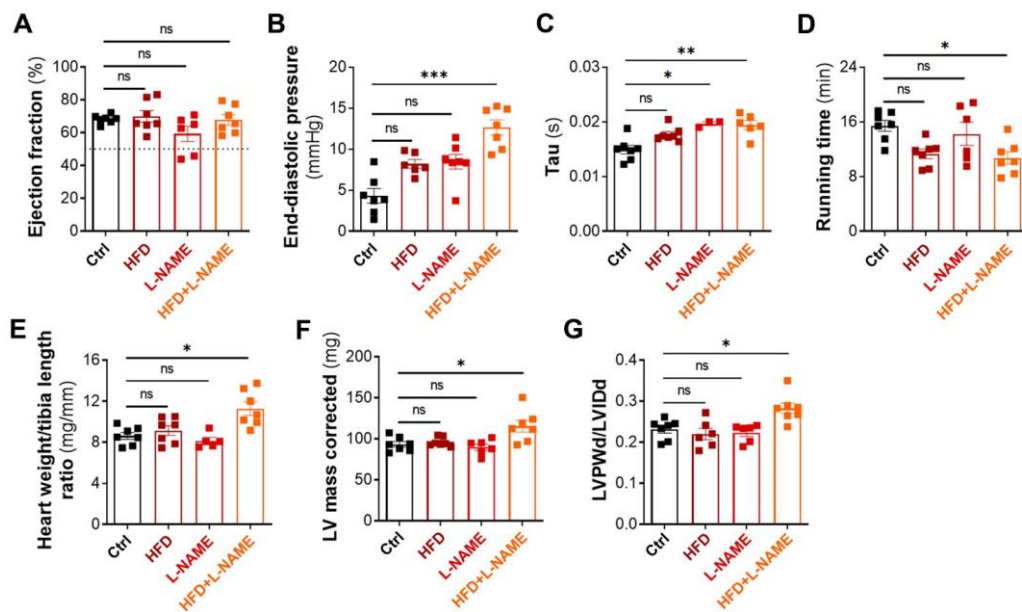


Figure 1: OVX female mice submitted to a HFD + L-NAME regimen develop diastolic dysfunction.

C57BL/6 female mice were ovariectomized at 7 weeks of age, then submitted or not to a HFD regimen from 8 weeks of age and exposed or not to L-NAME (1 g/L in the drinking water) intermittently (4 days/week) from 10 week of age. Cardiac structure and function was assessed at 20 weeks of age. (A) Ejection fraction was assessed via echocardiography (n=6-7). (B) LV end diastolic pressure (EDP) was measured by left ventricular catheterization (n=6-7). (C) Tau was measured by left ventricular catheterization (n=6-7). (D) Running time was assessed on treadmill (n=6-7). (E) The heart weight over tibia length was measured (n=5-7). (F) LV mass was assessed by echocardiography (n=6-7). (G) Diastolic left ventricular posterior wall (LVPWd) thickness and diastolic left ventricular internal diameter (LVIDd) were measured by echocardiography (n=6-7). Ratio of LVPWd and LVIDd was calculated.

*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ns: not significant (Kruskal-Wallis test with Bonferroni post-hoc).

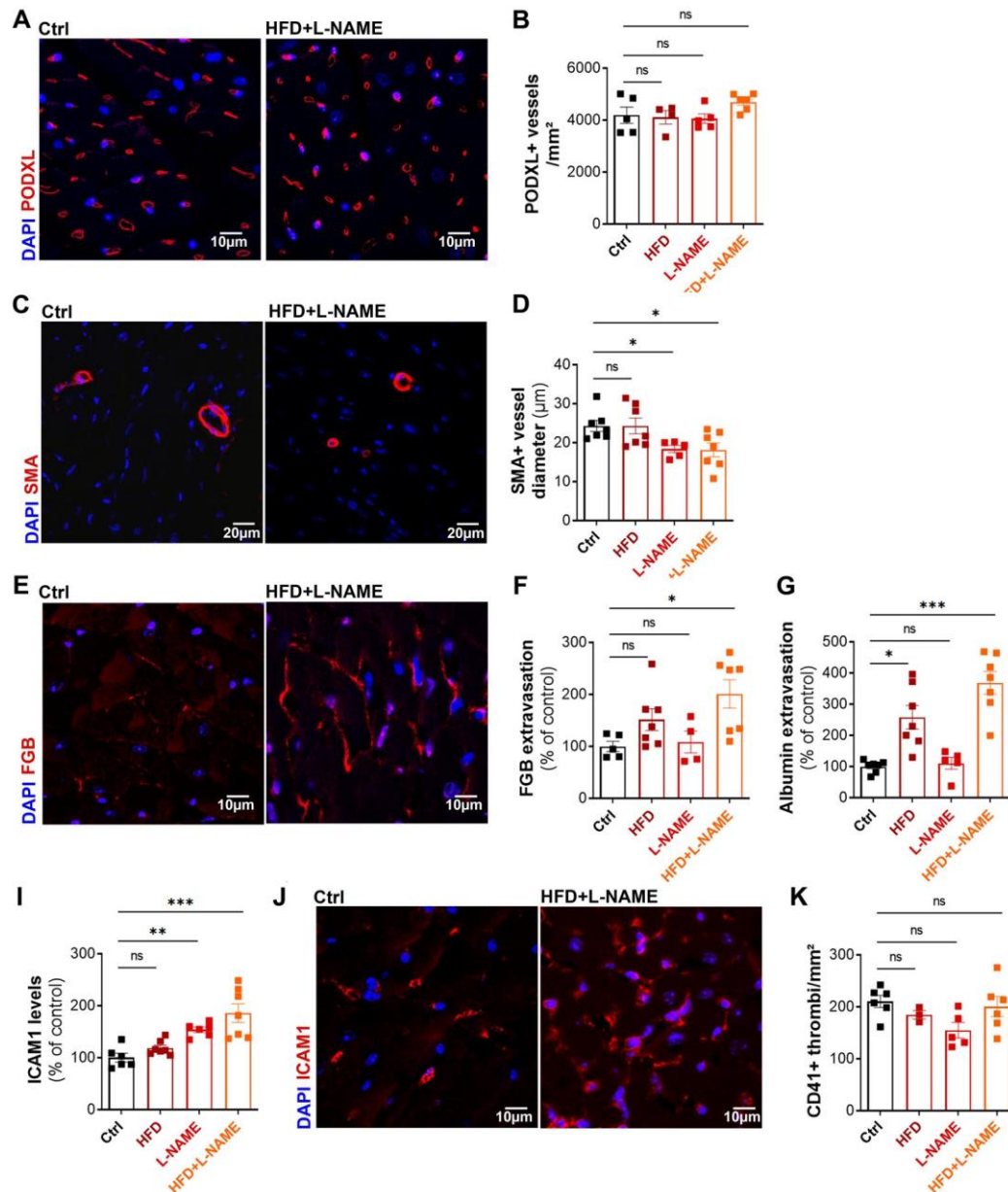


Figure 2: OVX female mice submitted to a HFD + L-NAME regimen display cardiac small vessel disease. C57BL/6 female mice were ovariectomized at 7 weeks of age, then submitted or not to a HFD regimen from 8 weeks of age and exposed or not to L-NAME (1 g/L in the drinking water) intermittently (4 days/week) from 10 week of age. Mice were sacrificed at 20 weeks of age. **(A)** Heart cross sections were immunostained with anti-PODXL antibodies to identify ECs. **(B)** The number of PODXL+ capillary per mm² was counted (n=5-7). **(C)** Heart cross sections were immuno-stained with anti-SMA (α smooth muscle actin) antibodies to identify smooth muscle cells. **(D)** The mean cardiac arteriole diameter was measured (n=5-7). **(E)** Heart cross sections were immunostained with anti-FGB antibodies. **(F)** FGB+ surface area was measured using Image J software (n=5-7). **(G)** Albumin+ surface area was measured using Image J software after immunostaining with anti-albumin antibodies (n=5-7). **(H)** ICAM1+ surface area was quantified using Image J software (n=6-7). **(I)** Heart

cross sections were immunostained with anti-ICAM1 antibodies. (J) The number of CD41+ thrombi per mm² was counted (n=5-6).

*: p≤0.05, **: p≤0.01, ***: p≤0.001, ns: not significant (Kruskal-Wallis test with Bonferroni post-hoc)

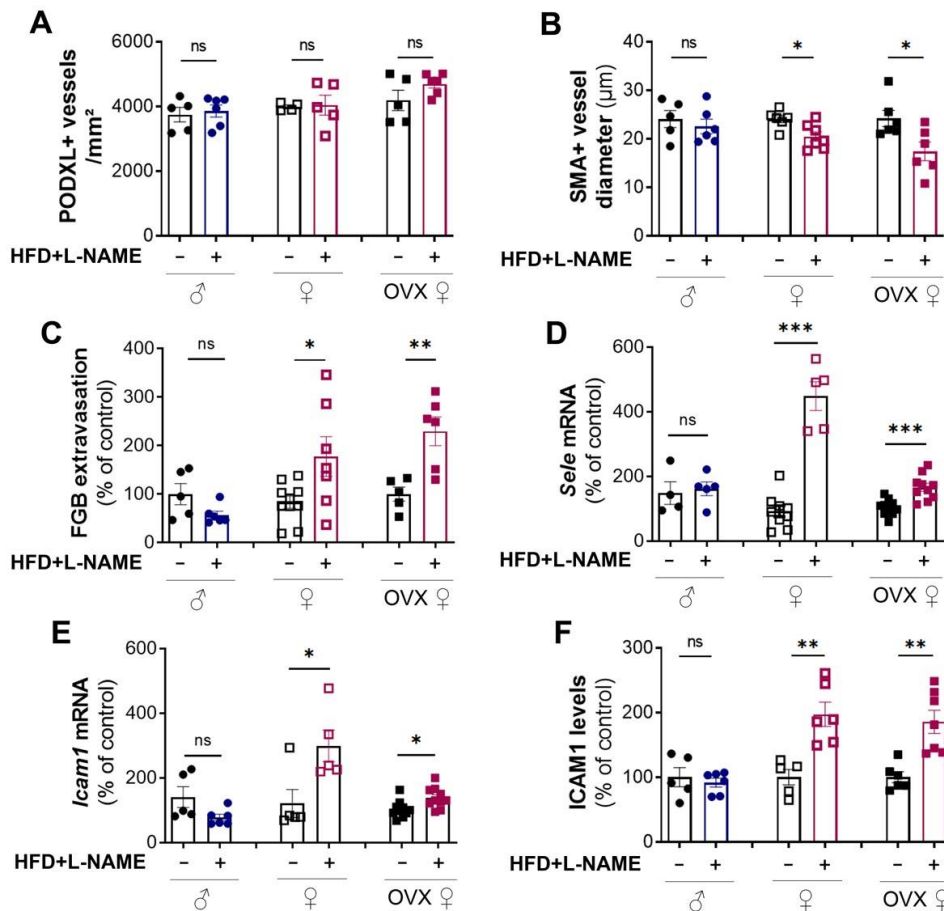


Figure 3: Only female mice submitted to a HFD + L-NAME regimen display cardiac small vessel disease. C57BL/6 male and female mice were ovariectomized or not at 7 weeks of age, then submitted or not to a HFD regimen from 8 weeks of age and exposed or not to L-NAME (1 g/L in the drinking water) intermittently (4 days/week) from 10 week of age. Mice were sacrificed at 20 weeks of age. (A) Heart cross sections were immunostained with anti-PODXL antibodies to identify ECs. The number of PODXL+ capillary per mm² was counted (n=5). (B) Heart cross sections were immunostained with anti-SMA antibodies to identify smooth muscle cells. The mean cardiac arteriole diameter was measured (n=5-7). (C) Heart cross sections were immunostained with anti-FGB antibodies. FGB+ surface area was measured using Image J software (n=5-7). (D) Sele mRNA expression was quantified by RT-qPCR in total heart extract and normalized to Actb mRNA (n=4-8). (E) Icam1 mRNA expression was quantified by RT-qPCR in total heart extract and normalized to Actb mRNA (n=5-8). (F) ICAM1+ surface area was quantified using Image J software (n=5-7).

*: p≤0.05, **: p≤0.01, ***: p≤0.001, ns: not significant (Mann-Whitney test).

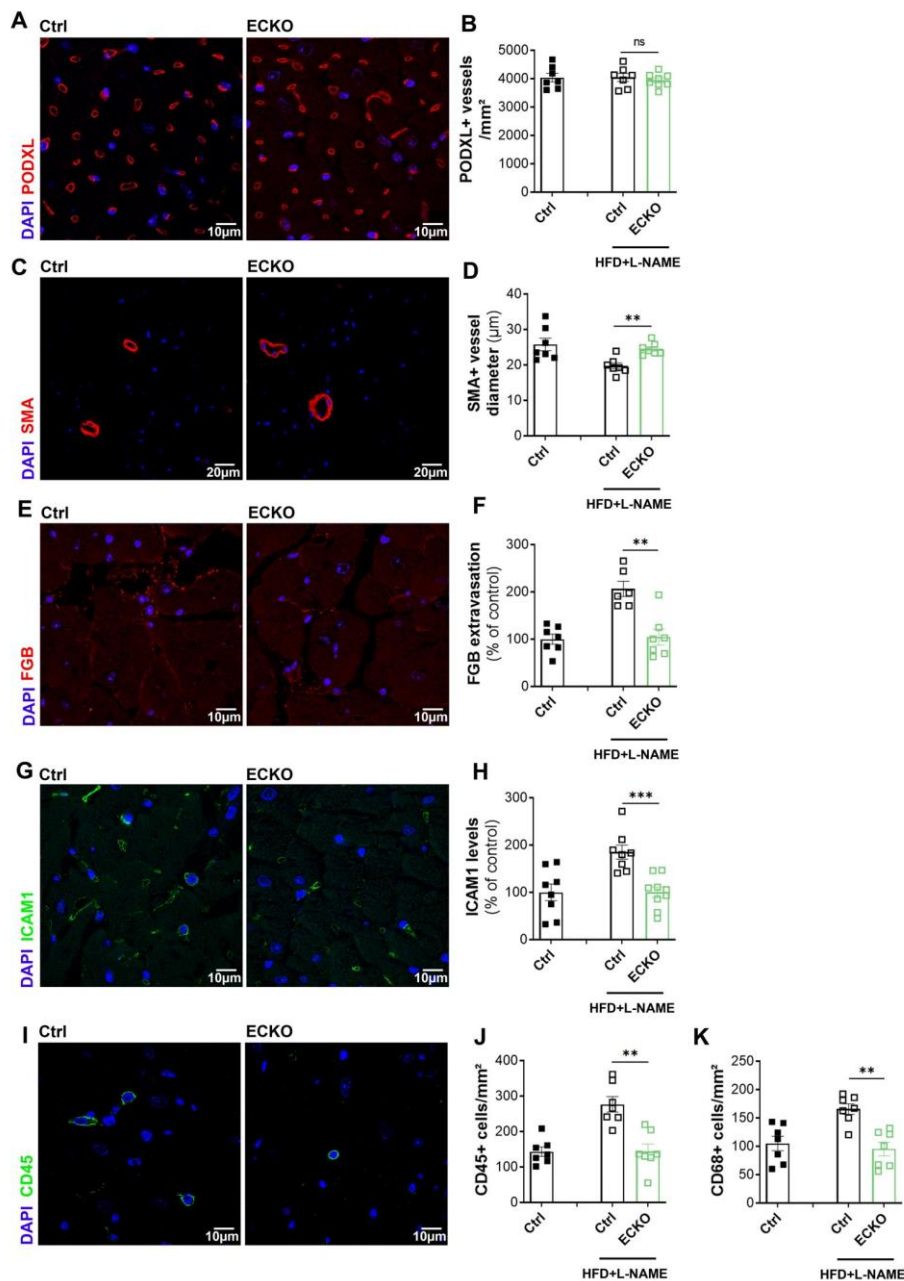


Figure 4: OVX Cdon^{ECKO} female mice submitted to a HFD + L-NAME regimen are protected from cardiac small vessel disease.

Cdh5-Cre/ERT2; Cdon^{Flox/Flox} (Cdon^{ECKO}) female mice and their control littermate (Cdon^{Flox/Flox}) were ovariectomized or not at 7 weeks of age, then submitted or not to a HFD regimen from 8 weeks of age and exposed or not to L-NAME (1 g/L in the drinking water) intermittently (4 days/week) from 10 week of age. Mice were sacrificed at 20 weeks of age. (A) Heart cross sections were immunostained with anti-PODXL antibodies to identify ECs. (B) The number of PODXL+ capillary per mm² was counted (n=7). (C) Heart cross sections were immuno-stained with anti-SMA (α smooth muscle actin) antibodies to identify smooth muscle cells. (D) The mean cardiac arteriole diameter was measured (n=7). (E) Heart cross sections were immunostained with anti-FGB antibodies. (F) FGB+ surface area was measured using Image J software (n=6-7). (G) Heart cross sections were immunostained with

anti-ICAM1 antibodies. **(H)** ICAM1+ surface area was quantified using Image J software (n=6-7). **(I)** Heart cross sections were immunostained with anti-CD45 antibodies to identify leukocytes. **(J)** The number of CD45+ leukocytes per mm² was counted (n=7). **(K)** The number of CD68+ monocytes/macrophages per mm² was counted (n=7).

*: p≤0.05, **: p≤0.01, ***: p≤0.001, ns: not significant (Mann-Whitney test)

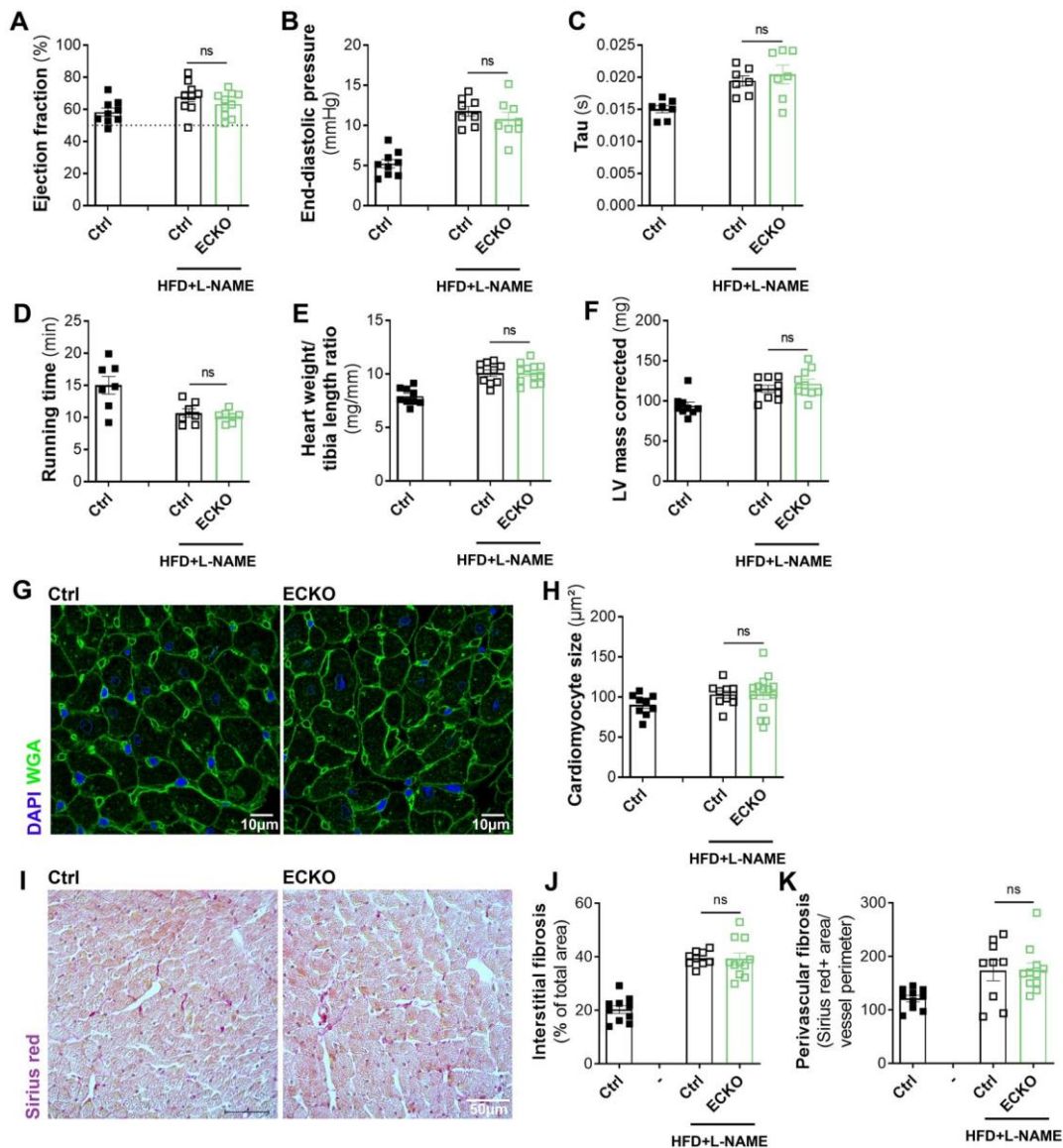


Figure 5: OVX $Cdon^{ECKO}$ female mice submitted to a HFD + L-NAME regimen develop diastolic dysfunction.

$Cdh5-Cre/ERT2$; $Cdon^{Flx/Flx}$ ($Cdon^{ECKO}$) female mice and their control littermate ($Cdon^{Flx/Flx}$) were ovariectomized or not at 7 weeks of age, then submitted or not to a HFD regimen from 8 weeks of age and exposed or not to L-NAME (1 g/L in the drinking water) intermittently (4 days/week) from 10 week of age. Mice were sacrificed at 20 weeks of age. **(A)** Ejection fraction was assessed via echocardiography (n=9). **(B)** LV end diastolic pressure (EDP) was measured by left ventricular catheterization (n=9). **(C)** Tau was measured by left ventricular catheterization (n=7). **(D)** Running time was assessed on treadmill (n=7). **(E)** The heart weight over tibia length was measured (n=9-12). **(F)** LV mass was assessed by echocardiography (n=9). **(G)** Heart cross sections were stained with FITC-labelled WGA. **(H)** Cardiomyocyte cross section area was measured using Image J software (n=9-12). **(I)** Heart cross sections were stained with Sirius red to identify fibrosis. **(J)** Interstitial fibrosis was quantified using Image J software (n=10). **(K)** Perivascular fibrosis was quantified using Image J software (n=9).

*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ns: not significant (Mann-Whitney test)

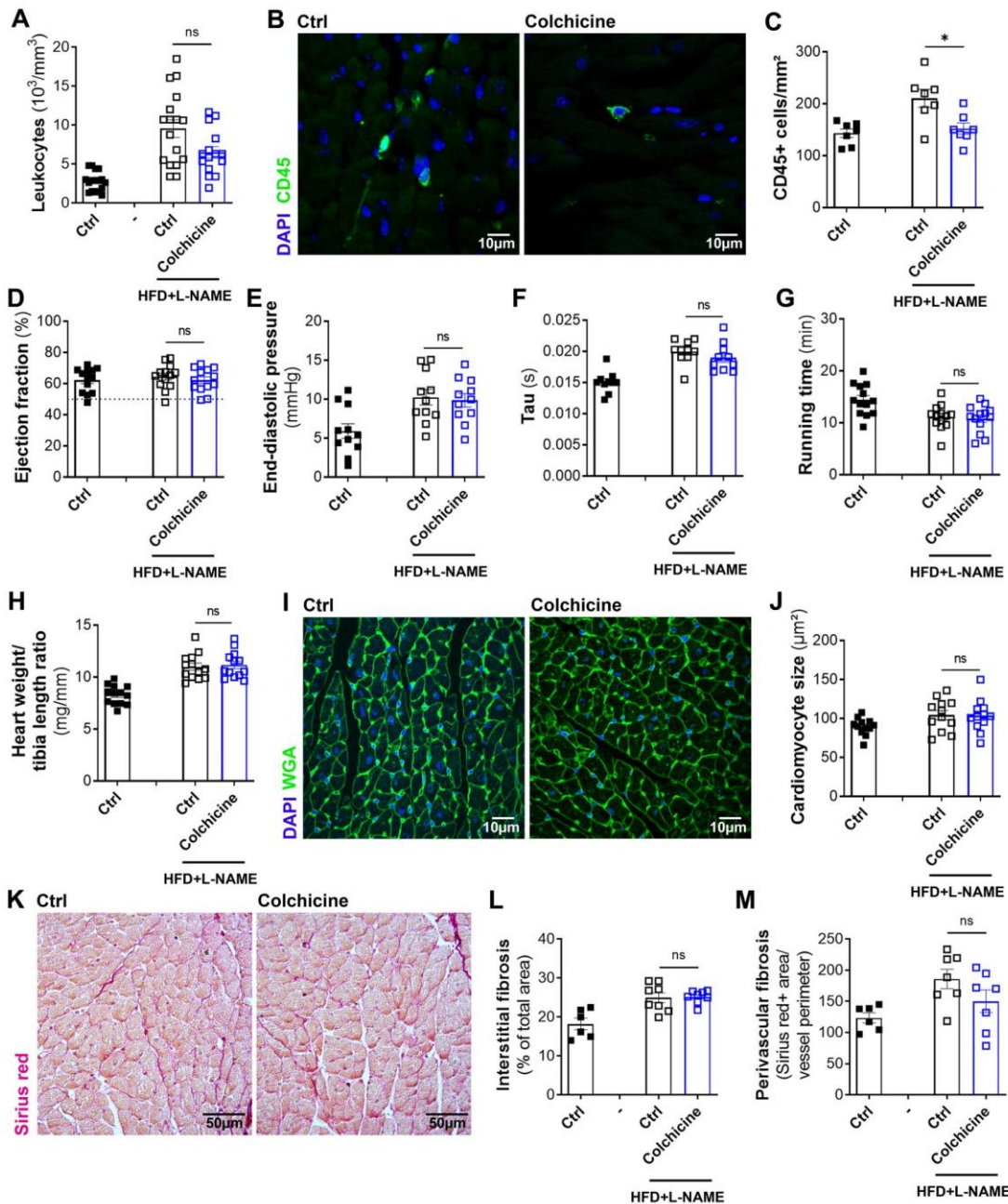


Figure 6 Colchicine therapy does not prevent the occurrence of diastolic dysfunction in OVX female mice submitted to a HFD + L-NAME regimen.

C57BL/6 male and female mice were ovariectomized or not at 7 weeks of age, then submitted or not to a HFD regimen from 8 weeks of age and exposed or not to L-NAME (1 g/L in the drinking water) intermittently (4 days/week) from 10 week of age. Colchicine treatment (200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) was initiated from 10 weeks of age. Mice were sacrificed at 20 weeks of age. **(A)** Leukocyte count was calculated in total blood samples ($n=10-17$). **(B)** Heart cross sections were immunostained with anti-CD45 antibodies to identify leukocytes. **(C)** The number of CD45+ leukocytes per mm^2 was counted

(n=7). **(D)** Ejection fraction was assessed via echocardiography (n=10-17). **(E)** LV end diastolic pressure (EDP) was measured by left ventricular catheterization (n=11). **(F)** Tau was measured by left ventricular catheterization (n=10). **(G)** Running time was assessed on treadmill (n=13-17). **(H)** The heart weight over tibia length was measured (n=13-17). **(I)** Heart cross sections were stained with FITC-labelled WGA. **(J)** Cardiomyocyte cross section area was measured using Image J software (n=12). **(K)** Heart cross sections were stained with Sirius red to identify fibrosis. **(L)** Interstitial fibrosis was quantified using Image J software (n=6-8). **(M)** Perivascular fibrosis was quantified using Image J software (n=6-8).

*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ns: not significant (Mann-Whitney test)

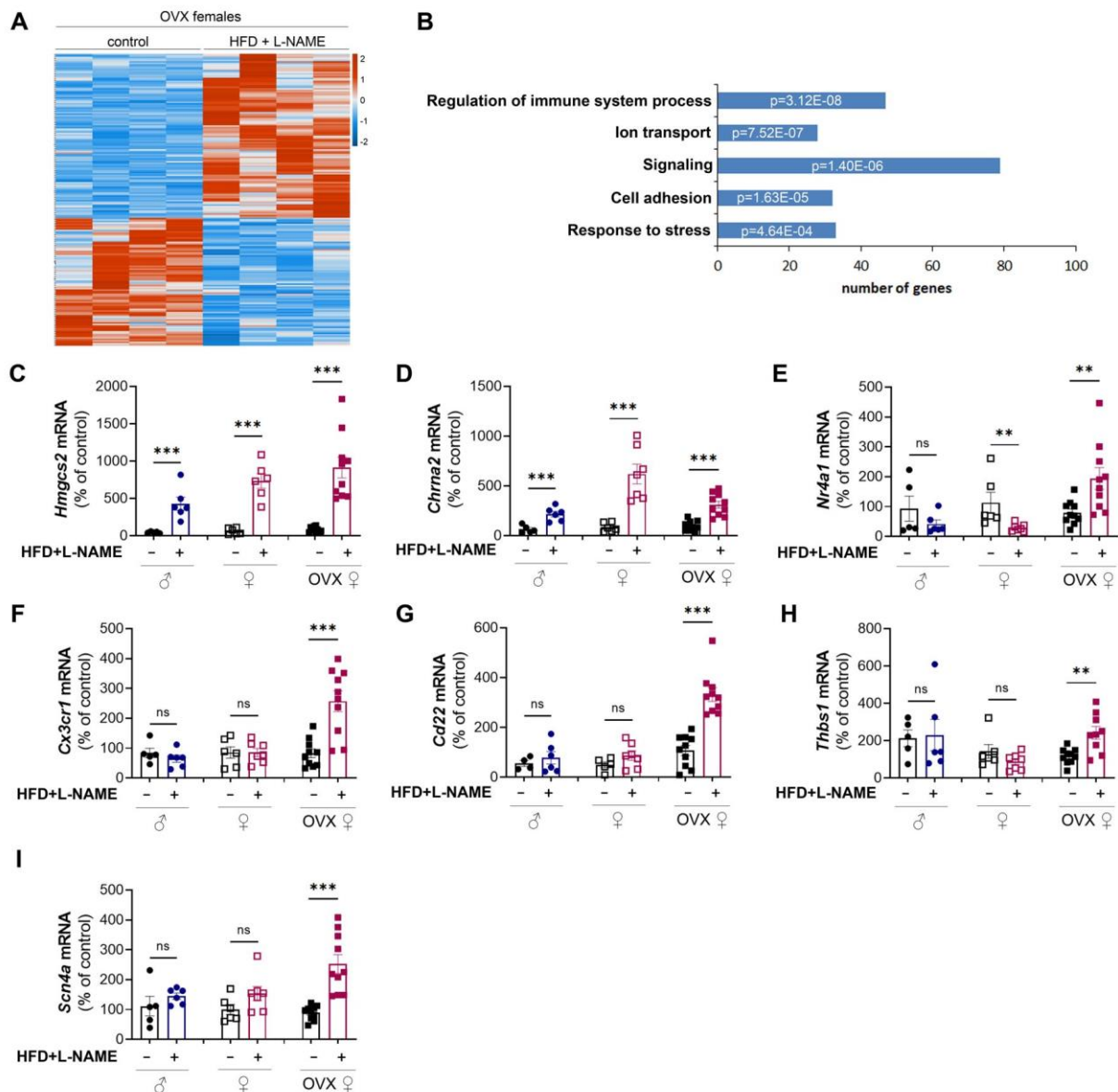


Figure 7:

C57BL/6 male and female mice were ovariectomized or not at 7 weeks of age, then submitted or not to a HFD regimen from 8 weeks of age and exposed or not to L-NAME (1 g/L in the drinking water) intermittently (4 days/week) from 10 week of age. Mice were sacrificed at 20 weeks of age. (A-B) RNA sequencing analysis was performed from total heart extracts of OVX females. (A) The heat map is shown. (B) An enrichment analysis of biological process was done using g:Profiler. *Hmgcs2* (C), *Chrna2* (D), *Nr4a1* (E), *Cx3cr1* (F), *Cd22* (G), *Thbs1* (H) and *Scn4a* (I), mRNA expression was quantified by RT-qPCR in total heart extract and normalized to *Actb* mRNA (n=5-10).

** : $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.001$, ns: not significant (Mann-Whitney test)

Increased endothelium activation and leakage do not promote diastolic dysfunction in the mouse model of HFpEF triggered by a high fat diet + L-NAME combination treatment.

Lauriane Cornuault, MS¹, Pierre Mora, PharmD¹, Paul Rouault, MS¹, Ninon Foussard, MD¹, Candice Chapouly, PharmD, PhD¹, Pilippe Alzieu, BS¹, Alain-Pierre Gadeau, PhD¹, Thierry Couffinhal, MD, PhD¹ and Marie-Ange Renault, PhD¹.

Supplementary data

Supplemental Tables

A/ List of primary antibodies

Target antigen	Vendor or Source	Catalog #	Working concentration
mouse PECAM-1 (CD31)	BMA Biomedicals	T-2001	2 µg/mL
mouse PODXL	R&D systems	AF1556	4 µg/mL
mouse Cy3-anti-sm α -actin	Sigma	C6198	5 µg/mL
mouse ACTN2	Sigma	A 2172	
mouse ICAM1 (CD54)	BD Pharmingen	550287	2.5 µg/mL
mouse VCAM1	Invitrogen	14-1061-82	
mouse FGB	Abcam	ab227063	
mouse COL1A1	Abcam	ab21285	
mouse CD41	Proteintech	18308-1-AP	3.5 µg/mL
mouse Myh7	Atlas antibodies	HPA001239	1 µg/mL
mouse CD45	BD Pharmingen	550539	0.625 µg/mL
mouse CD68	Biolegend	137001	5 µg/mL
mouse CD3	Santa-Cruz Biotechnology	sc-1127	
mouse B220	R&D systems	MAB1217	
mouse ATP2A2	Badrilla	A010-80	
phospho-PLN (Ser16)	Badrilla	A010-12	
phospho-PLN (Thr17)	Badrilla	A010-13	
total-PLN	Badrilla	A010-14	
phospho-RYR2 (Ser2814)	Badrilla	A010-31	
α -tubulin	Sigma	T5168	

B/ List of secondary antibodies

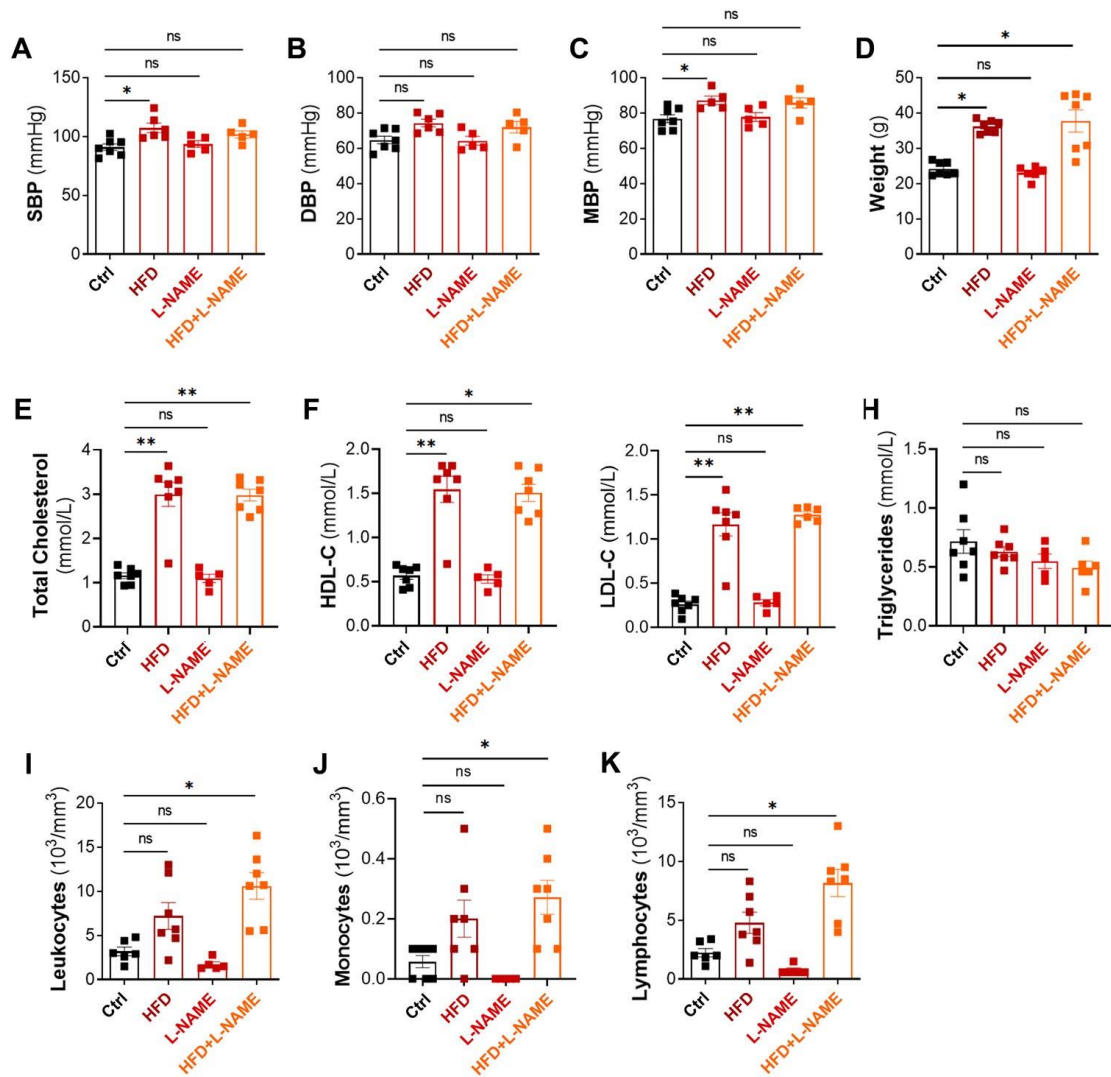
Target antigen	Conjugate	Vendor or Source	Catalog #	Working concentration
Rat IgG	Biotin	Jackson ImmunoResearch	712-065-153	Dilution 1/500
Goat IgG	Alexa Fluor 568	Invitrogen	A-11057	10 µg/mL
Rat IgG	Alexa Fluor 647	Invitrogen	A-48265	10 µg/mL
Hamster IgG	Biotin	Jackson ImmunoResearch	127-065-160	Dilution 1/500
Goat IgG	Alexa Fluor 488	Invitrogen	A-11055	10 µg/mL
Rabbit IgG	Alexa Fluor 488	Invitrogen	A-21206	10 µg/mL
Rabbit IgG	Alexa Fluor 568	Invitrogen	A-10042	10 µg/mL

Supplemental Table 1: List of antibodies used for immunostainings

mouse Col1a1	F	5' -CAACCTCAAGAAGGCCCTGC-3'
	R	5' -TGTCCAAGGGAGCCACATCG-3'
mouse Col3a1	F	5' -AGCACGAGGTCTTGCTGGAC-3'
	R	5' -ACCAGCTGTACCAGGCTGAC-3'
mouse Myh7	F	5' -GGATGACGTCACCTCCAACA-3'
	R	5' -AGATCAGAGCCTCCTTCTCGT-3'
mouse Nos2	F	5' -GCCAATGAGGTACTIONCAGCGT-3'
	R	5' -TCGCTCAAGTTCAGCTTGGT-3'
mouse Atp2a2 (Serca2a)	F	5' -GATCCTCTACGTGGAACCTTTG-3'
	R	5' -GGTAGATGTGTTGCTAACCAACG-3'

Supplemental Table 2: List of primers used for reverse transcription (RT) quantitative polymer chain reaction (qPCR). F: forward; R: reverse

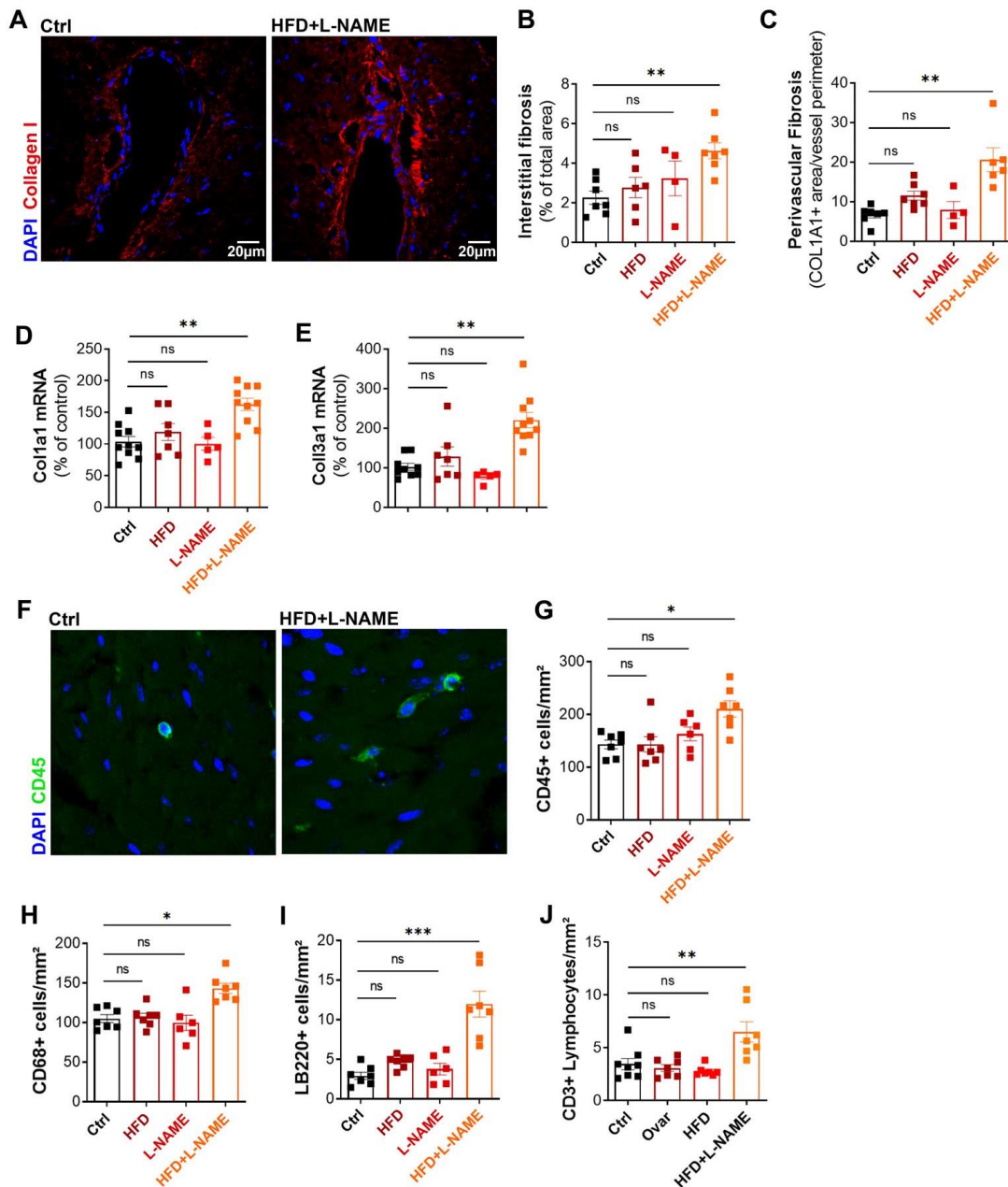
Supplemental Figures and figure legends



Supplemental figure 1: OVX female mice submitted to a HFD + L-NAME regimen display overweight, dyslipidaemia and low grade inflammation.

C57BL/6 female mice were ovariectomized at 7 weeks of age, then submitted or not to a HFD regimen from 8 weeks of age and exposed or not to L-NAME (1 g/L in the drinking water) intermittently (4 days/week) from 10 week of age. Measurements were done at 20 weeks of age. (A) Systolic, (B) diastolic and (C) mean blood pressures were measured via left ventricular catheterization. (D) Weight of mice was measured in each group. (E) Total cholesterol, (F) HDL-cholesterol, (G) LDL-cholesterol and (H) triglycerides were measured in plasma samples. (I) Leukocytes count, (J) monocyte count and (K) lymphocyte count were calculated in total blood samples.

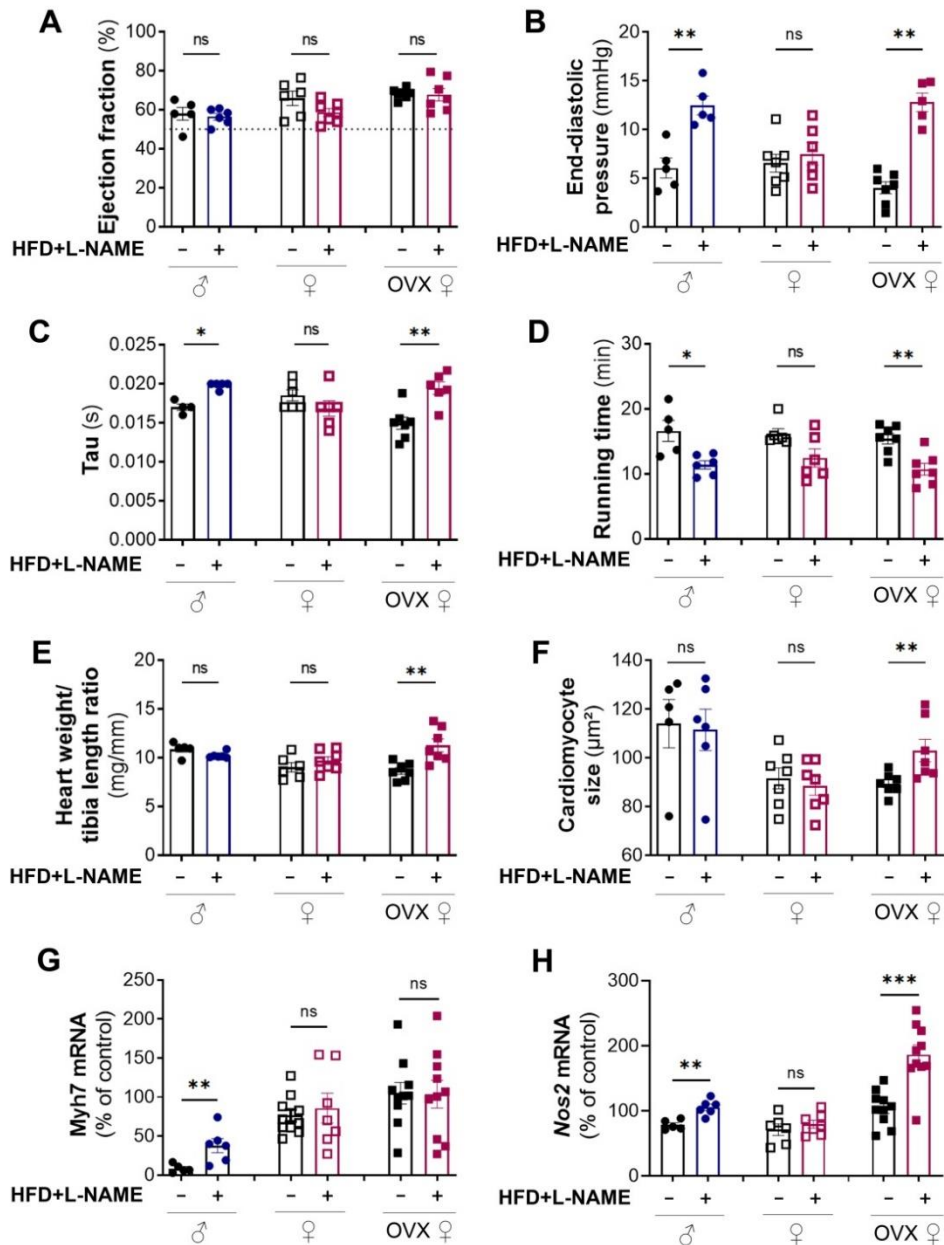
*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ns: not significant (Kruskal-Wallis test with Bonferroni post hoc)



Supplemental Figure 3: OVX female mice submitted to a HFD + L-NAME regimen display cardiac fibrosis and inflammation.

C57BL/6 female mice were ovariectomized at 7 weeks of age, then submitted or not to a HFD regimen from 8 weeks of age and exposed or not to L-NAME (1 g/L in the drinking water) intermittently (4 days/week) from 10 week of age. Mice were sacrificed at 20 weeks of age. **(A)** Heart cross sections were stained with anti-collagen I antibodies to identify fibrosis. **(B)** Interstitial fibrosis was quantified using Image J software (n=4-7). **(C)** Perivascular fibrosis was quantified using Image J software (n=4-7). **(D)** Col1a1 and **(E)** Col3a1 mRNA expression was quantified by RT-qPCR in total heart extract and normalized to Actb mRNA (n=5-10). **(F)** Heart cross sections were immunostained with anti-CD45 antibodies to identify leukocytes. The number of **(G)** CD45+ leukocytes, **(H)** CD68+ macrophages, **(I)** B220+ lymphocytes and **(J)** CD3+ lymphocytes per mm² was counted (n=6-7).

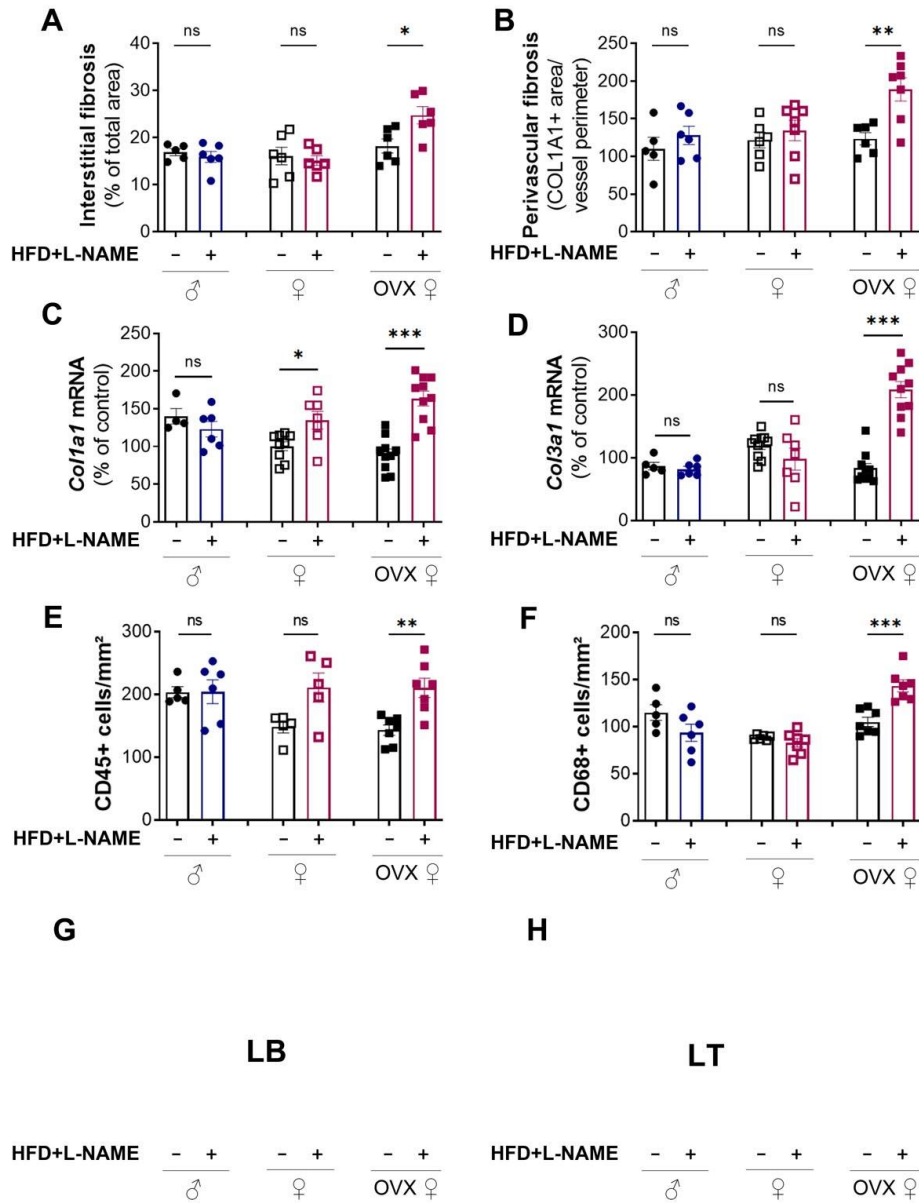
*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, ns: not significant (Kruskal-Wallis test with Bonferroni post hoc)



Supplemental Figure 4: Only male and OVX female mice submitted to a HFD + L-NAME regimen develop diastolic dysfunction.

C57BL/6 male and female mice were ovariectomized or not at 7 weeks of age, then submitted or not to a HFD regimen from 8 weeks of age and exposed or not to L-NAME (1 g/L in the drinking water) intermittently (4 days/week) from 10 week of age. Assessments were performed at 20 weeks of age. (A) Ejection fraction was assessed via echocardiography (n=5-6). (B) LV end diastolic pressure (EDP) was measured by left ventricular catheterization (n=5-6). (C) Tau was measured by left ventricular catheterization (n=5-6). (D) Running time was assessed on treadmill (n=5-6). (E) The heart weight over tibia length was measured (n=5-6). (F) Cardiomyocyte cross section area was measured using Image J software (n=5-6). (G) Myh7 mRNA expression was quantified by RT-qPCR in total heart extract and normalized to Actb mRNA (n=5-10). (H) Nos2 mRNA expression was quantified by RT-qPCR in total heart extract and normalized to Actb mRNA (n=5-10).

*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ns: not significant (Mann-Whitney test).



Supplemental Figure 5: only OVX female mice submitted to a HFD + L-NAME regimen display cardiac fibrosis. Both OVX and non OVX female display cardiac inflammation

C57BL/6 male and female mice were ovariectomized or not at 7 weeks of age, then submitted or not to a HFD regimen from 8 weeks of age and exposed or not to L-NAME (1 g/L in the drinking water) intermittently (4 days/week) from 10 week of age. Mice were sacrificed at 20 weeks of age.

(A) Interstitial fibrosis was quantified using Image J software (n=5-8). (B) Perivascular fibrosis was quantified using Image J software (n=5-8). (C) Col1a1 and (D) Col3a1 mRNA expression was quantified by RT-qPCR in total heart extract and normalized to Actb mRNA (n=5-10). The number of (E) CD45+ leukocytes and (F) CD68+ macrophages per mm² was counted (n=5-10).

*: p≤0.05, **: p≤0.01, ***: p≤0.001, ns: not significant (Mann-Whitney test)

D. Prévenir la dysfonction endothéliale ne prévient pas la dysfonction diastolique dans le modèle *Lepr^{db/db}*

Pour confirmer les résultats obtenus à l'aide des souris *Cdon^{ECKO}*, nous avons utilisé un second modèle murin d'ICFep : les souris *Lepr^{db/db}*.

Le laboratoire a déjà caractérisé ces souris et a montré qu'elles présentent une augmentation significative de la pression télédiastolique du VG dès 3 mois tout en préservant une FEVG au-dessus de 50 %. Cette dysfonction diastolique est associée à une hypertrophie des cardiomyocytes ainsi qu'à un épaississement de la paroi postérieure du VG. Sur le plan microvasculaire, les souris *Lepr^{db/db}* ont une raréfaction capillaire, une perméabilité aux protéines plasmatiques augmentée ainsi qu'une activation des CE caractérisées par une expression augmentée des molécules d'adhésion et une infiltration de cellules inflammatoires dans le cœur (Guimbal et al. 2021).

Pour mettre en évidence le rôle de la dysfonction endothéliale dans l'installation de la dysfonction diastolique dans ce modèle, nous avons injecté par voie intrapéritonéale, pendant 28 jours consécutifs, du SAG, un agoniste du récepteur Smo de la voie Hedgehog, promouvant l'intégrité endothéliale.

Le SAG prévient l'inflammation et l'activation endothéliale. Les souris *Lepr^{db/db}* présentent une infiltration de leucocytes CD45+ et de monocytes/macrophages CD68+ augmentée par rapport aux souris contrôles non diabétiques. Cette infiltration de cellules inflammatoires est diminuée chez les souris traitées par SAG (Fig 33 A, B et C).

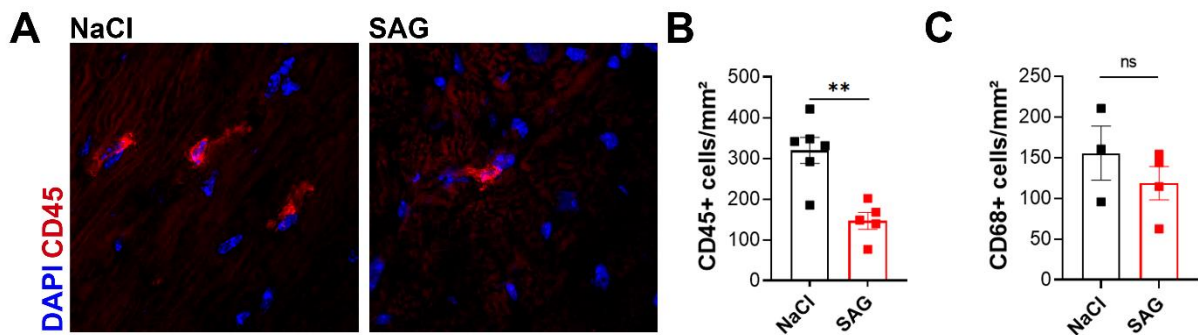


Figure 33 Le SAG réduit l'inflammation chez les souris *Lepr^{db/db}*

(A) Les coupes transversales de cœur ont été marquées avec des anticorps anti-CD45 pour identifier les leucocytes. (B) Le nombre de leucocytes CD45+ par mm² a été compté grâce au logiciel Image J (n=5-6). (C) Le nombre de monocytes/macrophages CD68+ par mm² a été compté grâce au logiciel Image J (n=3-4). * : p<0,05, ** : p<0,01, *** : p<0,001, ns : non significatif (test de Mann-Whitney)

De plus, sans modification de la densité capillaire (Fig 34 F), le SAG prévient également l'augmentation de l'expression de la molécule d'adhésion ICAM1, comme le montre nos résultats d'immunofluorescence (Fig 34 D, E). Le traitement par le SAG prévient donc bien la dysfonction endothéliale présente chez les souris *Lepr^{db/db}*.

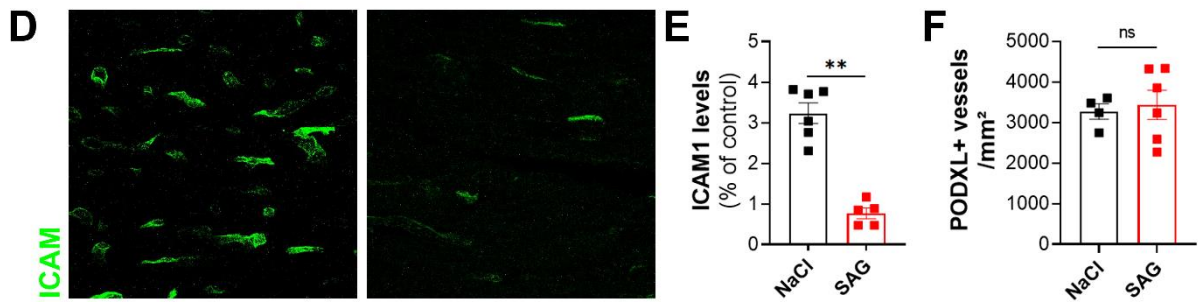


Figure 34 Le SAG réduit l'activation endothéliale chez les souris *Lepr^{db/db}*

(D) Des coupes transversales de cœur ont été marquées avec des anticorps anti-ICAM1. (E) La surface d'ICAM1 a été quantifiée à l'aide du logiciel Image J (n = 5-6). (F) Le nombre de capillaires PODXL+ par mm² a été compté (n = 4-5). * : $p \leq 0,05$, ** : $p \leq 0,01$, *** : $p \leq 0,001$, ns : non significatif (test de Mann-Whitney)

Pour savoir si le SAG prévenait la dysfonction diastolique, nous avons évalué la fonction cardiaque des souris *Lepr^{db/db}* par échocardiographie et cathétérisme. La FEVG, la pression télédiastolique du VG et tau (Fig 35 G, H, I) sont identiques entre le groupe placebo traité par NaCl et le groupe traité avec le SAG. Le SAG n'améliore donc pas la fonction diastolique des souris.

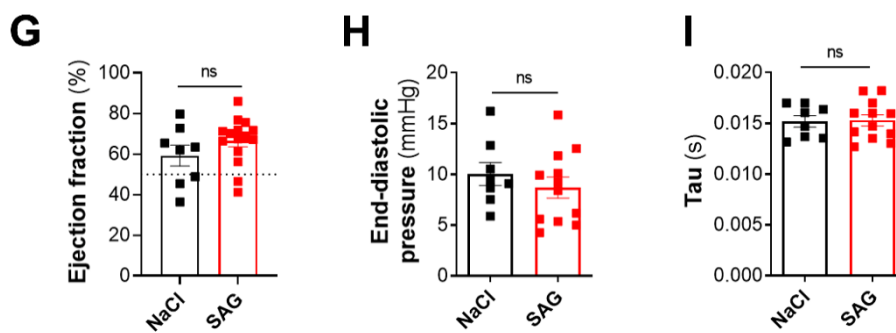


Figure 35 Le SAG n'améliore pas la fonction diastolique chez les souris *Lepr^{db/db}*

(G) La fraction d'éjection a été évaluée par échocardiographie (n = 8-12). (H) La pression diastolique terminale LV (EDP) a été mesurée par cathétérisme ventriculaire gauche (n = 8-12). (I) Tau a été mesuré par cathétérisme ventriculaire gauche (n = 8-12). * : $p \leq 0,05$, ** : $p \leq 0,01$, *** : $p \leq 0,001$, ns : non significatif (test de Mann-Whitney)

Le SAG n'a pas non plus d'effet sur le remodelage cardiaque des souris *Lepr^{db/db}* puisque le poids du cœur (Fig 36 J), la masse du VG (K) ainsi que la taille des cardiomyocytes (L) ne sont pas modifiés entre les deux groupes. Quant à la fibrose, le SAG n'a pas non plus d'effet, ni sur la fibrose interstitielle (N), ni sur la périvasculaire (M, O).

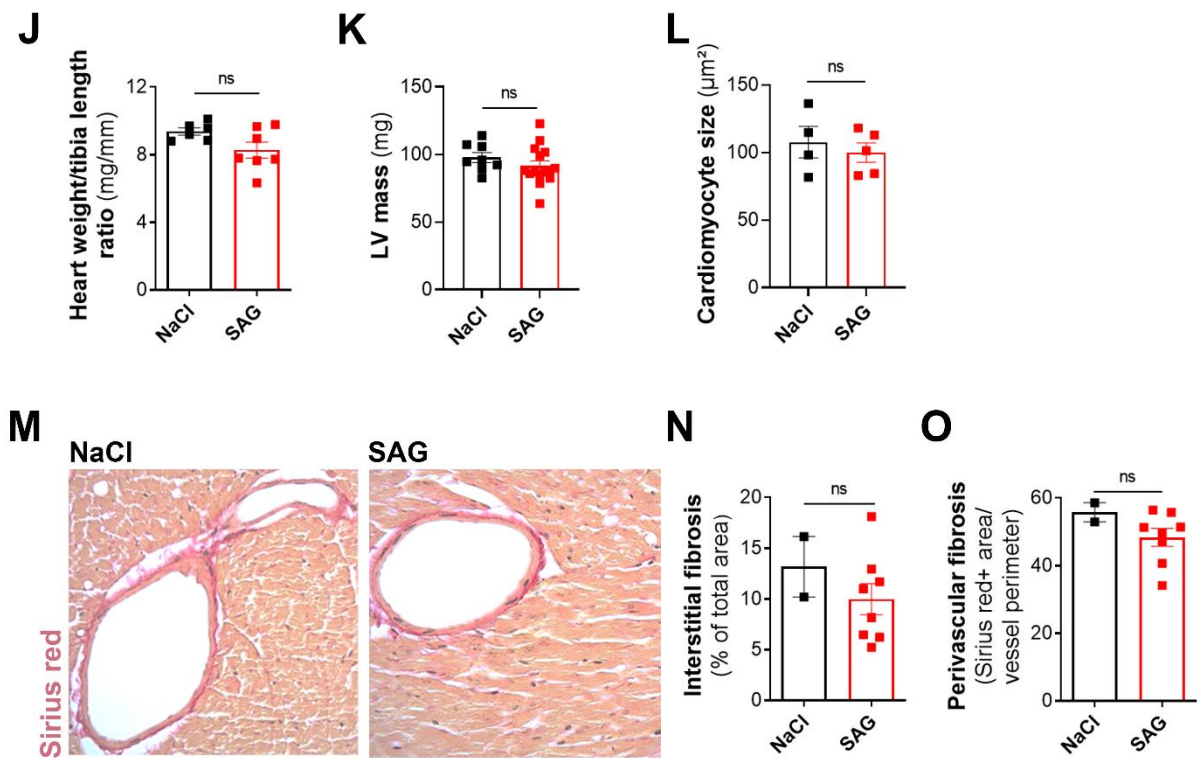


Figure 36 Le SAG n'a pas d'effet sur le remodelage cardiaque chez les souris *Lepr^{db/db}*

(J) Le poids du cœur sur la longueur du tibia a été mesuré (n = 6-7). (K) La masse du LV a été évaluée par échocardiographie (n = 8-12). (L) La section transversale des cardiomyocytes a été mesurée à l'aide du logiciel Image J (n = 4-5). (M) Les coupes transversales du cœur ont été colorées avec du rouge Sirius pour identifier la fibrose. (N) La fibrose interstitielle a été quantifiée à l'aide du logiciel Image J (n = 2-8). (O) La fibrose périvasculaire a été quantifiée à l'aide du logiciel Image J (n = 2-8). *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$, ns : non significatif (test de Mann-Whitney)

Ainsi, le traitement par l'agoniste de la voie Hedgehog prévient bien la dysfonction endothéliale comme attendu, mais ne prévient pas la dysfonction cardiaque. Les résultats avec le SAG chez les *Lepr^{db/db}* sont donc concordants avec ceux obtenus à l'aide des souris *Cdon^{ECKO}* sous HFD et L-NAME. Ces données confirment le fait que la dysfonction endothéliale n'est pas le seul mécanisme impliqué dans le développement de la dysfonction diastolique retrouvée dans l'ICFep.

DISCUSSION

I. Péricytes cardiaques

Les péricytes cardiaques sont le deuxième type de cellules le plus courant dans le cœur après les cellules endothéliales. Ils sont connus pour leur rôle dans le maintien de la structure des microvaisseaux cardiaques, mais aussi dans le développement du cœur (Van den Akker et al. 2008). De plus, il est connu que les péricytes sont affectés dans plusieurs pathologies cardiaques comme l'infarctus du myocarde (Alex et Frangogiannis 2019). Cependant, leur rôle sur la fonction cardiaque a été peu exploré.

Pour mieux comprendre le rôle des péricytes sur le phénotype des cellules endothéliales cardiaques et la fonction cardiaque, nous avons mis au point un modèle de souris déplétées de leurs péricytes.

A. Péricytes cardiaques nécessaires à l'intégrité endothéliale

Dans cette étude, nous avons caractérisé l'organisation des péricytes dans le cœur sain et avons pu confirmer leur rôle sur l'intégrité endothéliale notamment sur la perméabilité et l'activation des CE, *in vitro* et *in vivo*. Tout comme dans le cerveau, les péricytes et les CE jouent un rôle de barrière dans le cœur. Les péricytes cardiaques stabilisent notamment les jonctions.

Il serait intéressant de réaliser cette caractérisation dans un modèle pathologique. Leur organisation autour des microvaisseaux cardiaques et leur morphologie pourraient être, en effet, affectées dans un modèle d'insuffisance cardiaque. Ce changement pourrait alors induire un défaut de communication CE-péricytes.

B. Péricytes cardiaques nécessaires à la fonction cardiaque

Notre étude des péricytes cardiaques a ensuite démontré pour la première fois que les péricytes sont nécessaires à l'intégrité endothéliale dans le cœur, mais également au bon fonctionnement cardiaque, ce qui suggère que des modifications des péricytes peuvent participer à la physiopathologie des maladies cardiaques. Cependant, il est peu probable qu'une raréfaction des péricytes participe à la physiopathologie de l'ICFep puisque celle-ci induit une dysfonction systolique.

La dysfonction cardiaque, observée lors d'un traitement médicamenteux ou lors d'un stress inflammatoire, a déjà été associée à une perte de péricytes (Chintalgattu, Rees, Culver, Goel, Jiffar, Zhang, Jr, et al. 2013; X. He, Zeng, et Chen 2016a). Cependant, le rôle des péricytes dans la dysfonction cardiaque dans ces modèles n'a pas été démontré. Notre étude démontre que la perte de péricytes est la cause de la dysfonction cardiaque et confirme que les péricytes sont nécessaires au bon fonctionnement de la contractilité cardiaque et de la fonction systolique. Cependant, la perte de péricytes ne semble pas favoriser la fibrose cardiaque, l'hypertrophie ou la dilatation.

Nos données suggèrent que l'altération des péricytes entraîne une dérégulation de SERCA2a et de la Cx43. Mais savoir si les péricytes peuvent ou non dialoguer directement avec les cardiomyocytes reste à approfondir. Une autre étude soumet l'hypothèse que les péricytes peuvent dialoguer avec les cardiomyocytes directement via le transfert de MiR-32 (R. Katare et al. 2011).

C. Renouveau des péricytes

Cette étude révèle également que les péricytes cardiaques sont renouvelés (renouveau et expression de SMA).

Ceci est cohérent avec ce qui a été observé chez les rats ZSF1 obèses et hypertendus (van Dijk et al. 2016) chez lesquels les péricytes se sont révélés désorganisés et plus nombreux. L'altération des péricytes cardiaques est caractérisée par des changements phénotypiques avec l'acquisition d'un phénotype « activé ». Le nombre de péricytes est, en effet, augmenté dans le cœur de souris sous Ang II et ces péricytes expriment des niveaux plus élevés de SMA (Su et al. 2020). Dans notre modèle, la diminution de péricytes induit l'activation et le renouvellement des péricytes.

Pour étudier le renouvellement des péricytes, il serait envisageable de réaliser une cinétique de réapparition des péricytes et de caractériser ces nouveaux péricytes. La perte de péricytes serait induite dans un modèle murin puis les péricytes cardiaques seraient analysés à différents temps après induction de la perte de péricytes. Il faudrait alors déterminer si ces nouveaux péricytes proviennent des péricytes restants ou des cellules endothéliales à leur contact.

L'une des principales limites de cette étude est d'ordre technique, car un modèle murin ciblant les péricytes cardiaques manque pour obtenir une caractérisation robuste et spécifique du rôle des péricytes cardiaques. De plus, nous n'avons pas encore assez de données sur les péricytes cardiaques dans les pathologies humaines pour savoir si étudier la perte de péricytes est cliniquement pertinent. Il serait intéressant d'obtenir des biopsies cardiaques pour caractériser et quantifier les péricytes cardiaques.

II. Dysfonction endothéliale et ICFEp

Nous avons choisi d'appliquer le modèle HFD+L-NAME aux souris mâles, femelles et femelles ovariectomisées et de manière intéressante, nous avons pu constater un dimorphisme sexuel.

Nous avons également mis en évidence la dysfonction endothéliale dans ce modèle et que cette dysfonction endothéliale caractérisée par l'activation et la perméabilité vasculaire n'est pas le seul mécanisme responsable de la dysfonction diastolique. En effet, empêcher cette dysfonction endothéliale ne suffit pas à prévenir la dysfonction cardiaque.

A. Dimorphisme sexuel

L'étude met aussi en évidence un dimorphisme sexuel qui est largement retrouvé dans les maladies cardiovasculaires humaines telles que l'ICFEp. Les mâles et les femelles non ovariectomisées avec HFD+L-NAME ne présentent pas le même phénotype cardiaque et endothélial que les souris femelles

ovariectomisées. En effet, les femelles non ovariectomisées présentent une dysfonction endothéliale, mais pas de dysfonction diastolique après 3 mois de régime HFD+L-NAME. Cela confirme le potentiel effet protecteur du sexe féminin sur la fonction cardiaque.

1. Dysfonction endothéliale

Le fait que seules les souris femelles présentent une dysfonction endothéliale suggère que les œstrogènes ne protègent pas de la dysfonction endothéliale. Cependant, les souris femelles non ovariectomisées, malgré leur dysfonction endothéliale, ne développent pas de dysfonction diastolique contrairement aux souris ovariectomisées. Les œstrogènes semblent donc cardioprotecteurs. Les œstrogènes protégeant de la dysfonction cardiaque, il serait intéressant d'étudier leur mécanisme d'action, notamment de déterminer sur quelles cellules ils agissent. Regarder si c'est le récepteur ER α des CE ou celui des cardiomyocytes qui est impliqué pourrait, en effet, apporter de nouvelles informations. Pour cela, un modèle de souris ER α KO dans les CE spécifiquement, grâce au promoteur *Cdh5*, ou dans les cardiomyocytes, grâce au promoteur *Myh6*, qu'on soumettrait au régime HFD+L-NAME pourrait être développé. Pour en savoir plus sur le rôle des hormones mâles et voir leur impact sur la fonction endothéliale et la fonction cardiaque, nous pourrions appliquer le régime HFD+L-NAME à des mâles castrés.

2. Inflammation

Les patients atteints d'ICFEP présentent une inflammation systémique avec une augmentation des cytokines et cellules inflammatoires circulantes, mais aussi tissulaires (Westermann et al. 2011). Cette infiltration de cellules inflammatoires est associée au développement de la fibrose. Nous retrouvons cette inflammation et cette fibrose chez nos souris femelles. De manière intéressante, les souris femelles ovariectomisées présentent une infiltration de lymphocytes B et T. Or, les lymphocytes T des patients atteints d'ICFEP seraient davantage capables d'adhérer à l'endothélium que ceux des patients sains (Nevers et al. 2015). De plus, l'infiltration lymphocytaire est associée à une fibrose cardiaque associée à une sécrétion accrue de TGF β . Cependant, le traitement par colchicine n'a pas empêché l'apparition de la fibrose chez nos souris malgré une baisse significative de l'infiltration des cellules immunitaires.

Chez nos souris, l'inflammation n'est retrouvée que chez les femelles ovariectomisées. L'absence d'infiltration de cellules inflammatoires chez les souris femelles non ovariectomisées peut s'expliquer par l'effet protecteur des œstrogènes qui réduisent notamment la réponse inflammatoire (Anne A. Knowlton 2012; A.A. Knowlton et Korzick 2014).

3. Remodelage cardiaque

Comme chez l'Homme, le remodelage cardiaque diffère en fonction du sexe chez nos souris. Les femmes postménopause atteintes d'ICFEP présentent davantage d'hypertrophie concentrique que les hommes. C'est également le cas de nos souris : les souris femelles ovariectomisées présentent une

hypertrophie cardiaque avec augmentation du poids du cœur et de la taille des cardiomyocytes alors que les mâles ont une augmentation de l'expression de *Myh7* signant une différenciation des cardiomyocytes. Les femelles non ovariectomisées sont préservées. Les œstrogènes sont connus pour atténuer, voire empêcher l'hypertrophie (Murphy 2011).

D'une même manière, seules les femelles ovariectomisées développent une fibrose cardiaque à la fois interstitielle et périvasculaire avec augmentation de l'expression de collagène.

4. Mécanismes

a) Mécanisme commun

Les mâles et les femelles ovariectomisées présentent une fonction diastolique altérée avec augmentation de la pression télédiastolique. Un point commun est retrouvé entre les différents groupes : l'augmentation d'expression de la NOS2. La NOS2 peut être exprimée par les cellules inflammatoires infiltrées, les CE, les CML, les fibroblastes et les cardiomyocytes en fonction du stimulus (A. Shah 2000). Elle est d'ailleurs surexprimée dans les cardiomyocytes des souris HFD+L-NAME dans l'étude de Schiattarella (Schiattarella et al. 2019). Cette surexpression induit une production accrue de NO inhibant l'épissage de *Xbp1* menant à l'accumulation de FOXO1 dans les cardiomyocytes. Cette accumulation expliquerait la dysfonction diastolique chez ces souris. En outre, le NO produit par la NOS2 entraînerait une diminution de la contraction des cardiomyocytes pouvant expliquer la dysfonction cardiaque (A. Shah 2000). La NOS2 serait notamment induite par des niveaux importants de cytokines pro-inflammatoires.

b) Mécanismes différents

Le mécanisme d'apparition de cette dysfonction pourrait aussi être différent entre les mâles et les femelles. L'apparition de cette dysfonction diastolique chez les mâles est associée à la différenciation des cardiomyocytes avec l'augmentation de l'expression de *Myh7* tandis que chez les femelles ovariectomisées, la dysfonction diastolique est associée à l'hypertrophie du ventricule gauche, à la fibrose, à l'inflammation et à la dysfonction endothéliale.

Cependant, nos résultats obtenus grâce aux souris *Cdon*^{ECKO} HFD+L-NAME et aux souris HFD+L-NAME traitées par colchicine montrent que l'inflammation et la dysfonction endothéliale ne permettent pas à elles seules de provoquer la dysfonction diastolique. Les mécanismes potentiels restants sont alors la fibrose et l'hypertrophie. Nous ne pouvons cependant pas exclure totalement la dysfonction endothéliale comme cause du développement de la dysfonction diastolique, car nous n'avons pas exploré tous les aspects de la dysfonction endothéliale.

B. La dysfonction endothéliale n'est pas suffisante pour induire l'ICFEP

Le paradigme actuel de l'ICFEP propose que le remodelage et la dysfonction cardiaque résultent de comorbidités induisant un état inflammatoire qui conduit à un dysfonctionnement de la CE. Nos

résultats prouvent que la prévention de la dysfonction endothéliale, en utilisant la voie de signalisation Hedgehog avec une délétion endothéliale du co-récepteur *Cdon*, ne semble pas suffisante pour prévenir la dysfonction diastolique ni le remodelage. Les souris *Cdon*^{ECKO} HFD+L-NAME présentent, en effet, une augmentation de la pression télédiastolique associée à une hypertrophie et une fibrose cardiaque.

Ces résultats ont été retrouvés dans un second modèle de dysfonction diastolique : des souris femelles *Lepr*^{db/db} diabétiques et obèses. Ces souris développent une dysfonction endothéliale et une dysfonction cardiaque dès 3 mois (Guimbal et al. 2021). En les traitant par un agoniste de la voie Hedgehog, le SAG, pour prévenir la dysfonction endothéliale, nous n'avons pas réussi à prévenir la dysfonction diastolique (pression télédiastolique toujours élevée).

C. L'inflammation n'est pas suffisante pour induire l'ICFEP

Nous avons également traité les souris HFD+L-NAME avec la colchicine, anti-inflammatoire, qui a donné des résultats similaires : l'inflammation et l'activation endothéliale sont prévenues, mais pas la dysfonction diastolique. L'inflammation ne semble donc pas être suffisante pour induire l'ICFEP dans le modèle HFD+L-NAME. Cependant, le laboratoire a précédemment montré que les mastocytes jouaient un rôle important dans le développement de la pathologie (Guimbal et al. 2021). Les souris *Lepr*^{db/db} présentent une activation accrue des mastocytes et le blocage de la libération du contenu des granules des mastocytes par le cromoglycate de sodium ou le blocage des récepteurs histaminiques H1 ont prévenu la dysfonction diastolique.

D. Mécanismes responsables de la fibrose et de l'hypertrophie inconnus

Dans les trois modèles de thérapie (*Cdon*^{ECKO}, SAG et colchicine), l'hypertrophie et la fibrose sont toujours présentes malgré une amélioration endothéliale suggérant que ce n'est pas la maladie des petits vaisseaux qui induit le remodelage cardiaque. Les mécanismes induisant le remodelage cardiaque restent donc à découvrir et à étudier pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter l'ICFEP.

E. Conclusion

Nos résultats indiquent que cibler la dysfonction endothéliale ou l'inflammation dans l'ICFEP ne semble pas pertinent. Cependant, il serait nécessaire de tester ces thérapies dans d'autres modèles.

Les effets des inhibiteurs du SGLT2 étant bénéfiques chez les patients atteints d'ICFEP, il serait intéressant de comprendre comment ils agissent sur le cœur.

BIBLIOGRAPHIE

- « 17 β -Estradiol Antagonizes Cardiomyocyte Hypertrophy by Autocrine/Paracrine Stimulation of a Guanylyl Cyclase A Receptor-Cyclic Guanosine Monophosphate-Dependent Protein Kinase Pathway ». s. d., 8.
- « 2021_Deng, Li_Targeting Mitochondria-Inflammation Circuit by β -Hydroxybutyrate Mitigates HFpEF.pdf ». s. d.
- Abelanet, Alice, Marion Camoin, Sebastien Rubin, Pauline Bougaran, Valentin Delobel, Mathieu Pernot, Isabelle Forfar, et al. 2022. « Increased Capillary Permeability in Heart Induces Diastolic Dysfunction Independently of Inflammation, Fibrosis, or Cardiomyocyte Dysfunction ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, mai, 101161ATVBAHA121317319. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.121.317319>.
- Abu-Taha, May, Cristina Rius, Carlos Hermenegildo, Inmaculada Noguera, Jose-Miguel Cerda-Nicolas, Andrew C. Issekutz, Peter J. Jose, Julio Cortijo, Esteban J. Morcillo, et Maria-Jesus Sanz. 2009. « Menopause and Ovariectomy Cause a Low Grade of Systemic Inflammation That May Be Prevented by Chronic Treatment with Low Doses of Estrogen or Losartan ». *The Journal of Immunology* 183 (2): 1393-1402. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803157>.
- Adams, Volker, Marcia Alves, Tina Fischer, Natale Rolim, Sarah Werner, Nicole Schütt, T. Scott Bowen, Axel Linke, Gerhard Schuler, et Ulrik Wisloff. 2015. « High-Intensity Interval Training Attenuates Endothelial Dysfunction in a Dahl Salt-Sensitive Rat Model of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction ». *Journal of Applied Physiology* 119 (6): 745-52. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01123.2014>.
- AgouTii, Abdelali, H. Ahmed Mostefai, Chiarra Porro, Nunzia Carusio, Julie Favre, Vincent Richard, Daniel Henrion, M. Carmen Martinez, et Ramarosan Andriantsitohaina. 2007. « Sonic Hedgehog Carried by Microparticles Corrects Endothelial Injury through Nitric Oxide Release ». *The FASEB Journal* 21 (11): 2735-41. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8079com>.
- Ahmed, S. Hinan, Leslie L. Clark, Weems R. Pennington, Carson S. Webb, D. Dirk Bonnema, Amy H. Leonardi, Catherine D. McClure, Francis G. Spinale, et Michael R. Zile. 2006. « Matrix Metalloproteinases/Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Relationship between Changes in Proteolytic Determinants of Matrix Composition and Structural, Functional, and Clinical Manifestations of Hypertensive Heart Disease ». *Circulation* 113 (17): 2089-96. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.573865>.
- Akishita, Masahiro, Koichi Kozaki, Masato Eto, Masao Yoshizumi, Michiro Ishikawa, Kenji Toba, Hajime Orimo, et Yasuyoshi Ouchi. 1998. « Estrogen Attenuates Endothelin-1 Production by Bovine Endothelial Cells via Estrogen Receptor ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 251 (1): 17-21. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9409>.
- ALBERTS, BRUCE. 2017. *BIOLOGIE MOLCULAIRE DE LA CELLULE*. Place of publication not identified: EDUCA Books.
- Alex, Linda, et Nikolaos G Frangogiannis. 2019. « Pericytes in the Infarcted Heart ». *Vascular Biology* 1 (1): H23-31. <https://doi.org/10.1530/VB-19-0007>.
- Alex, Linda, Ilaria Russo, Volodymir Holoborodko, et Nikolaos G Frangogiannis. 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): H934-49. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00238.2018>.
- Allen, Benjamin L., Toyooki Tenzen, et Andrew P. McMahon. 2007. « The Hedgehog-Binding Proteins Gas1 and Cdo Cooperate to Positively Regulate Shh Signaling during Mouse Development ». *Genes & Development* 21 (10): 1244-57. <https://doi.org/10.1101/gad.1543607>.
- Allen, Benjamin L., Jane Y. Song, Luisa Izzi, Irene W. Althaus, Jong-Sun Kang, Frédéric Charron, Robert S. Krauss, et Andrew P. McMahon. 2011. « Overlapping Roles and Collective

- Requirement for the Coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH Pathway Function ». *Developmental Cell* 20 (6): 775-87. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.04.018>.
- Ally, Ahmmed, Isabella Powell, Minori M. Ally, Kevin Chaitoff, et Surya M. Nauli. 2020. « Role of Neuronal Nitric Oxide Synthase on Cardiovascular Functions in Physiological and Pathophysiological States ». *Nitric Oxide* 102 (septembre): 52-73. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.06.004>.
- Alvarez, J. I., A. Dodelet-Devillers, H. Kebir, I. Ifergan, P. J. Fabre, S. Terouz, M. Sabbagh, et al. 2011. « The Hedgehog Pathway Promotes Blood-Brain Barrier Integrity and CNS Immune Quiescence ». *Science* 334 (6063): 1727-31. <https://doi.org/10.1126/science.1206936>.
- Alvarez, Jorge Ivan, Aurore Dodelet-Devillers, Hania Kebir, Igal Ifergan, Pierre J. Fabre, Simone Terouz, Mike Sabbagh, et al. 2011. « The Hedgehog Pathway Promotes Blood-Brain Barrier Integrity and CNS Immune Quiescence ». *Science* 334 (6063): 1727-31. <https://doi.org/10.1126/science.1206936>.
- Alvino, Valeria Vincenza, Rodrigo Fernández-Jiménez, Iker Rodríguez-Arabaolaza, Sadie Slater, Giuseppe Mangialardi, Elisa Avolio, Helen Spencer, et al. 2018. « Transplantation of Allogeneic Pericytes Improves Myocardial Vascularization and Reduces Interstitial Fibrosis in a Swine Model of Reperfused Acute Myocardial Infarction ». *Journal of the American Heart Association* 7 (2): e006727. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006727>.
- Anker, Stefan D., Javed Butler, Gerasimos Filippatos, João P. Ferreira, Edimar Bocchi, Michael Böhm, Hans-Peter Brunner-La Rocca, et al. 2021. « Empagliflozin in Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction ». *New England Journal of Medicine* 385 (16): 1451-61. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107038>.
- Aravani, Dimitra, Gavin E. Morris, Peter D. Jones, Helena K. Tattersall, Elisavet Karamanavi, Michael A. Kaiser, Renata B. Kostogrys, et al. 2019. « HHIPL1, a Gene at the 14q32 Coronary Artery Disease Locus, Positively Regulates Hedgehog Signaling and Promotes Atherosclerosis ». *Circulation* 140 (6): 500-513. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041059>.
- Armstrong, Paul W., Carolyn S. P. Lam, Kevin J. Anstrom, Justin Ezekowitz, Adrian F. Hernandez, Christopher M. O'Connor, Burkert Pieske, et al. 2020. « Effect of Vericiguat vs Placebo on Quality of Life in Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction: The VITALITY-HFpEF Randomized Clinical Trial ». *JAMA* 324 (15): 1512-21. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.15922>.
- Armulik, Annika, Alexandra Abramsson, et Christer Betsholtz. 2005. « Endothelial/Pericyte Interactions ». *Circulation Research* 97 (6): 512-23. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7>.
- Armulik, Annika, Guillem Genové, et Christer Betsholtz. 2011. « Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises ». *Developmental Cell* 21 (2): 193-215. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.001>.
- Armulik, Annika, Guillem Genové, Maarja Mäe, Maya H. Nisancioglu, Elisabet Wallgard, Colin Niaudet, Liqun He, et al. 2010. « Pericytes Regulate the Blood-Brain Barrier ». *Nature* 468 (7323): 557-61. <https://doi.org/10.1038/nature09522>.
- Arnal, Jean-Francois, Coralie Fontaine, Audrey Billon-Galés, Julie Favre, Henrik Laurell, Françoise Lenfant, et Pierre Gourdy. s. d. « Estrogen Receptors and Endothelium », 7.
- Aroor, Annayya R., Nitin A. Das, Andrea J. Carpenter, Javad Habibi, Guanghong Jia, Francisco I. Ramirez-Perez, Luis Martinez-Lemus, et al. 2018. « Glycemic Control by the SGLT2 Inhibitor Empagliflozin Decreases Aortic Stiffness, Renal Resistivity Index and Kidney Injury ». *Cardiovascular Diabetology* 17 (1): 108. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0750-8>.
- Aroor, Annayya R., Javad Habibi, Hemanth Kumar Kandikattu, Mona Garro-Kacher, Brady Barron, Dongqing Chen, Melvin R. Hayden, et al. 2017. « Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) Inhibition with Linagliptin Reduces Western Diet-Induced Myocardial TRAF3IP2 Expression, Inflammation and Fibrosis in Female Mice ». *Cardiovascular Diabetology* 16 (1): 61. <https://doi.org/10.1186/s12933-017-0544-4>.

- Azzoni, E., V. Conti, L. Campana, A. Dellavalle, R. H. Adams, G. Cossu, et S. Brunelli. 2014. « Hemogenic Endothelium Generates Mesoangioblasts That Contribute to Several Mesodermal Lineages in Vivo ». *Development* 141 (9): 1821-34. <https://doi.org/10.1242/dev.103242> 141/9/1821 [pii].
- Baartscheer, Antonius, Cees A. Schumacher, Rob C. I. Wüst, Jan W. T. Fiolet, Ger J. M. Stienen, Ruben Coronel, et Coert J. Zuurbier. 2017. « Empagliflozin Decreases Myocardial Cytoplasmic Na⁺ through Inhibition of the Cardiac Na⁺/H⁺ Exchanger in Rats and Rabbits ». *Diabetologia* 60 (3): 568-73. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4134-x>.
- Baliga, Ragavendra R., David R. Pimental, You-Yang Zhao, William W. Simmons, Mark A. Marchionni, Douglas B. Sawyer, et Ralph A. Kelly. 1999. « NRG-1-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy. Role of PI-3-Kinase, P70^{S6K}, and MEK-MAPK-RSK ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 277 (5): H2026-37. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.277.5.H2026>.
- Belkahlia, Hanene, Joana C. Antunes, Yoann Lalatonne, Odile Sainte Catherine, Corinne Illoul, Clément Journé, Martine Jandrot-Perrus, et al. 2020. « USPIO-PEG Nanoparticles Functionalized with a Highly Specific Collagen-Binding Peptide: A Step towards MRI Diagnosis of Fibrosis ». *Journal of Materials Chemistry B* 8 (25): 5515-28. <https://doi.org/10.1039/D0TB00887G>.
- Benameur, Tarek, Raffaella Soleti, Chiara Porro, Ramaroson Andriantsitohaina, et Maria Carmen Martínez. 2010. « Microparticles Carrying Sonic Hedgehog Favor Neovascularization through the Activation of Nitric Oxide Pathway in Mice ». Édité par Gian Paolo Fadini. *PLoS ONE* 5 (9): e12688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012688>.
- « Biological Phenotypes of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction | Elsevier Enhanced Reader ». s. d. Consulté le 17 juillet 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.09.006>.
- Bischoff, Florian C., Astrid Werner, David John, Jes-Niels Boeckel, Maria-Theodora Melissari, Phillip Grote, Simone F. Glaser, et al. 2017. « Identification and Functional Characterization of Hypoxia-Induced Endoplasmic Reticulum Stress Regulating lncRNA (HypERlnc) in Pericytes ». *Circulation Research* 121 (4): 368-75. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.310531>.
- Borbély, Attila, Ines Falcao-Pires, Loek van Heerebeek, Nazha Hamdani, István Edes, Cristina Gavina, Adelino F. Leite-Moreira, et al. 2009. « Hypophosphorylation of the Stiff N2B Titin Isoform Raises Cardiomyocyte Resting Tension in Failing Human Myocardium ». *Circulation Research* 104 (6): 780-86. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.193326>.
- Borbely, Attila, Ines Falcao-Pires, Loek van Heerebeek, Nazha Hamdani, Cristina Gavina, Adelino F Leite-Moreira, Jean G F Bronzwaer, Zoltan Papp, Ger J M Stienen, et Walter J Paulus. s. d. « Hypophosphorylation of the Stiff N2B Titin Isoform Raises Cardiomyocyte Resting Tension in Failing Human Myocardium », 7.
- Borlaug, Barry A. 2014. « The Pathophysiology of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction ». *Nature Reviews Cardiology* 11 (9): 507-15. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2014.83>.
- Borlaug, Barry A., Kevin J. Anstrom, Gregory D. Lewis, Sanjiv J. Shah, James A. Levine, Gabe A. Koeppe, Michael M. Givertz, et al. 2018. « Effect of Inorganic Nitrite vs Placebo on Exercise Capacity Among Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: The INDIE-HFpEF Randomized Clinical Trial ». *JAMA* 320 (17): 1764-73. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.14852>.
- Bostick, Brian, Annayya R. Aroor, Javad Habibi, William Durante, Lixin Ma, Vincent G. DeMarco, Mona Garro, Melvin R. Hayden, Frank W. Booth, et James R. Sowers. 2017. « Daily Exercise Prevents Diastolic Dysfunction and Oxidative Stress in a Female Mouse Model of Western Diet Induced Obesity by Maintaining Cardiac Heme Oxygenase-1 Levels ». *Metabolism* 66 (janvier): 14-22. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.09.005>.
- Bowen, T. Scott, Sophia Eisenkolb, Juliane Drobner, Tina Fischer, Sarah Werner, Axel Linke, Norman Mangner, Gerhard Schuler, et Volker Adams. 2017. « High-intensity Interval Training Prevents Oxidant-mediated Diaphragm Muscle Weakness in Hypertensive Mice ». *The FASEB Journal* 31 (1): 60-71. <https://doi.org/10.1096/fj.201600672r>.

- Bozkurt, Biykem, Scott B. Kribbs, Fred J. Clubb, Lloyd H. Michael, Vladimir V. Didenko, Peter J. Hornsby, Yukihiro Seta, Hakan Oral, Francis G. Spinale, et Douglas L. Mann. 1998. « Pathophysiologically Relevant Concentrations of Tumor Necrosis Factor- α Promote Progressive Left Ventricular Dysfunction and Remodeling in Rats ». *Circulation* 97 (14): 1382-91. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.97.14.1382>.
- Brutsaert, Dirk L., Stanislas U. Sys, et Thierry C. Gillebert. 1993. « Diastolic Failure: Pathophysiology and Therapeutic Implications ». *Journal of the American College of Cardiology* 22 (1): 318-25. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(93\)90850-Z](https://doi.org/10.1016/0735-1097(93)90850-Z).
- Burlew, Brad S., et Karl T. Weber. 2002. « Cardiac Fibrosis as a Cause of Diastolic Dysfunction ». *Herz* 27 (2): 92-98. <https://doi.org/10.1007/s00059-002-2354-y>.
- Bustamante, Moises, Alejandra Garate-Carrillo, Bruce R. Ito, Ricardo Garcia, Nancy Carson, Guillermo Ceballos, Israel Ramirez-Sanchez, Jeffrey Omens, et Francisco Villarreal. 2019. « Unmasking of Oestrogen-dependent Changes in Left Ventricular Structure and Function in Aged Female Rats: A Potential Model for Pre-heart Failure with Preserved Ejection Fraction ». *The Journal of Physiology* 597 (7): 1805-17. <https://doi.org/10.1113/JP277479>.
- Butler, Javed, Stefan D Anker, Gerasimos Filippatos, Muhammad Shahzeb Khan, João Pedro Ferreira, Stuart J Pocock, Nadia Giannetti, et al. 2021. « Empagliflozin and Health-Related Quality of Life Outcomes in Patients with Heart Failure with Reduced Ejection Fraction: The EMPEROR-Reduced Trial ». *European Heart Journal* 42 (13): 1203-12. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa1007>.
- Byrne, Nikole J., Nobutoshi Matsumura, Zaid H. Maayah, Mourad Ferdaoussi, Shingo Takahara, Ahmed M. Darwesh, Jody L. Levasseur, et al. 2020. « Empagliflozin Blunts Worsening Cardiac Dysfunction Associated With Reduced NLRP3 (Nucleotide-Binding Domain-Like Receptor Protein 3) Inflammasome Activation in Heart Failure ». *Circulation: Heart Failure* 13 (1). <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.119.006277>.
- Calippe, Bertrand, Victorine Douin-Echinard, Muriel Laffargue, Henrik Laurell, Vanessa Rana-Poussine, Bernard Pipy, Jean-Charles Guéry, Francis Bayard, Jean-François Arnal, et Pierre Gourdy. 2008. « Chronic Estradiol Administration In Vivo Promotes the Proinflammatory Response of Macrophages to TLR4 Activation: Involvement of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway ». *The Journal of Immunology* 180 (12): 7980-88. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.12.7980>.
- Campagnolo, Paola, Daniela Cesselli, Ayman Al Haj Zen, Antonio Paolo Beltrami, Nicolle Kränkel, Rajesh Katore, Gianni Angelini, Costanza Emanuelli, et Paolo Madeddu. 2010. « Human Adult Vena Saphena Contains Perivascular Progenitor Cells Endowed With Clonogenic and Proangiogenic Potential ». *Circulation* 121 (15): 1735-45. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.899252>.
- Cao, Nga, Yung George Wong, Sarah Rosli, Helen Kiriazis, Karina Huynh, Chengxue Qin, Xiao-Jun Du, Barbara K. Kemp-Harper, et Rebecca H. Ritchie. 2015. « Chronic Administration of the Nitroxyl Donor 1-Nitrosocyclo Hexyl Acetate Limits Left Ventricular Diastolic Dysfunction in a Mouse Model of Diabetes Mellitus In Vivo ». *Circulation: Heart Failure* 8 (3): 572-81. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001699>.
- Cappellari, Ornella, Sara Benedetti, Anna Innocenzi, Francesco Saverio Tedesco, Artal Moreno-Fortuny, Gonzalo Ugarte, Maria Grazia Lampugnani, Graziella Messina, et Giulio Cossu. 2013. « Dll4 and PDGF-BB Convert Committed Skeletal Myoblasts to Pericytes without Erasing Their Myogenic Memory ». *Developmental Cell* 24 (6): 586-99. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.01.022>.
- Caradu, Caroline, Thierry Couffignal, Candice Chapouly, Sarah Guimbal, Pierre-Louis Hollier, Eric Ducasse, Alessandra Bura-Rivière, Mathilde Dubois, Alain-Pierre Gadeau, et Marie-Ange Renault. 2018. « Restoring Endothelial Function by Targeting Desert Hedgehog Downstream of Klf2 Improves Critical Limb Ischemia in Adults ». *Circulation Research* 123 (9): 1053-65. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313177>.

- Caradu, Caroline, Alexandre Guy, Chloé James, Annabel Reynaud, Alain-Pierre Gadeau, et Marie-Ange Renault. 2018. « Endogenous Sonic Hedgehog Limits Inflammation and Angiogenesis in the Ischaemic Skeletal Muscle of Mice ». *Cardiovascular Research* 114 (5): 759-70. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy017>.
- Carbe, Christian J., Lan Cheng, Sankar Addya, Jessica I. Gold, Erhe Gao, Walter J. Koch, et Natalia A. Riobo. 2014. « G_i Proteins Mediate Activation of the Canonical Hedgehog Pathway in the Myocardium ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 307 (1): H66-72. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00166.2014>.
- Caulin-Glaser, T, C A Watson, R Pardi, et J R Bender. s. d. « Effects of 17 β -Estradiol on Cytokine-Induced Endothelial Cell Adhesion Molecule Expression », 7.
- Ceia, Fátima, Cândida Fonseca, Teresa Mota, Humberto Morais, Fernando Matias, António de Sousa, António Gouveia Oliveira, et on behalf of the EPICA Investigators. 2002. « Prevalence of Chronic Heart Failure in Southwestern Europe: The EPICA Study ». *European Journal of Heart Failure* 4 (4): 531-39. [https://doi.org/10.1016/S1388-9842\(02\)00034-X](https://doi.org/10.1016/S1388-9842(02)00034-X).
- Chambliss, Ken L., et Philip W. Shaul. 2002. « Estrogen Modulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase ». *Endocrine Reviews* 23 (5): 665-86. <https://doi.org/10.1210/er.2001-0045>.
- Chapouly, Candice, Pierre-Louis Hollier, Sarah Guimbal, Lauriane Cornuault, Alain-Pierre Gadeau, et Marie-Ange Renault. 2020. « Desert Hedgehog-Driven Endothelium Integrity Is Enhanced by Gas1 (Growth Arrest-Specific 1) but Negatively Regulated by Cdon (Cell Adhesion Molecule-Related/Downregulated by Oncogenes) ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 40 (12): e336-49. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314441>.
- Chapouly, Candice, Qinyu Yao, Soizic Vandierdonck, Frederic Larrieu-Lahargue, John N. Mariani, Alain-Pierre Gadeau, et Marie-Ange Renault. 2016. « Impaired Hedgehog Signalling-Induced Endothelial Dysfunction Is Sufficient to Induce Neuropathy: Implication in Diabetes ». *Cardiovascular Research* 109 (2): 217-27. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv263>.
- Chechneva, O. V., F. Mayrhofer, D. J. Daugherty, R. G. Krishnamurty, P. Bannerman, D. E. Pleasure, et W. Deng. 2014. « A Smoothed Receptor Agonist Is Neuroprotective and Promotes Regeneration after Ischemic Brain Injury ». *Cell Death Dis* 5 (octobre): e1481. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.446> cddis2014446 [pii].
- Chen, Chien-Wen, Masaho Okada, Jonathan D. Proto, Xueqin Gao, Naosumi Sekiya, Sarah A. Beckman, Mirko Corselli, et al. 2013. « Human Pericytes for Ischemic Heart Repair ». *Stem Cells* 31 (2): 305-16. <https://doi.org/10.1002/stem.1285>.
- Chen, James K., Jussi Taipale, Michael K. Cooper, et Philip A. Beachy. 2002. « Inhibition of Hedgehog Signaling by Direct Binding of Cyclopamine to Smoothed ». *Genes & Development* 16 (21): 2743-48. <https://doi.org/10.1101/gad.1025302>.
- Chen, Junyu, Unnikrishnan Sivan, Sin Lih Tan, Luciana Lippo, Jessica De Angelis, Rossella Labella, Amit Singh, et al. 2021. « High-Resolution 3D Imaging Uncovers Organ-Specific Vascular Control of Tissue Aging ». *Science Advances* 7 (6). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd7819>.
- Chen, Liang, Xiangjie Li, Mingquan Chen, Yi Feng, et Chenglong Xiong. 2020. « The ACE2 Expression in Human Heart Indicates New Potential Mechanism of Heart Injury among Patients Infected with SARS-CoV-2 ». *Cardiovascular Research* 116 (6): 1097-1100. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa078>.
- Chen, William C. W., James E. Baily, Mirko Corselli, Mary E. Díaz, Bin Sun, Guosheng Xiang, Gillian A. Gray, Johnny Huard, et Bruno Péault. 2015. « Human Myocardial Pericytes: Multipotent Mesodermal Precursors Exhibiting Cardiac Specificity ». *Stem Cells* 33 (2): 557-73. <https://doi.org/10.1002/stem.1868>.
- Cheng, L. P., M. Kuwahara, J. Jacobsson, et M. L. Foegh. 1991. « Inhibition of Myointimal Hyperplasia and Macrophage Infiltration by Estradiol in Aorta Allografts ». *Transplantation* 52 (6): 967-72. <https://doi.org/10.1097/00007890-199112000-00006>.
- Chilton, R., I. Tikkanen, C. P. Cannon, S. Crowe, H. J. Woerle, U. C. Broedl, et O. E. Johansen. 2015. « Effects of Empagliflozin on Blood Pressure and Markers of Arterial Stiffness and Vascular

- Resistance in Patients with Type 2 Diabetes ». *Diabetes, Obesity and Metabolism* 17 (12): 1180-93. <https://doi.org/10.1111/dom.12572>.
- Chintalgattu, Vishnu, Meredith L. Rees, James C. Culver, Aditya Goel, Tilahu Jiffar, Jianhu Zhang, Kenneth Dunner, et al. 2013. « Coronary Microvascular Pericytes Are the Cellular Target of Sunitinib Malate-Induced Cardiotoxicity ». *Science Translational Medicine* 5 (187): 187ra69. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005066>.
- Chintalgattu, Vishnu, Meredith L. Rees, James C. Culver, Aditya Goel, Tilahu Jiffar, Jianhu Zhang, Kenneth Dunner Jr, et al. 2013. « Coronary Microvascular Pericytes Are the Cellular Target of Sunitinib Malate Induced Cardiotoxicity », 22.
- Chuang, Pao-Tien, T'Nay Kawcak, et Andrew P. McMahon. 2003. « Feedback Control of Mammalian Hedgehog Signaling by the Hedgehog-Binding Protein, Hip1, Modulates Fgf Signaling during Branching Morphogenesis of the Lung ». *Genes & Development* 17 (3): 342-47. <https://doi.org/10.1101/gad.1026303>.
- Chuang, Pao-Tien, et Andrew P. McMahon. 1999. « Vertebrate Hedgehog Signalling Modulated by Induction of a Hedgehog-Binding Protein ». *Nature* 397 (6720): 617-21. <https://doi.org/10.1038/17611>.
- Clerk, Angela, Ashour Michael, et Peter H. Sugden. 1998. « Stimulation of the P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Neonatal Rat Ventricular Myocytes by the G Protein–Coupled Receptor Agonists, Endothelin-1 and Phenylephrine: A Role in Cardiac Myocyte Hypertrophy? » *Journal of Cell Biology* 142 (2): 523-35. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.2.523>.
- Cohen, Neale D., Sarah J. Gutman, Esther M. Briganti, et Andrew J. Taylor. 2019. « Effects of Empagliflozin Treatment on Cardiac Function and Structure in Patients with Type 2 Diabetes: A Cardiac Magnetic Resonance Study ». *Internal Medicine Journal* 49 (8): 1006-10. <https://doi.org/10.1111/imj.14260>.
- Collège National des enseignants de cardiologie, et Société Française de Cardiologie. 2015. *Cardiologie*. 2ème édition. Réussir les ECNi. Elsevier Masson.
- Collier, Patrick, Chris J. Watson, Victor Voon, Dermot Phelan, Aftab Jan, George Mak, Ramon Martos, John A. Baugh, Mark T. Ledwidge, et Kenneth M. McDonald. 2011. « Can Emerging Biomarkers of Myocardial Remodelling Identify Asymptomatic Hypertensive Patients at Risk for Diastolic Dysfunction and Diastolic Heart Failure? » *European Journal of Heart Failure* 13 (10): 1087-95. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfr079>.
- Concas, Victor, Stephane Laurent, Anne Marie Brisac, Claudine Perret, et Michel Safar. 1989. « Endothelin Has Potent Direct Inotropic and Chronotropic Effects in Cultured Heart Cells ». *Journal of Hypertension* 7: S96-97. <https://doi.org/10.1097/00004872-198900076-00044>.
- Connelly, Kim A., Yanling Zhang, Aylin Visram, Andrew Advani, Sri N. Batchu, Jean-François Desjardins, Kerri Thai, et Richard E. Gilbert. 2019. « Empagliflozin Improves Diastolic Function in a Nondiabetic Rodent Model of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction ». *JACC: Basic to Translational Science* 4 (1): 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.jacbs.2018.11.010>.
- Cordero-Herrera, Isabel, Drielle D. Guimarães, Chiara Moretti, Zhengbing Zhuge, Huirong Han, Sarah McCann Haworth, Arturo Eduardo Uribe Gonzalez, et al. 2020. « Head-to-Head Comparison of Inorganic Nitrate and Metformin in a Mouse Model of Cardiometabolic Disease ». *Nitric Oxide* 97 (avril): 48-56. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.01.013>.
- Cornuault, Lauriane, Paul Rouault, Cécile Duplâa, Thierry Couffinhal, et Marie-Ange Renault. 2022. « Endothelial Dysfunction in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: What are the Experimental Proofs? » *Frontiers in Physiology* 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2022.906272>.
- Crisan, Mihaela, Solomon Yap, Louis Casteilla, Chien-Wen Chen, Mirko Corselli, Tea Soon Park, Gabriella Andriolo, et al. 2008. « A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs ». *Cell Stem Cell* 3 (3): 301-13. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.003>.

- Daems, Margo, Laurens Liesenborghs, Ilona Cuijpers, Robbert Boudewijns, Jana Raman, Steven Simmonds, Nadèche Geuens, et al. 2020. « SARS-CoV-2 Infection Leads to Cardiac Pericyte Loss, Fibrosis, Cardiomyocyte Hypertrophy, and Diastolic Dysfunction ». Preprint. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-105963/v1>.
- Daneman, Richard, Lu Zhou, Amanuel A. Kebede, et Ben A. Barres. 2010. « Pericytes Are Required for Blood–Brain Barrier Integrity during Embryogenesis ». *Nature* 468 (7323): 562-66. <https://doi.org/10.1038/nature09513>.
- Deftereos, Spyridon, Georgios Giannopoulos, Christos Angelidis, Nikolaos Alexopoulos, Gerasimos Filippatos, Nikolaos Papoutsidakis, George Sianos, et al. 2015. « Anti-Inflammatory Treatment With Colchicine in Acute Myocardial Infarction: A Pilot Study ». *Circulation* 132 (15): 1395-1403. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017611>.
- Dellavalle, Arianna, Maurilio Sampaolesi, Rossana Tonlorenzi, Enrico Tagliafico, Benedetto Sacchetti, Laura Perani, Anna Innocenzi, et al. 2007. « Pericytes of Human Skeletal Muscle Are Myogenic Precursors Distinct from Satellite Cells ». *Nature Cell Biology* 9 (3): 255-67. <https://doi.org/10.1038/ncb1542>.
- Desai, Ketaki V., Glen A. Laine, Randolph H. Stewart, Charles S. Cox, Christopher M. Quick, Steven J. Allen, et Uwe M. Fischer. 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): H2428-34. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00860.2007>.
- Dharaneeswaran, Harita, Md. Ruhul Abid, Lei Yuan, Dylan Dupuis, David Beeler, Katherine C. Spokes, Lauren Janes, et al. 2014. « FoxO1-Mediated Activation of Akt Plays a Critical Role in Vascular Homeostasis ». *Circulation research* 115 (2): 238-51. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.303227>.
- Dhot, Justine, Ferron M, Prat V, Persello A, Roul D, Stévant D, Guijarro D, et al. 2020. « Overexpression of Endothelial β 3 -Adrenergic Receptor Induces Diastolic Dysfunction in Rats ». *ESC Heart Failure* 7 (6). <https://doi.org/10.1002/ehf2.13040>.
- Di Mauro, Concetta, Roberta Rosa, Valentina D'Amato, Paola Ciciola, Alberto Servetto, Roberta Marciano, Roberta Clara Orsini, et al. 2017. « Hedgehog Signalling Pathway Orchestrates Angiogenesis in Triple-Negative Breast Cancers ». *British Journal of Cancer* 116 (11): 1425-35. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.116>.
- Dijk, Christian G.M. van, Nynke R. Oosterhuis, Yan Juan Xu, Maarten Brandt, Walter J. Paulus, Loek van Heerebeek, Dirk J. Duncker, et al. 2016. « Distinct Endothelial Cell Responses in the Heart and Kidney Microvasculature Characterize the Progression of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction in the Obese ZSF1 Rat With Cardiorenal Metabolic Syndrome ». *Circulation: Heart Failure* 9 (4): e002760. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002760>.
- Dongaonkar, Ranjeet M., Randolph H. Stewart, Hans J. Geissler, et Glen A. Laine. 2010. « Myocardial Microvascular Permeability, Interstitial Oedema, and Compromised Cardiac Function ». *Cardiovascular Research* 87 (2): 331-39. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq145>.
- Dongaonkar, Ranjeet M., Randolph H. Stewart, Christopher M. Quick, Karen L. Uray, Charles S. Cox, et Glen A. Laine. 2012. « Award Article: Microcirculatory Society Award for Excellence in Lymphatic Research: Time Course of Myocardial Interstitial Edema Resolution and Associated Left Ventricular Dysfunction ». *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)* 19 (8): 714-22. <https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2012.00204.x>.
- Du, Weijie, Arnold Piek, E. Marloes Schouten, Cees W.A. van de Kolk, Christian Mueller, Alexandre Mebazaa, Adriaan A. Voors, Rudolf A. de Boer, et Herman H.W. Silljé. 2018. « Plasma Levels of Heart Failure Biomarkers Are Primarily a Reflection of Extracardiac Production ». *Theranostics* 8 (15): 4155-69. <https://doi.org/10.7150/thno.26055>.
- Dubois-Deruy, Emilie, Victoriane Peugnet, Annie Turkieh, et Florence Pinet. 2020. « Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases ». *Antioxidants* 9 (9): 864. <https://doi.org/10.3390/antiox9090864>.
- Dugaucquier, Lindsey, Eline Feyen, Ligia Mateiu, Tine Anne Marie Bruyys, Gilles W. De Keulenaer, et Vincent F. M. Segers. 2020. « The Role of Endothelial Autocrine NRG1/ERBB4 Signaling in

- Cardiac Remodeling ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 319 (2): H443-55. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00176.2020>.
- Eaton, Charles B., Mary Pettinger, Jacques Rossouw, Lisa Warsinger Martin, Randi Foraker, Abdullah Quddus, Simin Liu, et al. 2016. « Risk Factors for Incident Hospitalized Heart Failure With Preserved Versus Reduced Ejection Fraction in a Multiracial Cohort of Postmenopausal Women ». *Circulation: Heart Failure* 9 (10): e002883. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002883>.
- Ebner, Annette, Nadine Kuerbis, Aljoscha Brandt, Birgit Zatschler, Sönke Weinert, David M. Poitz, Bernd Ebner, et al. 2017. « Endothelial Nitric Oxide Synthase-Induced Hypertrophy and Vascular Dysfunction Contribute to the Left Ventricular Dysfunction in Caveolin-1^{-/-} Mice ». *Canadian Journal of Cardiology* 33 (12): 1716-24. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2017.09.015>.
- Eickels, Martin van, Christian Grohé, Jack P.M. Cleutjens, Ben J. Janssen, Hein J.J. Wellens, et Pieter A. Doevendans. 2001. « 17 β -Estradiol Attenuates the Development of Pressure-Overload Hypertrophy ». *Circulation* 104 (12): 1419-23. <https://doi.org/10.1161/hc3601.095577>.
- Eilken, Hanna M., Rodrigo Diéguez-Hurtado, Inga Schmidt, Masanori Nakayama, Hyun-Woo Jeong, Hendrik Arf, Susanne Adams, Napoleone Ferrara, et Ralf H. Adams. 2017. « Pericytes Regulate VEGF-Induced Endothelial Sprouting through VEGFR1 ». *Nature Communications* 8 (1): 1574. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01738-3>.
- Esposito, Grazia, Donato Cappetta, Rosa Russo, Alessia Rivellino, Loreta Pia Ciuffreda, Fiorentina Roviezzo, Elena Piegari, et al. 2017. « Sitagliptin Reduces Inflammation, Fibrosis and Preserves Diastolic Function in a Rat Model of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: Sitagliptin in HFpEF ». *British Journal of Pharmacology* 174 (22): 4070-86. <https://doi.org/10.1111/bph.13686>.
- Farah, Charlotte, Lauriane Y. M. Michel, et Jean-Luc Balligand. 2018. « Nitric Oxide Signalling in Cardiovascular Health and Disease ». *Nature Reviews Cardiology* 15 (5): 292-316. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.224>.
- Farkasfalvi, Klára, Mark A. Stagg, Steven R. Coppen, Urszula Siedlecka, Joon Lee, Gopal K. Soppa, Nándor Marczin, István Szokodi, Magdi H. Yacoub, et Cesare M.N. Terracciano. 2007. « Direct Effects of Apelin on Cardiomyocyte Contractility and Electrophysiology ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 357 (4): 889-95. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.017>.
- « Fiche info - ENTRESTO 24 mg/26 mg, comprimé pelliculé - Base de données publique des médicaments ». s. d. Consulté le 15 septembre 2022. <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/extrait.php?specid=65122144#>.
- Filipe, Cédric, Lætitia Lam Shang Leen, Laurent Brouchet, Audrey Billon, Vincent Benouaich, Vincent Fontaine, Pierre Gourdy, et al. 2008. « Estradiol Accelerates Endothelial Healing through the Retrograde Commitment of Uninjured Endothelium ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 294 (6): H2822-30. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00129.2008>.
- Fischer, Kady, Dominik P. Guensch, Bernd Jung, Iman King, Hendrik von Tengg-Kobligk, Nadia Giannetti, Balthasar Eberle, et Matthias G. Friedrich. 2022. « Insights Into Myocardial Oxygenation and Cardiovascular Magnetic Resonance Tissue Biomarkers in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction ». *Circulation: Heart Failure* 15 (4). <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.121.008903>.
- Florian, M., et S. Magder. 2008. « Estrogen Decreases TNF- α and Oxidized LDL Induced Apoptosis in Endothelial Cells ». *Steroids* 73 (1): 47-58. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2007.08.010>.
- Fontaine, Vincent, Cédric Filipe, Nikos Werner, Pierre Gourdy, Audrey Billon, Barbara Garmy-Susini, Laurent Brouchet, et al. 2006. « Essential Role of Bone Marrow Fibroblast Growth Factor-2 in the Effect of Estradiol on Reendothelialization and Endothelial Progenitor Cell Mobilization ». *The American Journal of Pathology* 169 (5): 1855-62. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060260>.
- Forbes, M. S., M. L. Rennels, et E. Nelson. 1977. « Ultrastructure of Pericytes in Mouse Heart ». *American Journal of Anatomy* 149 (1): 47-69. <https://doi.org/10.1002/aja.1001490105>.

- Förster, Carola, Silke Kietz, Kjell Hultenby, Margaret Warner, et Jan-Åke Gustafsson. 2004. « Characterization of the ER β ^{-/-} Mouse Heart ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (39): 14234-39. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405571101>.
- Franssen, Constantijn, Sophia Chen, Andreas Unger, H. Ibrahim Korkmaz, Gilles W. De Keulenaer, Carsten Tschöpe, Adelino F. Leite-Moreira, et al. 2016. « Myocardial Microvascular Inflammatory Endothelial Activation in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction ». *JACC: Heart Failure* 4 (4): 312-24. <https://doi.org/10.1016/j.jchf.2015.10.007>.
- Fujita, Kyoko, Takeshi Miyamoto, et Shizuya Saika. 2009. « Sonic Hedgehog: Its Expression in a Healing Cornea and Its Role in Neovascularization ». *Molecular Vision* 15 (mai): 1036-44.
- Galderisi, Maurizio, Keaven M. Anderson, Peter W.F. Wilson, et Daniel Levy. 1991. « Echocardiographic Evidence for the Existence of a Distinct Diabetic Cardiomyopathy (The Framingham Heart Study) ». *The American Journal of Cardiology* 68 (1): 85-89. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(91\)90716-X](https://doi.org/10.1016/0002-9149(91)90716-X).
- Garate-Carrillo, Alejandra, Julisa Gonzalez, Guillermo Ceballos, Israel Ramirez-Sanchez, et Francisco Villarreal. 2020. « Sex Related Differences in the Pathogenesis of Organ Fibrosis ». *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 222 (août): 41-55. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2020.03.008>.
- Garmy-Susini, B., E. Delmas, P. Gourdy, M. Zhou, C. Bossard, B. Bugler, F. Bayard, et al. 2004. « Role of Fibroblast Growth Factor-2 Isoforms in the Effect of Estradiol on Endothelial Cell Migration and Proliferation ». *Circulation Research* 94 (10): 1301-9. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000127719.13255.81>.
- Gebara, Otavio C. E., Murray A. Mittleman, Patrice Sutherland, Izabela Lipinska, Travis Matheney, Ping Xu, Francine K. Welty, et al. 1995. « Association Between Increased Estrogen Status and Increased Fibrinolytic Potential in the Framingham Offspring Study ». *Circulation* 91 (7): 1952-58. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.91.7.1952>.
- Geraldes, Pedro, Martin G. Sirois, Pascal N. Bernatchez, et Jean-François Tanguay. 2002. « Estrogen Regulation of Endothelial and Smooth Muscle Cell Migration and Proliferation: Role of P38 and P42/44 Mitogen-Activated Protein Kinase ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22 (10): 1585-90. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000035393.11854.6A>.
- Gerber, Yariv, Susan A. Weston, Margaret M. Redfield, Alanna M. Chamberlain, Sheila M. Manemann, Ruoxiang Jiang, Jill M. Killian, et Véronique L. Roger. 2015. « A Contemporary Appraisal of the Heart Failure Epidemic in Olmsted County, Minnesota, 2000 to 2010 ». *JAMA Internal Medicine* 175 (6): 996. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2015.0924>.
- Gevaert, Andreas B., Hadis Shakeri, Arthur J. Leloup, Cor E. Van Hove, Guido R.Y. De Meyer, Christiaan J. Vrints, Katrien Lemmens, et Emeline M. Van Craenenbroeck. 2017. « Endothelial Senescence Contributes to Heart Failure With Preserved Ejection Fraction in an Aging Mouse Model ». *Circulation: Heart Failure* 10 (6). <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.116.003806>.
- Ghisletti, Serena, Clara Meda, Adriana Maggi, et Elisabetta Vegeto. 2005. « 17 β -Estradiol Inhibits Inflammatory Gene Expression by Controlling NF-KappaB Intracellular Localization ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (8): 2957-68. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.8.2957-2968.2005>.
- Giordano, Frank J., Hans-Peter Gerber, Simon-Peter Williams, Nicholas VanBruggen, Stuart Bunting, Pilar Ruiz-Lozano, Yusu Gu, 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* 98 (10): 5780-85. <https://doi.org/10.1073/pnas.091415198>.
- González, Arantxa, Begoña López, Ramón Querejeta, Elena Zubillaga, Tomás Echeverría, et Javier Díez. 2010. « Filling Pressures and Collagen Metabolism in Hypertensive Patients with Heart Failure and Normal Ejection Fraction ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 55 (6): 1418-24. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.149112>.
- Gourdy, P, Z Mallat, C Castano, B Garmy-Susini, J.L Mac Gregor, A Tedgui, J.F Arnal, et F Bayard. 2003. « The Atheroprotective Effect of 17 β -Estradiol Is Not Altered in P-Selectin- or ICAM-1-

- Deficient Hypercholesterolemic Mice ». *Atherosclerosis* 166 (1): 41-48.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(02\)00322-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(02)00322-2).
- Greenhalgh, Stephen N., John P. Iredale, et Neil C. Henderson. 2013. « Origins of Fibrosis: Pericytes Take Centre Stage ». *F1000Prime Reports* 5 (septembre). <https://doi.org/10.12703/P5-37>.
- Griffin, Matthew, Veena S. Rao, Juan Ivey-Miranda, James Fleming, Devin Mahoney, Christopher Maulion, Nisha Suda, et al. 2020. « Empagliflozin in Heart Failure: Diuretic and Cardiorenal Effects ». *Circulation* 142 (11): 1028-39.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.045691>.
- Groenewegen, Amy, Frans H. Rutten, Arend Mosterd, et Arno W. Hoes. 2020. « Epidemiology of Heart Failure ». *European Journal of Heart Failure* 22 (8): 1342-56.
<https://doi.org/10.1002/ejhf.1858>.
- Grohé, Christian, Stefan Kahlert, Kerstin Löbber, Michael Stimpel, Richard H. Karas, Hans Vetter, et Ludwig Neyses. 1997. « Cardiac Myocytes and Fibroblasts Contain Functional Estrogen Receptors¹ ». *FEBS Letters* 416 (1): 107-12. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01179-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01179-4).
- Guimbal, Sarah, Lauriane Cornuault, Paul Rouault, Pierre-Louis Hollier, Candice Chapouly, Marie-Lise Bats, Julien Imbault, Alain-Pierre Gadeau, Thierry Couffinhal, et Marie-Ange Renault. 2021. « Mast Cells Are the Trigger of Small Vessel Disease and Diastolic Dysfunction in Diabetic Obese Mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 41 (4).
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.121.315900>.
- Guivarc, Emmanuel, Jamal Wakim, Nada-Joe Melhem, Rana Zahreddine, Marine Adlanmerini, Laurent Loufrani, Claude Knauf, et al. s. d. « Predominant Role of Nuclear Versus Membrane Estrogen Receptor α in Arterial Protection: Implications for Estrogen Receptor α Modulation in Cardiovascular Prevention/Safety », 21.
- Guivarc'h, Emmanuel, Julie Favre, Anne-Laure Guihot, Emilie Vessières, Linda Grimaud, Coralyne Proux, Jordan Rivron, et al. 2020. « Nuclear Activation Function 2 Estrogen Receptor α Attenuates Arterial and Renal Alterations Due to Aging and Hypertension in Female Mice ». *Journal of the American Heart Association* 9 (5): e013895.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.119.013895>.
- Habibi, Javad, Annayya R. Aroor, James R. Sowers, Guanghong Jia, Melvin R. Hayden, Mona Garro, Brady Barron, et al. 2017. « Sodium Glucose Transporter 2 (SGLT2) Inhibition with Empagliflozin Improves Cardiac Diastolic Function in a Female Rodent Model of Diabetes ». *Cardiovascular Diabetology* 16 (1): 9. <https://doi.org/10.1186/s12933-016-0489-z>.
- Hamdani, Nazha, Kalkidan G. Bishu, Marion von Frieling-Salewsky, Margaret M. Redfield, et Wolfgang A. Linke. 2013. « Deranged Myofilament Phosphorylation and Function in Experimental Heart Failure with Preserved Ejection Fraction ». *Cardiovascular Research* 97 (3): 464-71.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvs353>.
- Hamdani, Nazha, Constantijn Franssen, André Lourenço, Inês Falcão-Pires, Dulce Fontoura, Sara Leite, Luisa Plettig, et al. 2013. « Myocardial Titin Hypophosphorylation Importantly Contributes to Heart Failure With Preserved Ejection Fraction in a Rat Metabolic Risk Model ». *Circulation: Heart Failure* 6 (6): 1239-49.
<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000539>.
- Handgraaf, Sandra, Rodolphe Dusaulcy, Florian Visentin, Jacques Philippe, et Yvan Gosmain. 2018. « 17- β Estradiol Regulates Proglucagon- Derived Peptide Secretion in Mouse and Human α - and L Cells », 14.
- Harrell, C. Randall, Bojana Simovic Markovic, Crissy Fellabaum, Aleksandar Arsenijevic, Valentin Djonov, et Vladislav Volarevic. 2018. « Molecular Mechanisms Underlying Therapeutic Potential of Pericytes ». *Journal of Biomedical Science* 25 (1): 21.
<https://doi.org/10.1186/s12929-018-0423-7>.
- He, Hua, Hong Zhang, Bin Li, Guigang Li, et Zhitao Wang. 2010. « Blockade of the Sonic Hedgehog Signalling Pathway Inhibits Choroidal Neovascularization in a Laser-Induced Rat Model ». *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences = Hua Zhong Ke*

- Ji Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ying De Wen Ban = Huazhong Keji Daxue Xuebao. Yixue Yingdewen Ban* 30 (5): 659-65. <https://doi.org/10.1007/s11596-010-0560-z>.
- He, Xiaochen, Heng Zeng, et Jian-Xiong Chen. 2016. « Ablation of SIRT3 Causes Coronary Microvascular Dysfunction and Impairs Cardiac Recovery Post Myocardial Ischemia ». *International Journal of Cardiology* 215 (juillet): 349-57. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.04.092>.
- He, Xiaochen, Heng Zeng, Sean T Chen, Richard J Roman, Judy L Aschner, Sean Didion, et Jian-Xiong Chen. 2017. « Endothelial Specific SIRT3 Deletion Impairs Glycolysis and Angiogenesis and Causes Diastolic Dysfunction ». *Journal of molecular and cellular cardiology* 112 (novembre): 104-13. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.09.007>.
- Heerebeek, Loek van, Nazha Hamdani, Inês Falcão-Pires, Adelino F. Leite-Moreira, Mark P.V. Begieneman, Jean G.F. Bronzwaer, Jolanda van der Velden, et al. 2012. « Low Myocardial Protein Kinase G Activity in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction ». *Circulation* 126 (7): 830-39. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.076075>.
- Heiden, Susi, Nicolas Vignon-Zellweger, Shigeru Masuda, Keiko Yagi, Kazuhiko Nakayama, Masashi Yanagisawa, et Noriaki Emoto. 2014. « Vascular Endothelium Derived Endothelin-1 Is Required for Normal Heart Function after Chronic Pressure Overload in Mice ». Édité par Junichi Sadoshima. *PLoS ONE* 9 (2): e88730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088730>.
- Heinzel, Frank R., et Sanjiv J. Shah. 2022. « The Future of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction : Deep Phenotyping for Targeted Therapeutics ». *Herz* 47 (4): 308-23. <https://doi.org/10.1007/s00059-022-05124-8>.
- Hemkens, Lars G, Hannah Ewald, Viktoria L Gloy, Armon Arpagaus, Kelechi K Olu, Mark Nidorf, Dominik Glinz, Alain J Nordmann, et Matthias Briel. 2016. « Cardiovascular Effects and Safety of Long-Term Colchicine Treatment: Cochrane Review and Meta-Analysis ». *Heart* 102 (8): 590-96. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2015-308542>.
- Ho, Jennifer E., Danielle Enserro, Frank P. Brouwers, Jorge R. Kizer, Sanjiv J. Shah, Bruce M. Psaty, Traci M. Bartz, et al. 2016. « Predicting Heart Failure With Preserved and Reduced Ejection Fraction: The International Collaboration on Heart Failure Subtypes ». *Circulation: Heart Failure* 9 (6): e003116. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.003116>.
- Hoch, Renée V., et Philippe Soriano. 2003. « Roles of PDGF in animal development ». *Development* 130 (20): 4769-84. <https://doi.org/10.1242/dev.00721>.
- Hollier, Pierre-Louis, Candice Chapouly, Aissata Diop, Sarah Guimbal, Lauriane Cornuault, Alain-Pierre Gadeau, et Marie-Ange Renault. 2021. « Full-Length Dhh and N-Terminal Shh Act as Competitive Antagonists to Regulate Angiogenesis and Vascular Permeability ». *Cardiovascular Research* 117 (12): 2489-2501. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa285>.
- Hsieh, Patrick C. H., Michael E. Davis, Laura K. Lisowski, et Richard T. Lee. 2006. « Endothelial-Cardiomyocyte Interactions in Cardiac Development and Repair ». *Annual Review of Physiology* 68: 51-66. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.124629>.
- Hu, Jing Ru, Rüdiger Von Harsdorf, et Rudolf E. Lang. 1988. « Endothelin Has Potent Inotropic Effects in Rat Atria ». *European Journal of Pharmacology* 158 (3): 275-78. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(88\)90079-9](https://doi.org/10.1016/0014-2999(88)90079-9).
- Huang, Xinyan, Teng Feng, Zhen Jiang, Jufeng Meng, Shan Kou, Zhengkai Lu, Weize Chen, Chao-Po Lin, Bin Zhou, et Hui Zhang. 2019. « Dual Lineage Tracing Identifies Intermediate Mesenchymal Stage for Endocardial Contribution to Fibroblasts, Coronary Mural Cells, and Adipocytes ». *Journal of Biological Chemistry* 294 (22): 8894-8906. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006994>.
- Hulsmans, Maarten, Hendrik B. Sager, Jason D. Roh, María Valero-Muñoz, Nicholas E. Houstis, Yoshiko Iwamoto, Yuan Sun, et al. 2018. « Cardiac Macrophages Promote Diastolic Dysfunction ». *The Journal of Experimental Medicine* 215 (2): 423-40. <https://doi.org/10.1084/jem.20171274>.
- Ichihara, Sahoko, Takaaki Senbonmatsu, Edward Price, Toshihiro Ichiki, F. Andrew Gaffney, et Tadashi Inagami. 2001. « Angiotensin II Type 2 Receptor Is Essential for Left Ventricular Hypertrophy

- and Cardiac Fibrosis in Chronic Angiotensin II–Induced Hypertension ». *Circulation* 104 (3): 346-51. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.104.3.346>.
- « IL-1 Blockade in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction ». s. d. Consulté le 23 mars 2022. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.118.005036>.
- Imazio, Massimo. 2011. « Colchicine for Recurrent Pericarditis (CORP): A Randomized Trial ». *Annals of Internal Medicine* 155 (7): 409. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-155-7-201110040-00359>.
- Imazio, Massimo, Marco Bobbio, Enrico Cecchi, Daniela Demarie, Brunella Demichelis, Franco Pomari, Mauro Moratti, et al. 2005. « Colchicine in Addition to Conventional Therapy for Acute Pericarditis: Results of the COLchicine for Acute PERicarditis (COPE) Trial ». *Circulation* 112 (13): 2012-16. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.542738>.
- Imazio, Massimo, Marco Bobbio, Enrico Cecchi, Daniela Demarie, Franco Pomari, Mauro Moratti, Aldo Ghisio, Riccardo Belli, et Rita Trincheri. 2005. « Colchicine as First-Choice Therapy for Recurrent Pericarditis: Results of the CORE (COLchicine for REcurrent Pericarditis) Trial ». *Archives of Internal Medicine* 165 (17): 1987. <https://doi.org/10.1001/archinte.165.17.1987>.
- Imazio, Massimo, Antonio Brucato, Roberto Cemin, Stefania Ferrua, Stefano Maggolini, Federico Begaraj, Daniela Demarie, et al. 2013. « A Randomized Trial of Colchicine for Acute Pericarditis ». *New England Journal of Medicine* 369 (16): 1522-28. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1208536>.
- Indhirajanti, Swasti, Paul L. A. van Daele, Sven Bos, Monique T. Mulder, Ilze Bot, et Jeanine E. Roeters van Lennep. 2018. « Systemic Mastocytosis Associates with Cardiovascular Events despite Lower Plasma Lipid Levels ». *Atherosclerosis* 268 (janvier): 152-56. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.11.030>.
- « Inhibition of Interleukin-1 by Anakinra Improves Vascular and Left Ventricular Function in Patients With Rheumatoid Arthritis ». s. d. Consulté le 23 mars 2022. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.731877>.
- Ito, H, Y Hirata, M Hiroe, M Tsujino, S Adachi, T Takamoto, M Nitta, K Taniguchi, et F Marumo. 1991. « Endothelin-1 Induces Hypertrophy with Enhanced Expression of Muscle-Specific Genes in Cultured Neonatal Rat Cardiomyocytes. » *Circulation Research* 69 (1): 209-15. <https://doi.org/10.1161/01.RES.69.1.209>.
- Izzi, Luisa, Martin Lévesque, Steves Morin, Dominique Laniel, Brian C. Wilkes, Frédéric Mille, Robert S. Krauss, Andrew P. McMahon, Benjamin L. Allen, et Frédéric Charron. 2011. « Boc and Gas1 Each Form Distinct Shh Receptor Complexes with Ptch1 and Are Required for Shh-Mediated Cell Proliferation ». *Developmental Cell* 20 (6): 788-801. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.04.017>.
- Jaba, Irina M., Zhen W. Zhuang, Na Li, Yifeng Jiang, Kathleen A. Martin, Albert J. Sinusas, Xenophon Papademetris, et al. 2013. « NO Triggers RGS4 Degradation to Coordinate Angiogenesis and Cardiomyocyte Growth ». *Journal of Clinical Investigation* 123 (4): 1718-31. <https://doi.org/10.1172/JCI65112>.
- Jackson, Alice M., Pooja Dewan, Inder S. Anand, Jan Bělohávek, Olof Bengtsson, Rudolf A. de Boer, Michael Böhm, et al. 2020. « Dapagliflozin and Diuretic Use in Patients With Heart Failure and Reduced Ejection Fraction in DAPA-HF ». *Circulation* 142 (11): 1040-54. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047077>.
- Jackson-Weaver, Olan, Nicha Ungvianpunya, Yuan Yuan, Jiang Qian, Yongchao Gou, Jian Wu, Hua Shen, et al. 2020. « PRMT1-P53 Pathway Controls Epicardial EMT and Invasion ». *Cell Reports* 31 (10): 107739. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107739>.
- Jadeja, Shalini, Richard L. Mort, Margaret Keighren, Alan W. Hart, Russell Joynson, Sara Wells, Paul K. Potter, et Ian J. Jackson. 2013. « A CNS-Specific Hypomorphic Pdgfr-Beta Mutant Model of Diabetic Retinopathy ». *Investigative ophthalmology & visual science* 54 (5): 3569-78. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-11125>.
- Jankowski, Marek, Grazyna Rachelska, Wang Donghao, Samuel M. McCann, et Jolanta Gutkowska. 2001. « Estrogen Receptors Activate Atrial Natriuretic Peptide in the Rat Heart ». *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences 98 (20): 11765-70.
<https://doi.org/10.1073/pnas.201394198>.
- Jeong, Juhee, et Andrew P. McMahon. 2005. « Growth and Pattern of the Mammalian Neural Tube Are Governed by Partially Overlapping Feedback Activities of the Hedgehog Antagonists Patched 1 and Hhip1 ». *Development* 132 (1): 143-54. <https://doi.org/10.1242/dev.01566>.
- Johnson, Barry D, Wei Zheng, Kenneth S Korach, Todd Scheuer, William A Catterall, et Gabor M Rubanyi. s. d. « Increased Expression of the Cardiac L-Type Calcium Channel in Estrogen Receptor–Deficient Mice », 6.
- Juchem, Gerd, Dominik R. Weiss, Brigitte Gansera, Bernhard M. Kemkes, Josef Mueller-Hoecker, et Stephan Nees. 2010. « Pericytes in the Macrovascular Intima: Possible Physiological and Pathogenetic Impact ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 298 (3): H754-70. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00343.2009>.
- Juni, Rio P., Diederik W.D. Kuster, Max Goebel, Michiel Helmes, René J.P. Musters, Jolanda van der Velden, Pieter Koolwijk, Walter J. Paulus, et Victor W.M. van Hinsbergh. 2019. « Cardiac Microvascular Endothelial Enhancement of Cardiomyocyte Function Is Impaired by Inflammation and Restored by Empagliflozin ». *JACC: Basic to Translational Science* 4 (5): 575-91. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2019.04.003>.
- Katare, Rajesh G., et Paolo Madeddu. 2013. « Pericytes from Human Veins for Treatment of Myocardial Ischemia ». *Trends in Cardiovascular Medicine* 23 (3): 66-70.
<https://doi.org/10.1016/j.tcm.2012.09.002>.
- Katare, Rajesh, Federica Riu, Kathryn Mitchell, Miriam Gubernator, Paola Campagnolo, Yuxin Cui, Orazio Fortunato, et al. 2011. « Transplantation of Human Pericyte Progenitor Cells Improves the Repair of Infarcted Heart Through Activation of an Angiogenic Program Involving Micro-RNA-132 ». *Circulation Research* 109 (8): 894-906.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.251546>.
- Kato, Shingo, Naka Saito, Hidekuni Kirigaya, Daiki Gyotoku, Naoki Inuma, Yuka Kusakawa, Kohei Iguchi, et al. 2016. « Impairment of Coronary Flow Reserve Evaluated by Phase Contrast Cine-Magnetic Resonance Imaging in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction ». *Journal of the American Heart Association* 5 (2): e002649.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002649>.
- Kautzky-Willer, Alexandra, Jürgen Harreiter, et Giovanni Pacini. 2016. « Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus ». *Endocrine Reviews* 37 (3): 278-316. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1137>.
- Kawagishi, Hiroyuki, Jianhua Xiong, Ilsa I. Rovira, Haihui Pan, Ye Yan, Bernd K. Fleischmann, Mitsuhiro Yamada, et Toren Finkel. 2018. « Sonic Hedgehog Signaling Regulates the Mammalian Cardiac Regenerative Response ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 123 (octobre): 180-84. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.09.005>.
- Knowlton, A.A., et D.H. Korzick. 2014. « Estrogen and the Female Heart ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 389 (1-2): 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.01.002>.
- Knowlton, Anne A. 2012. « Estrogen and Cardiovascular Disease: Aging and Estrogen Loss at the Heart of the Matter? » *Future Cardiology* 8 (1): 9-12. <https://doi.org/10.2217/fca.11.84>.
- Koh, Kwang Kon, Arnon Blum, Londa Hathaway, Rita Mincemoyer, Gyorgy Csako, Myron A. Waclawiw, Julio A. Panza, et Richard O. Cannon. 1999. « Vascular Effects of Estrogen and Vitamin E Therapies in Postmenopausal Women ». *Circulation* 100 (18): 1851-57.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.100.18.1851>.
- Koh, Kwang Kon, Rita Mincemoyer, Minh N. Bui, Gyorgy Csako, Frank Pucino, Victor Guetta, Myron Waclawiw, et Richard O. Cannon. 1997. « Effects of Hormone-Replacement Therapy on Fibrinolysis in Postmenopausal Women ». *New England Journal of Medicine* 336 (10): 683-91.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199703063361002>.
- Kolijn, Detmar, Steffen Pabel, Yanna Tian, Mária Lódi, Melissa Herwig, Albino Carrizzo, Saltanat Zhazykbayeva, et al. 2021. « Empagliflozin Improves Endothelial and Cardiomyocyte Function in Human Heart Failure with Preserved Ejection Fraction via Reduced Pro-Inflammatory-

- Oxidative Pathways and Protein Kinase α Oxidation ». *Cardiovascular Research* 117 (2): 495-507. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa123>.
- Kosiborod, Mikhail N., Pardeep S. Jhund, Kieran F. Docherty, Mirta Diez, Mark C. Petrie, Subodh Verma, Jose C. Nicolau, et al. 2020. « Effects of Dapagliflozin on Symptoms, Function, and Quality of Life in Patients With Heart Failure and Reduced Ejection Fraction: Results From the DAPA-HF Trial ». *Circulation* 141 (2): 90-99. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044138>.
- Krumholz, Harlan M., Martin Larson, et Daniel Levy. 1993. « Sex Differences in Cardiac Adaptation to Isolated Systolic Hypertension ». *The American Journal of Cardiology* 72 (3): 310-13. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(93\)90678-6](https://doi.org/10.1016/0002-9149(93)90678-6).
- Kumar, Rahul, John Charonko, W. Gregory Hundley, Craig A. Hamilton, Kelley C. Stewart, Gary R. McNeal, Pavlos P. Vlachos, et William C. Little. 2011. « Assessment of Left Ventricular Diastolic Function Using 4-Dimensional Phase-Contrast Cardiac Magnetic Resonance ». *Journal of Computer Assisted Tomography* 35 (1): 108-12. <https://doi.org/10.1097/RCT.0b013e3181ffdbaf>.
- Kusaka, Hiroaki, Nobutaka Koibuchi, Yu Hasegawa, Hisao Ogawa, et Shokei Kim-Mitsuyama. 2016. « Empagliflozin Lessened Cardiac Injury and Reduced Visceral Adipocyte Hypertrophy in Prediabetic Rats with Metabolic Syndrome ». *Cardiovascular Diabetology* 15 (1): 157. <https://doi.org/10.1186/s12933-016-0473-7>.
- Kusuhara, Sentaro, Yoko Fukushima, Shuntaro Ogura, Naomi Inoue, et Akiyoshi Uemura. 2018. « Pathophysiology of Diabetic Retinopathy: The Old and the New ». *Diabetes & Metabolism Journal* 42 (5): 364. <https://doi.org/10.4093/dmj.2018.0182>.
- Lam, Carolyn S P, Clare Arnott, Anna L Beale, Chanchal Chandramouli, Denise Hilfiker-Kleiner, David M Kaye, Bonnie Ky, Bernadet T Santema, Karen Sliwa, et Adriaan A Voors. 2019. « Sex Differences in Heart Failure ». *European Heart Journal* 40 (47): 3859-68. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz835>.
- Lam, Carolyn S P, Adriaan A Voors, Rudolf A de Boer, Scott D Solomon, et Dirk J van Veldhuisen. 2018. « Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: From Mechanisms to Therapies ». *European Heart Journal* 39 (30): 2780-92. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy301>.
- Lau, Emily S., Aleksandra Binek, Sarah J. Parker, Svati H. Shah, Markella V. Zanni, Jennifer E. Van Eyk, et Jennifer E. Ho. 2022. « Sexual Dimorphism in Cardiovascular Biomarkers: Clinical and Research Implications ». *Circulation Research* 130 (4): 578-92. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.319916>.
- Lavine, Kory J., Attila Kovacs, et David M. Ornitz. 2008. « Hedgehog Signaling Is Critical for Maintenance of the Adult Coronary Vasculature in Mice ». *Journal of Clinical Investigation*, juin, JCI34561. <https://doi.org/10.1172/JCI34561>.
- Lavine, Kory J., Fanxin Long, Kyunghye Choi, Craig Smith, et David M. Ornitz. 2008. « Hedgehog Signaling to Distinct Cell Types Differentially Regulates Coronary Artery and Vein Development ». *Development* 135 (18): 3161-71. <https://doi.org/10.1242/dev.019919>.
- Lavine, Kory J., Andrew C. White, Changwon Park, Craig S. Smith, Kyunghye Choi, Fanxin Long, Chichung Hui, et David M. Ornitz. 2006. « Fibroblast Growth Factor Signals Regulate a Wave of Hedgehog Activation That Is Essential for Coronary Vascular Development ». *Genes & Development* 20 (12): 1651-66. <https://doi.org/10.1101/gad.1411406>.
- Leite, Sara, Rui J. Cerqueira, Jaime Ibarrola, Dulce Fontoura, Amaya Fernández-Celis, Faiez Zannad, Inês Falcão-Pires, et al. 2019. « Arterial Remodeling and Dysfunction in the ZSF1 Rat Model of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction ». *Circulation: Heart Failure* 12 (7). <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.118.005596>.
- Levéen, P., M. Pekny, S. Gebre-Medhin, B. Swolin, E. Larsson, et C. Betsholtz. 1994. « Mice Deficient for PDGF B Show Renal, Cardiovascular, and Hematological Abnormalities ». *Genes & Development* 8 (16): 1875-87. <https://doi.org/10.1101/gad.8.16.1875>.
- Lin, Bowen, Nobutaka Koibuchi, Yu Hasegawa, Daisuke Sueta, Kensuke Toyama, Ken Uekawa, Mingjie Ma, Takashi Nakagawa, Hiroaki Kusaka, et Shokei Kim-Mitsuyama. 2014. « Glycemic Control

- with Empagliflozin, a Novel Selective SGLT2 Inhibitor, Ameliorates Cardiovascular Injury and Cognitive Dysfunction in Obese and Type 2 Diabetic Mice ». *Cardiovascular Diabetology* 13 (1): 148. <https://doi.org/10.1186/s12933-014-0148-1>.
- Linke, Wolfgang A., et Nazha Hamdani. 2014. « Gigantic Business: Titin Properties and Function through Thick and Thin ». *Circulation Research* 114 (6): 1052-68. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.301286>.
- Liu, Jie, Tao Zhuang, Jingjiang Pi, Xiaoli Chen, Qi Zhang, Ying Li, Haikun Wang, et al. 2019. « Endothelial Forkhead Box Transcription Factor P1 Regulates Pathological Cardiac Remodeling Through Transforming Growth Factor-B1-Endothelin-1 Signal Pathway ». *Circulation* 140 (8): 665-80. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.039767>.
- Liu, Sean X., Hugh R. Matthews, et Christopher L.-H. Huang. 2021. « Sarcoplasmic Reticular Ca²⁺-ATPase Inhibition Paradoxically Upregulates Murine Skeletal Muscle Nav1.4 Function ». *Scientific Reports* 11 (1): 2846. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82493-w>.
- Liu, Xiuxiang, Jinjin Wu, Chenying Zhu, Jie Liu, Xiaoli Chen, Tao Zhuang, Yashu Kuang, et al. 2020. « Endothelial S1pr1 Regulates Pressure Overload-Induced Cardiac Remodelling through AKT-ENOS Pathway ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 24 (2): 2013-26. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14900>.
- Löffler, Adrián I., Jonathan A. Pan, Pelbretton C. Balfour, Peter W. Shaw, Yang Yang, Moiz Nasir, Daniel A. Auger, et al. 2019. « Frequency of Coronary Microvascular Dysfunction and Diffuse Myocardial Fibrosis (Measured by Cardiovascular Magnetic Resonance) in Patients With Heart Failure and Preserved Left Ventricular Ejection Fraction ». *The American Journal of Cardiology* 124 (10): 1584-89. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2019.08.011>.
- Lou, Meiqing, Wenhua Wang, Jia Yin, Xianzhen Chen, Daming Cui, et Shixin Gu. 2012. « Aberrant Activation of Hedgehog/Gli1 Pathway on Angiogenesis in Gliomas ». *Neurology India* 60 (6): 589. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.105192>.
- Loungani, Rahul S., John R. Teerlink, Marco Metra, Larry A. Allen, Javed Butler, Peter E. Carson, Chien-Wei Chen, et al. 2020. « Cause of Death in Patients With Acute Heart Failure ». *JACC: Heart Failure* 8 (12): 999-1008. <https://doi.org/10.1016/j.jchf.2020.09.010>.
- Lovelock, Joshua D., Michelle M. Monasky, Euy-Myoung Jeong, Harvey A. Lardin, Hong Liu, Bindiya G. Patel, Domenico M. Taglieri, et al. 2012. « Ranolazine Improves Cardiac Diastolic Dysfunction Through Modulation of Myofilament Calcium Sensitivity ». *Circulation Research* 110 (6): 841-50. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.258251>.
- Lyle, Melissa A., et Frank V. Brozovich. 2018. « HFpEF, a Disease of the Vasculature: A Closer Look at the Other Half ». *Mayo Clinic Proceedings* 93 (9): 1305-14. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.05.001>.
- Ma, Yingxu, Shanshan Liu, Heejin Jun, et Jun Wu. 2022. « CHRNA2: A New Paradigm in Beige Thermoregulation and Metabolism ». *Trends in Cell Biology* 32 (6): 479-89. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.11.009>.
- Maizel, Julien, Sandhya Xavier, Jun Chen, Chi Hua Sarah Lin, Radovan Vasko, et Michael S. Goligorsky. 2014. « Sirtuin 1 ablation in endothelial cells is associated with impaired angiogenesis and diastolic dysfunction ». *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 307 (12): H1691-1704. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00281.2014>.
- Maquart, F. X., G. Bellon, S. Pasco, et J. C. Monboisse. 2005. « Matrikines in the Regulation of Extracellular Matrix Degradation ». *Biochimie* 87 (3-4): 353-60. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.10.006>.
- Maréchaux, Sylvestre, Rohan Samson, Eric van Belle, Joke Breyne, Juliette de Monte, Céline Dédrie, Nassim Chebai, et al. 2016. « Vascular and Microvascular Endothelial Function in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction ». *Journal of Cardiac Failure* 22 (1): 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2015.09.003>.
- Marrachelli, Vannina González, Maria Letizia Mastronardi, Mamadou Sarr, Raffaella Soleti, Daniela Leonetti, María Carmen Martínez, et Ramaroson Andriantsitohaina. 2013. « Sonic Hedgehog Carried by Microparticles Corrects Angiotensin II-Induced Hypertension and Endothelial

- Dysfunction in Mice ». Édité par Jane-Lise Samuel. *PLoS ONE* 8 (8): e72861. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072861>.
- Martin, S, K Emanuel, C Sears, Y Zhang, et B Casadei. 2006. « Are Myocardial ENOS and NNOS Involved in the β -Adrenergic and Muscarinic Regulation of Inotropy? A Systematic Investigation ». *Cardiovascular Research* 70 (1): 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.02.002>.
- Martínez, Gonzalo J., Stacy Robertson, Jennifer Barraclough, Qiong Xia, Ziad Mallat, Christina Bursill, David S. Celermajer, et Sanjay Patel. 2015. « Colchicine Acutely Suppresses Local Cardiac Production of Inflammatory Cytokines in Patients With an Acute Coronary Syndrome ». *Journal of the American Heart Association* 4 (8): e002128. <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002128>.
- Mayr, Daniela, Julia Preishuber-Pflügl, Andreas Koller, Susanne M. Brunner, Christian Runge, Anja-Maria Ladek, Francisco J. Rivera, Herbert A. Reitsamer, et Andrea Trost. 2022. « Characterization of the Two Inducible Cre Recombinase-Based Mouse Models NG2-CreERTM and PDGFRb-P2A-CreERT2 for Pericyte Labeling in the Retina ». *Current Eye Research*, mars, 1-7. <https://doi.org/10.1080/02713683.2021.2002910>.
- McDonagh, Theresa A, Marco Metra, Marianna Adamo, Roy S Gardner, Andreas Baumbach, Michael Böhm, Haran Burri, et al. 2021. « 2021 ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure ». *European Heart Journal* 42 (36): 3599-3726. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab368>.
- McMurray, John J. V., Scott D. Solomon, Silvio E. Inzucchi, Lars Køber, Mikhail N. Kosiborod, Felipe A. Martinez, Piotr Ponikowski, et al. 2019. « Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction ». *The New England Journal of Medicine* 381 (21): 1995-2008. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1911303>.
- Medzikovic, Lejla, Laila Aryan, et Mansoureh Eghbali. 2019. « Connecting Sex Differences, Estrogen Signaling, and MicroRNAs in Cardiac Fibrosis ». *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 97 (10): 1385-98. <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01833-6>.
- Mendelsohn, Michael E. 2002. « Protective Effects of Estrogen on the Cardiovascular System ». *The American Journal of Cardiology* 89 (12): 12-17. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(02\)02405-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(02)02405-0).
- « Ménopause · Inserm, La science pour la santé ». s. d. Inserm. Consulté le 8 septembre 2022. <https://www.inserm.fr/dossier/menopause/>.
- Methner, Carmen, Zhiping Cao, Anusha Mishra, et Sanjiv Kaul. 2021. « Mechanism and Potential Treatment of the “No Reflow” Phenomenon after Acute Myocardial Infarction: Role of Pericytes and GPR39 ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 321 (6): H1030-41. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00312.2021>.
- Mohammed, Selma F., Saad Hussain, Sultan A. Mirzoyev, William D. Edwards, Joseph J. Maleszewski, et Margaret M. Redfield. 2015. « Coronary Microvascular Rarefaction and Myocardial Fibrosis in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction ». *Circulation* 131 (6): 550-59. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.009625>.
- Mohammed, Selma F., Tomohito Ohtani, Josef Korinek, Carolyn S.P. Lam, Katarina Larsen, Robert D. Simari, Maria L. Valencik, John C. Burnett, et Margaret M. Redfield. 2010. « Mineralocorticoid Accelerates Transition to Heart Failure With Preserved Ejection Fraction Via “Nongenomic Effects” ». *Circulation* 122 (4): 370-78. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.915215>.
- Mohan, J. C., K. K. Sethi, R. Arora, et M. Khalilullah. 1992. « Cross Sectional Echocardiographic Left Ventricular Ejection Fraction: Method Based Variability ». *Indian Heart Journal* 44 (1): 23-28.
- Montreal Heart Institute. 2022. « A Biomarker Study Assessing the Effects of Colchicine on Inflammation and Extra-Cellular Matrix Turnover in Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. » Clinical trial registration NCT04857931. [clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04857931](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04857931).

- Mora, Pierre, Pierre-Louis Hollier, Sarah Guimbal, Alice Abelanet, Aïssata Diop, Lauriane Cornuault, Thierry Couffignal, et al. 2020. « Blood–Brain Barrier Genetic Disruption Leads to Protective Barrier Formation at the Glia Limitans ». Édité par Richard Daneman. *PLOS Biology* 18 (11): e3000946. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000946>.
- Morey, K. Anjali, Mahnaz Razandi, Ali Pedram, Ren-Ming Hu, A. Bruce Prins, et R. Ellis Levin. 1998. « Oestrogen and Progesterone Inhibit the Stimulated Production of Endothelin-1 ». *Biochemical Journal* 330 (3): 1097-1105. <https://doi.org/10.1042/bj3301097>.
- Muka, Taulant, Eralda Asllanaj, Naim Avazverdi, Loes Jaspers, Najada Stringa, Jelena Milic, Symen Ligthart, et al. 2017. « Age at Natural Menopause and Risk of Type 2 Diabetes: A Prospective Cohort Study ». *Diabetologia* 60 (10): 1951-60. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4346-8>.
- Munagala, Vijaya K., Chari Y.T. Hart, John C. Burnett, Donna M. Meyer, et Margaret M. Redfield. 2005. « Ventricular Structure and Function in Aged Dogs With Renal Hypertension: A Model of Experimental Diastolic Heart Failure ». *Circulation* 111 (9): 1128-35. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000157183.21404.63>.
- Münzel, Thomas, Tommaso Gori, John F. Keane, Christoph Maack, et Andreas Daiber. 2015. « Pathophysiological Role of Oxidative Stress in Systolic and Diastolic Heart Failure and Its Therapeutic Implications ». *European Heart Journal* 36 (38): 2555-64. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv305>.
- Murdoch, Colin E. 2014. « Endothelial NADPH Oxidase-2 Promotes Interstitial Cardiac Fibrosis and Diastolic Dysfunction Through Proinflammatory Effects and Endothelial-Mesenchymal Transition » 63 (24): 8.
- Murdoch, Colin E., Sanjay Chaubey, Lingfang Zeng, Bin Yu, Aleksander Ivetic, Simon J. Walker, Davy Vanhoutte, 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): 2734-41. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.02.572>.
- Murphy, Elizabeth. 2011. « Estrogen Signaling and Cardiovascular Disease ». Édité par Daniel P. Kelly. *Circulation Research* 109 (6): 687-96. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.236687>.
- Nakai, Kenji, Chuichi Itoh, Kazuhiko Hotta, Tomonori Itoh, Masao Yoshizumi, et Katsuhiko Hiramori. 1994. « Estradiol-17 β Regulates the Induction of VCAM-1 mRNA Expression by Interleukin-1 β in Human Umbilical Vein Endothelial Cells ». *Life Sciences* 54 (13): PL221-27. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(94\)00630-X](https://doi.org/10.1016/0024-3205(94)00630-X).
- Nakajima, Hideto, Tatsuro Ishida, Seimi Satomi-Kobayashi, Kenta Mori, Tetsuya Hara, Naoto Sasaki, Tomoyuki Yasuda, et al. 2013. « Endothelial Lipase Modulates Pressure Overload-Induced Heart Failure through Alternative Pathway for Fatty Acid Uptake ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 61 (5): 1002-7. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.201608>.
- Nassif, Michael E., Sheryl L. Windsor, Barry A. Borlaug, Dalane W. Kitzman, Sanjiv J. Shah, Fengming Tang, Yevgeniy Khariton, et al. 2021. « The SGLT2 Inhibitor Dapagliflozin in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: A Multicenter Randomized Trial ». *Nature Medicine* 27 (11): 1954-60. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01536-x>.
- Nathan, Lauren, Shehla Pervin, Rajan Singh, Michael Rosenfeld, et Gautam Chaudhuri. 1999. « Estradiol Inhibits Leukocyte Adhesion and Transendothelial Migration in Rabbits In Vivo: Possible Mechanisms for Gender Differences in Atherosclerosis ». *Circulation Research* 85 (4): 377-85. <https://doi.org/10.1161/01.RES.85.4.377>.
- Nees, Stephan, Dominik R. Weiss, Anton Senftl, Maria Knott, Stefan Förch, Maximilian Schnurr, Peter Weyrich, et Gerd Juchem. 2012. « Isolation, Bulk Cultivation, and Characterization of Coronary Microvascular Pericytes: The Second Most Frequent Myocardial Cell Type in Vitro ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 302 (1): H69-84. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00359.2011>.
- Nevers, Tania, Ane M. Salvador, Anna Grodecki-Pena, Andrew Knapp, Francisco Velázquez, Mark Aronovitz, Navin K. Kapur, Richard H. Karas, Robert M. Blanton, et Pilar Alcaide. 2015. « Left Ventricular T-Cell Recruitment Contributes to the Pathogenesis of Heart Failure ».

- Circulation. Heart Failure* 8 (4): 776-87.
<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002225>.
- Nidorf, Stefan M., Aernoud T.L. Fiolet, Arend Mosterd, John W. Eikelboom, Astrid Schut, Tjerk S.J. Opstal, Salem H.K. The, et al. 2020. « Colchicine in Patients with Chronic Coronary Disease ». *New England Journal of Medicine* 383 (19): 1838-47.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2021372>.
- Nijenkamp, Louise L. A. M., Ilse A. E. Bollen, Hans W. M. Niessen, Cris G. Dos Remedios, Michelle Michels, Corrado Poggesi, Carolyn Y. Ho, Diederik W. D. Kuster, et Jolanda van der Velden. 2020. « Sex-Specific Cardiac Remodeling in Early and Advanced Stages of Hypertrophic Cardiomyopathy ». *PLoS One* 15 (5): e0232427.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232427>.
- Nikolakopoulou, Angeliki M., Axel Montagne, Kassandra Kisler, Zhonghua Dai, Yaoming Wang, Mikko T. Huuskonen, Abhay P. Sagare, et al. 2019. « Pericyte loss leads to circulatory failure and pleiotrophin depletion causing neuron loss ». *Nature neuroscience* 22 (7): 1089-98.
<https://doi.org/10.1038/s41593-019-0434-z>.
- Nikolakopoulou, Angeliki Maria, Zhen Zhao, Axel Montagne, et Berislav V. Zlokovic. 2017. « Regional Early and Progressive Loss of Brain Pericytes but Not Vascular Smooth Muscle Cells in Adult Mice with Disrupted Platelet-Derived Growth Factor Receptor- β Signaling ». *PLoS One* 12 (4): e0176225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176225>.
- Nüsslein-Volhard, Christiane, et Eric Wieschaus. 1980. « Mutations Affecting Segment Number and Polarity in *Drosophila* ». *Nature* 287 (5785): 795-801. <https://doi.org/10.1038/287795a0>.
- Oelze, Matthias, Swenja Kröller-Schön, Philipp Welschof, Thomas Jansen, Michael Hausding, Yuliya Mikhed, Paul Stamm, et al. 2014. « The Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitor Empagliflozin Improves Diabetes-Induced Vascular Dysfunction in the Streptozotocin Diabetes Rat Model by Interfering with Oxidative Stress and Glucotoxicity ». Édité par Andrea Cignarella. *PLoS ONE* 9 (11): e112394. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112394>.
- O'Farrell, Fergus M., Svetlana Mastitskaya, Matthew Hammond-Haley, Felipe Freitas, Wen Rui Wah, et David Attwell. 2017. « Capillary Pericytes Mediate Coronary No-Reflow after Myocardial Ischaemia ». *eLife* 6 (novembre): e29280. <https://doi.org/10.7554/eLife.29280>.
- Øie, Erik, Wiggo J. Sandberg, Mohammad Shakil Ahmed, Arne Yndestad, Ole Didrik Lærum, Håvard Attramadal, Pål Aukrust, et Hans Geir Eiken. 2010. « Activation of Notch Signaling in Cardiomyocytes during Post-Infarction Remodeling ». *Scandinavian Cardiovascular Journal: SCJ* 44 (6): 359-66. <https://doi.org/10.3109/14017431.2010.511256>.
- Olsen, Catherine L, Pin-Pin Hsu, Jens Glienke, Gabor M Rubanyi, et Alan R Brooks. 2004. « Hedgehog-Interacting Protein Is Highly Expressed in Endothelial Cells but down-Regulated during Angiogenesis and in Several Human Tumors ». *BMC Cancer* 4 (1): 43.
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-4-43>.
- Olver, T. Dylan, Jenna C. Edwards, Thomas J. Jurrissen, Adam B. Veteto, John L. Jones, Chen Gao, Christoph Rau, et al. 2019. « Western Diet-Fed, Aortic-Banded Ossabaw Swine ». *JACC: Basic to Translational Science* 4 (3): 404-21. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2019.02.004>.
- Özcelik, Cemil, Bettina Erdmann, Bernhard Pilz, Nina Wettschureck, Stefan Britsch, Norbert Hübner, Kenneth R. Chien, Carmen Birchmeier, et Alistair N. Garratt. 2002. « Conditional Mutation of the ErbB2 (HER2) Receptor in Cardiomyocytes Leads to Dilated Cardiomyopathy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (13): 8880-85.
<https://doi.org/10.1073/pnas.122249299>.
- Pabel, Steffen, Stefan Wagner, Hannah Bollenberg, Philipp Bengel, Árpád Kovács, Christian Schach, Petros Tirilomis, et al. 2018. « Empagliflozin Directly Improves Diastolic Function in Human Heart Failure ». *European Journal of Heart Failure* 20 (12): 1690-1700.
<https://doi.org/10.1002/ejhf.1328>.
- Palladino, M., I. Gatto, V. Neri, S. Straino, M. Silver, A. Tritarelli, A. Piccioni, et al. 2011. « Pleiotropic Beneficial Effects of Sonic Hedgehog Gene Therapy in an Experimental Model of Peripheral Limb Ischemia ». *Mol Ther* 19 (4): 658-66.

- Parikh, Victoria N., Jing Liu, Ching Shang, Christopher Woods, Alex C. Chang, Mingming Zhao, David N. Charo, et al. 2018. « Apelin and APJ Orchestrate Complex Tissue-Specific Control of Cardiomyocyte Hypertrophy and Contractility in the Hypertrophy-Heart Failure Transition ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 315 (2): H348-56. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00693.2017>.
- Patel, Ravi B., Laura A. Colangelo, Alexander P. Reiner, Myron D. Gross, David R. Jacobs, Lenore J. Launer, Joao A.C. Lima, Donald M. Lloyd-Jones, et Sanjiv J. Shah. 2020. « Cellular Adhesion Molecules in Young Adulthood and Cardiac Function in Later Life ». *Journal of the American College of Cardiology* 75 (17): 2156-65. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.02.060>.
- Paulus, W. J., et C. Tschope. 2013. « A Novel Paradigm for Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: Comorbidities Drive Myocardial Dysfunction and Remodeling through Coronary Microvascular Endothelial Inflammation ». *J Am Coll Cardiol* 62 (4): 263-71. [https://doi.org/S0735-1097\(13\)01890-1](https://doi.org/S0735-1097(13)01890-1) [pii] 10.1016/j.jacc.2013.02.092.
- Paulus, Walter J., et Carsten Tschöpe. 2013. « A Novel Paradigm for Heart Failure With Preserved Ejection Fraction ». *Journal of the American College of Cardiology* 62 (4): 263-71. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.02.092>.
- Pedram, Ali, Mahnaz Razandi, Mark Aitkenhead, et Ellis R. Levin. 2005. « Estrogen Inhibits Cardiomyocyte Hypertrophy in Vitro ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (28): 26339-48. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414409200>.
- Pepicelli, Carmen V., Paula M. Lewis, et Andrew P. McMahon. 1998. « Sonic Hedgehog Regulates Branching Morphogenesis in the Mammalian Lung ». *Current Biology* 8 (19): 1083-86. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70446-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70446-4).
- Petrova, Ralitsa, et Alexandra L. Joyner. 2014. « Roles for Hedgehog Signaling in Adult Organ Homeostasis and Repair ». *Development* 141 (18): 3445-57. <https://doi.org/10.1242/dev.083691>.
- Pieske, Burkert, Carsten Tschöpe, Rudolf A de Boer, Alan G Fraser, Stefan D Anker, Erwan Donal, Frank Edelmann, 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): 3297-3317. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz641>.
- Pola, R., L. E. Ling, T. R. Aprahamian, E. Barban, M. Bosch-Marce, C. Curry, M. Corbley, M. Kearney, J. M. Isner, et D. W. Losordo. 2003. « Postnatal recapitulation of embryonic hedgehog pathway in response to skeletal muscle ischemia ». *Circulation* 108 (4): 479-85.
- Pola, R., L. E. Ling, M. Silver, M. J. Corbley, M. Kearney, R. Blake Pepinsky, R. Shapiro, et al. 2001. « The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors ». *Nat Med* 7 (6): 706-11.
- Pola, Roberto, Leona E. Ling, Marcy Silver, Michael J. Corbley, Marianne Kearney, R. Blake Pepinsky, Renee Shapiro, et al. 2001. « The Morphogen Sonic Hedgehog Is an Indirect Angiogenic Agent Upregulating Two Families of Angiogenic Growth Factors ». *Nature Medicine* 7 (6): 706-11. <https://doi.org/10.1038/89083>.
- Qin, Yuan, Yan-Huan He, Ning Hou, Gen-Shui Zhang, Yi Cai, Gui-Ping Zhang, Qing Xiao, et al. 2016. « Sonic Hedgehog Improves Ischemia-Induced Neovascularization by Enhancing Endothelial Progenitor Cell Function in Type 1 Diabetes ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 423 (mars): 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.01.005>.
- Raju, Nina C., Qilong Yi, Mark Nidorf, Nick D. Fagel, Rajesh Hiralal, et John W. Eikelboom. 2012. « Effect of Colchicine Compared with Placebo on High Sensitivity C-Reactive Protein in Patients with Acute Coronary Syndrome or Acute Stroke: A Pilot Randomized Controlled Trial ». *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 33 (1): 88-94. <https://doi.org/10.1007/s11239-011-0637-y>.
- Ramsbottom, Simon, et Mary Pownall. 2016. « Regulation of Hedgehog Signalling Inside and Outside the Cell ». *Journal of Developmental Biology* 4 (3): 23. <https://doi.org/10.3390/jdb4030023>.

- Rastaldo, R., P. Pagliaro, S. Cappello, C. Penna, D. Mancardi, N. Westerhof, et G. Losano. 2007. « Nitric Oxide and Cardiac Function ». *Life Sciences* 81 (10): 779-93. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.07.019>.
- Reddy, Sukka Santosh, Heena Agarwal, et Manoj Kumar Barthwal. 2018. « Cilostazol Ameliorates Heart Failure with Preserved Ejection Fraction and Diastolic Dysfunction in Obese and Non-Obese Hypertensive Mice ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 123 (octobre): 46-57. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.08.017>.
- Redfield, Margaret M., Horng H. Chen, Barry A. Borlaug, Marc J. Semigran, Kerry L. Lee, Gregory Lewis, Martin M. LeWinter, et al. 2013. « Effect of Phosphodiesterase-5 Inhibition on Exercise Capacity and Clinical Status in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Randomized Clinical Trial ». *JAMA* 309 (12): 1268. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.2024>.
- Reed, Alana L., Atsuko Tanaka, Dan Sorescu, Hong Liu, Euy-Myoung Jeong, Megan Sturdy, Erik R. Walp, Samuel C. Dudley, et Roy L. Sutliff. 2011. « Diastolic Dysfunction Is Associated with Cardiac Fibrosis in the Senescence-Accelerated Mouse ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 301 (3): H824-31. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00407.2010>.
- Regan, Jessica A., Adolfo Gabriele Mauro, Salvatore Carbone, Carlo Marchetti, Rabia Gill, Eleonora Mezzaroma, Juan Valle Raleigh, et al. 2015. « A Mouse Model of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction Due to Chronic Infusion of a Low Subpressor Dose of Angiotensin II ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 309 (5): H771-78. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00282.2015>.
- Ren, Guofeng, Lloyd H. Michael, Mark L. Entman, et Nikolaos G. Frangogiannis. 2002. « Morphological Characteristics of the Microvasculature in Healing Myocardial Infarcts ». *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 50 (1): 71-79. <https://doi.org/10.1177/002215540205000108>.
- Renault, M. A., C. Chapouly, Q. Yao, F. Larrieu-Lahargue, S. Vandierdonck, A. Reynaud, M. Petit, et al. 2013. « Desert Hedgehog Promotes Ischemia-Induced Angiogenesis by Ensuring Peripheral Nerve Survival ». *Circ Res* 112 (5): 762-70.
- Renault, M. A., F. Robbesyn, C. Chapouly, Q. Yao, S. Vandierdonck, A. Reynaud, I. Belloc, et al. 2013. « Hedgehog-Dependent Regulation of Angiogenesis and Myogenesis Is Impaired in Aged Mice ». *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33 (12): 2858-66.
- Renault, M. A., J. Roncalli, J. Tongers, S. Misener, T. Thorne, K. Jujo, A. Ito, et al. 2009. « The Hedgehog Transcription Factor Gli3 Modulates Angiogenesis ». *Circ Res* 105 (8): 818-26.
- Renault, Marie-Ange, Jérôme Roncalli, Jörn Tongers, Tina Thorne, Ekaterina Klyachko, Sol Misener, Olga V. Volpert, et al. 2010. « Sonic Hedgehog Induces Angiogenesis via Rho Kinase-Dependent Signaling in Endothelial Cells ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 49 (3): 490-98. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.05.003>.
- Robinson, Fulton A., Ryan P. Mihealsick, Brant M. Wagener, Peter Hanna, Megan D. Poston, Igor R. Efimov, Kalyanam Shivkumar, et Donald B. Hoover. 2020. « Role of angiotensin-converting enzyme 2 and pericytes in cardiac complications of COVID-19 infection ». *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 319 (5): H1059-68. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00681.2020>.
- Robison, W. G., P. F. Kador, et J. H. Kinoshita. 1985. « Early Retinal Microangiopathy: Prevention with Aldose Reductase Inhibitors ». *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association* 2 (3): 196-99. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.1985.tb00635.x>.
- Rodríguez, Emma, Rebeca López, Araceli Paez, Felipe Massó, et Luis F. Montaña. 2002. « 17Beta-Estradiol Inhibits the Adhesion of Leukocytes in TNF-Alpha Stimulated Human Endothelial Cells by Blocking IL-8 and MCP-1 Secretion, but Not Its Transcription ». *Life Sciences* 71 (18): 2181-93. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(02\)01999-9](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(02)01999-9).
- Roh, Jason D., Nicholas Houstis, Andy Yu, Bliss Chang, Ashish Yeri, Haobo Li, Ryan Hobson, et al. 2020. « Exercise Training Reverses Cardiac Aging Phenotypes Associated with Heart Failure with

- Preserved Ejection Fraction in Male Mice ». *Aging Cell* 19 (6).
<https://doi.org/10.1111/accel.13159>.
- Rolle, Irene Giulia, Ilaria Crivellari, Andrea Zanello, Elisa Mazzega, Emiliano Dalla, Michela Bulfoni, Elisa Avolio, et al. 2021. « Heart Failure Impairs the Mechanotransduction Properties of Human Cardiac Pericytes ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 151 (février): 15-30.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.10.016>.
- Roncalli, J., M. A. Renault, J. Tongers, S. Misener, T. Thorne, C. Kamide, K. Jujo, et al. 2011. « Sonic Hedgehog-Induced Functional Recovery after Myocardial Infarction Is Enhanced by AMD3100-Mediated Progenitor-Cell Mobilization ». *J Am Coll Cardiol* 57 (24): 2444-52.
- Rowitch, David H., Benoit St.-Jacques, Scott M. K. Lee, Jonathon D. Flax, Evan Y. Snyder, et Andrew P. McMahon. 1999. « *Sonic Hedgehog* Regulates Proliferation and Inhibits Differentiation of CNS Precursor Cells ». *The Journal of Neuroscience* 19 (20): 8954-65.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-20-08954.1999>.
- Rubanyi, Gabor M, Anthony Johns, et Katalin Kauser. 2002. « Effect of Estrogen on Endothelial Function and Angiogenesis ». *Vascular Pharmacology* 38 (2): 89-98.
[https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(02\)00131-3](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(02)00131-3).
- Rudin, Charles M., Christine L. Hann, John Laterra, Robert L. Yauch, Christopher A. Callahan, Ling Fu, Thomas Holcomb, et al. 2009. « Treatment of Medulloblastoma with Hedgehog Pathway Inhibitor GDC-0449 ». *New England Journal of Medicine* 361 (12): 1173-78.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0902903>.
- Rudziak, Paulina, Christopher G. Ellis, et Paulina M. Kowalewska. 2019. « Role and Molecular Mechanisms of Pericytes in Regulation of Leukocyte Diapedesis in Inflamed Tissues ». *Mediators of Inflammation* 2019 (mai): 1-9. <https://doi.org/10.1155/2019/4123605>.
- Sakai, Takaaki, et Shinichiro Miura. 2019. « Effects of Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitor on Vascular Endothelial and Diastolic Function in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction — Novel Prospective Cohort Study — ». *Circulation Reports* 1 (7): 286-95.
<https://doi.org/10.1253/circrep.CR-19-0018>.
- Salvador, Ane M., Tania Nevers, Francisco Velázquez, Mark Aronovitz, Bonnie Wang, Ana Abadía Molina, Iris Z. Jaffe, Richard H. Karas, Robert M. Blanton, et Pilar Alcaide. 2016. « Intercellular Adhesion Molecule 1 Regulates Left Ventricular Leukocyte Infiltration, Cardiac Remodeling, and Function in Pressure Overload-Induced Heart Failure ». *Journal of the American Heart Association* 5 (3): e003126. <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.003126>.
- Sarafidis. 2016. « Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes ». *New England Journal of Medicine* 374 (11): 1092-94. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1600827>.
- Scales, Suzie J., et Frederic J. de Sauvage. 2009. « Mechanisms of Hedgehog Pathway Activation in Cancer and Implications for Therapy ». *Trends in Pharmacological Sciences* 30 (6): 303-12.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.03.007>.
- Schauer, Antje, Volker Adams, Antje Augstein, Anett Jannasch, Runa Draskowski, Virginia Kirchhoff, Keita Goto, et al. 2021. « Sacubitril/Valsartan Improves Diastolic Function But Not Skeletal Muscle Function in a Rat Model of HFpEF ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (7): 3570. <https://doi.org/10.3390/ijms22073570>.
- Schiattarella, Gabriele G., Francisco Altamirano, Dan Tong, Kristin M. French, Elisa Villalobos, Soo Young Kim, Xiang Luo, et al. 2019. « Nitrosative Stress Drives Heart Failure with Preserved Ejection Fraction ». *Nature* 568 (7752): 351-56. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1100-z>.
- Schiller, N. B., P. M. Shah, M. Crawford, A. DeMaria, R. Devereux, H. Feigenbaum, H. Gutgesell, N. Reichek, D. Sahn, et I. Schnittger. 1989. « Recommendations for Quantitation of the Left Ventricle by Two-Dimensional Echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms ». *Journal of the American Society of Echocardiography: Official Publication of the American Society of Echocardiography* 2 (5): 358-67. [https://doi.org/10.1016/s0894-7317\(89\)80014-8](https://doi.org/10.1016/s0894-7317(89)80014-8).

- Schmederer, Zelia, Natale Rolim, T. Scott Bowen, Axel Linke, Ulrik Wisloff, et Volker Adams. 2018. « Endothelial Function Is Disturbed in a Hypertensive Diabetic Animal Model of HFpEF: Moderate Continuous vs. High Intensity Interval Training ». *International Journal of Cardiology* 273 (décembre): 147-54. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.08.087>.
- Schwarzl, Michael, Nazha Hamdani, Sebastian Seiler, Alessio Alogna, Martin Manninger, Svetlana Reilly, Birgit Zirngast, et al. 2015. « A Porcine Model of Hypertensive Cardiomyopathy: Implications for Heart Failure with Preserved Ejection Fraction ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 309 (9): H1407-18. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00542.2015>.
- Scimia, Maria Cecilia, Cecilia Hurtado, Saugata Ray, Scott Metzler, Ke Wei, Jianming Wang, Chris E. Woods, et al. 2012. « APJ Acts as a Dual Receptor in Cardiac Hypertrophy ». *Nature* 488 (7411): 394-98. <https://doi.org/10.1038/nature11263>.
- Selvaraj, Senthil, Eva E. Martinez, Frank G. Aguilar, Kwang-Youn A. Kim, Jie Peng, Jin Sha, Marguerite R. Irvin, et al. 2016. « Association of Central Adiposity With Adverse Cardiac Mechanics: Findings From the Hypertension Genetic Epidemiology Network Study ». *Circulation: Cardiovascular Imaging* 9 (6): e004396. <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.115.004396>.
- Sengillo, Jesse D., Ethan A. Winkler, Corey T. Walker, John S. Sullivan, Mahlon Johnson, et Berislav V. Zlokovic. 2013. « Deficiency in Mural Vascular Cells Coincides with Blood-Brain Barrier Disruption in Alzheimer's Disease ». *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 23 (3): 303-10. <https://doi.org/10.1111/bpa.12004>.
- Shah, A. 2000. « Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function ». *Pharmacology & Therapeutics* 86 (1): 49-86. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(99\)00072-8](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(99)00072-8).
- Shah, Sanjiv J, Carolyn S P Lam, Sara Svedlund, Antti Saraste, Camilla Hage, Ru-San Tan, Lauren Beussink-Nelson, et al. 2018. « Prevalence and Correlates of Coronary Microvascular Dysfunction in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: PROMIS-HFpEF ». *European Heart Journal* 39 (37): 3439-50. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy531>.
- Sharp, Thomas E., Amy L. Scarborough, Zhen Li, David J. Polhemus, Hunter A. Hidalgo, Jeffery D. Schumacher, Timothy R. Matsuura, et al. 2021. « Novel Göttingen Miniswine Model of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction Integrating Multiple Comorbidities ». *JACC: Basic to Translational Science* 6 (2): 154-70. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2020.11.012>.
- Shiota, Naotaka, Jaana Rysä, Petri T. Kovanen, Heikki Ruskoaho, Jorma O. Kokkonen, et Ken A. Lindstedt. 2003. « A Role for Cardiac Mast Cells in the Pathogenesis of Hypertensive Heart Disease ». *Journal of Hypertension* 21 (10): 1935-44. <https://doi.org/10.1097/00004872-200310000-00022>.
- Shohet, Ralph V., Yaz Y. Kisanuki, Xiao-Song Zhao, Zakir Siddiquee, Fatima Franco, et Masashi Yanagisawa. 2004. « Mice with Cardiomyocyte-Specific Disruption of the Endothelin-1 Gene Are Resistant to Hyperthyroid Cardiac Hypertrophy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (7): 2088-93. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307159101>.
- Siao, Chia-Jen, Christina U. Lorentz, Pouneh Kermani, Tina Marinic, John Carter, Kelly McGrath, Victoria A. Padow, et al. 2012. « ProNGF, a Cytokine Induced after Myocardial Infarction in Humans, Targets Pericytes to Promote Microvascular Damage and Activation ». *Journal of Experimental Medicine* 209 (12): 2291-2305. <https://doi.org/10.1084/jem.20111749>.
- Silberman, Gad A., Tai-Hwang M. Fan, Hong Liu, Zhe Jiao, Hong D. Xiao, Joshua D. Lovelock, Beth M. Boulden, et al. 2010. « Uncoupled Cardiac Nitric Oxide Synthase Mediates Diastolic Dysfunction ». *Circulation* 121 (4): 519-28. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.883777>.
- Simoncini, T., R. De Caterina, et A. R. Genazzani. 1999. « Selective Estrogen Receptor Modulators: Different Actions on Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) Expression in Human Endothelial Cells ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84 (2): 815-18. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.2.5570>.

- Simpkin, J. C., D. M. Yellon, S. M. Davidson, S. Y. Lim, A. M. Wynne, et C. C. T. Smith. 2007. « Apelin-13 and Apelin-36 Exhibit Direct Cardioprotective Activity against Ischemiareperfusion Injury ». *Basic Research in Cardiology* 102 (6): 518-28. <https://doi.org/10.1007/s00395-007-0671-2>.
- Singh, Vir B., Meera V. Singh, Santhi Gorantla, Larisa Y. Poluektova, et Sanjay B. Maggirwar. 2016. « Smoothened Agonist Reduces Human Immunodeficiency Virus Type-1-Induced Blood-Brain Barrier Breakdown in Humanized Mice ». *Scientific Reports* 6 (1). <https://doi.org/10.1038/srep26876>.
- Singh, Vir B., Meera V. Singh, Dorota Piekna-Przybylska, Santhi Gorantla, Larisa Y. Poluektova, et Sanjay B. Maggirwar. 2017. « Sonic Hedgehog Mimetic Prevents Leukocyte Infiltration into the CNS during Acute HIV Infection ». *Scientific Reports* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10241-0>.
- Soriano, P. 1994. « Abnormal Kidney Development and Hematological Disorders in PDGF Beta-Receptor Mutant Mice ». *Genes & Development* 8 (16): 1888-96. <https://doi.org/10.1101/gad.8.16.1888>.
- Sorop, Oana, Ilkka Heinonen, Matthijs van Kranenburg, Jens van de Wouw, Vincent J de Beer, Isabel T N Nguyen, Yanti Octavia, Robert-Jan van Geuns, Piotr A Wielopolski, et Gabriel P Krestin. s. d. « Multiple Common Comorbidities Produce Left Ventricular Diastolic Dysfunction Associated with Coronary Microvascular Dysfunction, Oxidative Stress, and Myocardial Stiffening », 11.
- Soucy, Geneviève, Guy Boivin, et Fernand Labrie. s. d. « Estradiol Is Required for a Proper Immune Response to Bacterial and Viral Pathogens in the Female Brain », 9.
- Spertus, John A., Mary C. Birmingham, Michael Nassif, C. V. Damaraju, Antonio Abbate, Javed Butler, David E. Lanfear, Ildiko Lingvay, Mikhail N. Kosiborod, et James L. Januzzi. 2022. « The SGLT2 Inhibitor Canagliflozin in Heart Failure: The CHIEF-HF Remote, Patient-Centered Randomized Trial ». *Nature Medicine* 28 (4): 809-13. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01703-8>.
- Spyridopoulos, Ioakim, Alison B. Sullivan, Marianne Kearney, Jeffrey M. Isner, et Douglas W. Losordo. 1997. « Estrogen-Receptor-Mediated Inhibition of Human Endothelial Cell Apoptosis: Estradiol as a Survival Factor ». *Circulation* 95 (6): 1505-14. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.95.6.1505>.
- Srivaratharajah, Kajenny, Thais Coutinho, Robert deKemp, Peter Liu, Haissam Haddad, Ellamae Stadnick, Ross A. Davies, et al. 2016. « Reduced Myocardial Flow in Heart Failure Patients With Preserved Ejection Fraction ». *Circulation: Heart Failure* 9 (7): e002562. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002562>.
- Stallcup, William B. 2013. « Bidirectional Myoblast-Pericyte Plasticity ». *Developmental Cell* 24 (6): 563-64. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.02.018>.
- Stanton, Benjamin Z., et Lee F. Peng. 2010. « Small-Molecule Modulators of the Sonic Hedgehog Signaling Pathway ». *Mol. BioSyst.* 6 (1): 44-54. <https://doi.org/10.1039/B910196A>.
- Stanton, Benjamin Z, Lee F Peng, Nicole Maloof, Kazuo Nakai, Xiang Wang, Jay L Duffner, Kennedy M Taveras, et al. 2009. « A Small Molecule That Binds Hedgehog and Blocks Its Signaling in Human Cells ». *Nature Chemical Biology* 5 (3): 154-56. <https://doi.org/10.1038/nchembio.142>.
- Stolfo, Davide, Alicia Uijl, Ola Vedin, Anna Strömberg, Ulrika Ljung Faxén, Giuseppe M.C. Rosano, Gianfranco Sinagra, Ulf Dahlström, et Gianluigi Savarese. 2019. « Sex-Based Differences in Heart Failure Across the Ejection Fraction Spectrum ». *JACC: Heart Failure* 7 (6): 505-15. <https://doi.org/10.1016/j.jchf.2019.03.011>.
- Su, Han, Aubrey C. Cantrell, Heng Zeng, Shai-Hong Zhu, et Jian-Xiong Chen. 2021. « Emerging Role of Pericytes and Their Secretome in the Heart ». *Cells* 10 (3): 548. <https://doi.org/10.3390/cells10030548>.
- Su, Han, Heng Zeng, Bo Liu, et Jian-Xiong Chen. 2020. « Sirtuin 3 Is Essential for Hypertension-induced Cardiac Fibrosis via Mediating Pericyte Transition ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 24 (14): 8057-68. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15437>.

- Subramanya, Vinita, Di Zhao, Pamela Ouyang, Joao A. Lima, Dhananjay Vaidya, Chiadi E. Ndumele, David A. Bluemke, et al. 2018. « Sex Hormone Levels and Change in Left Ventricular Structure among Men and Post-Menopausal Women: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) ». *Maturitas* 108 (février): 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2017.11.006>.
- Sucato, Vincenzo, Salvatore Evola, Giuseppina Novo, Angela Sansone, Angelo Quagliana, Giuseppe Andolina, Pasquale Assennato, et Salvatore Novo. 2015. « Angiographic Evaluation of Coronary Microvascular Dysfunction in Patients with Heart Failure and Preserved Ejection Fraction ». *Microcirculation* 22 (7): 528-33. <https://doi.org/10.1111/micc.12223>.
- Sun, Xiaodi, Yujiao Sun, Pengcheng Jiang, Guoxian Qi, et Xitao Chen. 2020. « Crosstalk between Endothelial Cell-Specific Calpain Inhibition and the Endothelial-Mesenchymal Transition via the HSP90/Akt Signaling Pathway ». *Biomedicine & Pharmacotherapy* 124 (avril): 109822. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109822>.
- Sun, Xuetao, Blessing Nkenkor, Olya Mastikhina, Kayla Soon, et Sara S. Nunes. 2020. « Endothelium-Mediated Contributions to Fibrosis ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 101 (mai): 78-86. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.10.015>.
- Surace, Enrico M., Kamaljit S. Balaggan, Alessandra Tessitore, Claudio Mussolino, Gabriella Cotugno, Ciro Bonetti, Aniello Vitale, Robin R. Ali, et Alberto Auricchio. 2006. « Inhibition of Ocular Neovascularization by Hedgehog Blockade ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 13 (3): 573-79. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.10.010>.
- Suzuki, Akihiko, Kirnio Mizuno, Yoshimasa Asada, Yasushi Ino, Tomoyuki Kuwayama, Mayumi Okada, Shigehiko Mizutani, et Yutaka Tomoda. 1997. « Effects of 17 β -Estradiol and Progesterone on the Adhesion of Human Monocytic THP-1 Cells to Human Female Endothelial Cells Exposed to Minimally Oxidized LDL ». *Gynecologic and Obstetric Investigation* 44 (1): 47-52. <https://doi.org/10.1159/000291408>.
- Suzuma, I., M. Mandai, H. Takagi, K. Suzuma, A. Otani, H. Oh, K. Kobayashi, et Y. Honda. 1999. « 17 Beta-Estradiol Increases VEGF Receptor-2 and Promotes DNA Synthesis in Retinal Microvascular Endothelial Cells ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40 (9): 2122-29.
- Swirski, Filip K., et Matthias Nahrendorf. 2018. « Cardioimmunology: The Immune System in Cardiac Homeostasis and Disease ». *Nature Reviews. Immunology* 18 (12): 733-44. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0065-8>.
- Szekely, Yishay, et Yaron Arbel. 2018. « A Review of Interleukin-1 in Heart Disease: Where Do We Stand Today? ». *Cardiology and Therapy* 7 (1): 25-44. <https://doi.org/10.1007/s40119-018-0104-3>.
- Szokodi, István, Pasi Tavi, Gábor Földes, Sari Voutilainen-Myllylä, Mika Ilves, Heikki Tokola, Sampsa Pikkarainen, et al. 2002. « Apelin, the Novel Endogenous Ligand of the Orphan Receptor APJ, Regulates Cardiac Contractility ». *Circulation Research* 91 (5): 434-40. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000033522.37861.69>.
- Talman, Virpi, et Riikka Kivelä. 2018. « Cardiomyocyte-Endothelial Cell Interactions in Cardiac Remodeling and Regeneration ». *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 5: 101. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00101>.
- Tang, Xinmiao, Peiwei Wang, Rongli Zhang, Ippei Watanabe, Eugene Chang, Vinesh Vinayachandran, Lalitha Nayak, et al. 2022. « KLF2 Regulates Neutrophil Activation and Thrombosis in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure Progression ». *Journal of Clinical Investigation* 132 (3): e147191. <https://doi.org/10.1172/JCI147191>.
- Tao, Yong-Kang, Heng Zeng, Guo-Qiang Zhang, Sean T. Chen, Xue-Jiao Xie, Xiaochen He, Shuo Wang, Hongyan Wen, et Jian-Xiong Chen. 2017. « Notch3 Deficiency Impairs Coronary Microvascular Maturation and Reduces Cardiac Recovery after Myocardial Ischemia ». *International Journal of Cardiology* 236 (juin): 413-22. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.01.096>.
- Tardif, Jean-Claude, Simon Kouz, David D. Waters, Olivier F. Bertrand, Rafael Diaz, Aldo P. Maggioni, Fausto J. Pinto, et al. 2019. « Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial

- Infarction ». *New England Journal of Medicine* 381 (26): 2497-2505.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1912388>.
- Ternacle, Julien, Feng Wan, Daigo Sawaki, Mathieu Surenaud, Maria Pini, Raquel Mercedes, Laura Ernande, et al. 2017. « Short-Term High-Fat Diet Compromises Myocardial Function: A Radial Strain Rate Imaging Study ». *European Heart Journal - Cardiovascular Imaging* 18 (11): 1283-91. <https://doi.org/10.1093/ehjci/jew316>.
- Tirziu, Daniela, Emmanuel Chorianopoulos, Karen L. Moodie, Robert T. Palac, Zhen W. Zhuang, Marc Tjwa, Carmen Roncal, et al. 2007. « Myocardial Hypertrophy in the Absence of External Stimuli Is Induced by Angiogenesis in Mice ». *Journal of Clinical Investigation* 117 (11): 3188-97. <https://doi.org/10.1172/JCI32024>.
- Tirziu, Daniela, Frank J. Giordano, et Michael Simons. 2010. « Cell Communications in the Heart ». *Circulation* 122 (9): 928-37. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.847731>.
- Tona, Francesco, Roberta Montisci, Laura Iop, et Giovanni Civieri. 2021. « Role of Coronary Microvascular Dysfunction in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction ». *Reviews in Cardiovascular Medicine* 22 (1): 97-104. <https://doi.org/10.31083/j.rcm.2021.01.277>.
- Tromp, Jasper, B. Daan Westenbrink, Wouter Ouwerkerk, Dirk J. van Veldhuisen, Nilesh J. Samani, Piotr Ponikowski, Marco Metra, et al. 2018. « Identifying Pathophysiological Mechanisms in Heart Failure With Reduced Versus Preserved Ejection Fraction ». *Journal of the American College of Cardiology* 72 (10): 1081-90. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.06.050>.
- Tsao, Connie W., Asya Lyass, Danielle Enserro, Martin G. Larson, Jennifer E. Ho, Jorge R. Kizer, John S. Gottdiener, Bruce M. Psaty, et Ramachandran S. Vasan. 2018. « Temporal Trends in the Incidence of and Mortality Associated With Heart Failure With Preserved and Reduced Ejection Fraction ». *JACC. Heart Failure* 6 (8): 678-85.
<https://doi.org/10.1016/j.jchf.2018.03.006>.
- Tsutsui, Masato, Akihide Tanimoto, Masahito Tamura, Hiroshi Mukae, Nobuyuki Yanagihara, Hiroaki Shimokawa, et Yutaka Otsuji. 2015. « Significance of Nitric Oxide Synthases: Lessons from Triple Nitric Oxide Synthases Null Mice ». *Journal of Pharmacological Sciences* 127 (1): 42-52.
<https://doi.org/10.1016/j.jphs.2014.10.002>.
- Vaidya, Kaivan, Clare Arnott, Gonzalo J. Martínez, Bernard Ng, Samuel McCormack, David R. Sullivan, David S. Celermajer, et Sanjay Patel. 2018. « Colchicine Therapy and Plaque Stabilization in Patients With Acute Coronary Syndrome ». *JACC: Cardiovascular Imaging* 11 (2): 305-16.
<https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2017.08.013>.
- Valero-Munoz, Maria, Shanpeng Li, Richard M. Wilson, Batbold Boldbaatar, Marc Iglarz, et Flora Sam. 2016. « Dual Endothelin-A/Endothelin-B Receptor Blockade and Cardiac Remodeling in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction ». *Circulation: Heart Failure* 9 (11).
<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.116.003381>.
- Valero-Muñoz, María, Shanpeng Li, Richard M. Wilson, Maarten Hulsmans, Tamar Aprahamian, José J. Fuster, Matthias Nahrendorf, Philipp E. Scherer, et Flora Sam. 2016. « Heart Failure With Preserved Ejection Fraction Induces Beiging in Adipose Tissue ». *Circulation: Heart Failure* 9 (1). <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002724>.
- Van den Akker, Nynke M.S., Leah C.J. Winkel, Maya H. Nisancioglu, Saskia Maas, Lambertus J. Wisse, Annika Armulik, Robert E. Poelmann, Heleen Lie-Venema, Christer Betsholtz, et Adriana C. Gittenberger-de Groot. 2008. « PDGF-B Signaling Is Important for Murine Cardiac Development: Its Role in Developing Atrioventricular Valves, Coronaries, and Cardiac Innervation ». *Developmental Dynamics* 237 (2): 494-503.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.21436>.
- Van Tassell, Benjamin W., Ignacio M. Seropian, Stefano Toldo, Eleonora Mezzaroma, et Antonio Abbate. 2013. « Interleukin-1 β Induces a Reversible Cardiomyopathy in the Mouse ». *Inflammation Research* 62 (7): 637-40. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0625-0>.
- Van Tassell, Benjamin Wallace, Ross Arena, Giuseppe Biondi-Zoccai, Justin McNair Canada, Claudia Oddi, Nayef Antar Abouzaki, Arehzo Jahangiri, et al. 2014. « Effects of Interleukin-1 Blockade With Anakinra on Aerobic Exercise Capacity in Patients With Heart Failure and Preserved

- Ejection Fraction (from the D-HART Pilot Study) ». *The American Journal of Cardiology* 113 (2): 321-27. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2013.08.047>.
- Varjosalo, Markku, et Jussi Taipale. 2008. « Hedgehog: Functions and Mechanisms ». *Genes & Development* 22 (18): 2454-72. <https://doi.org/10.1101/gad.1693608>.
- Vazquez-Liebanas, Elisa, Khayrun Nahar, Giacomo Bertuzzi, Annika Keller, Christer Betsholtz, et Maarja Andaloussi Mäe. 2022. « Adult-Induced Genetic Ablation Distinguishes PDGFB Roles in Blood-Brain Barrier Maintenance and Development ». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 42 (2): 264-79. <https://doi.org/10.1177/0271678X211056395>.
- Velden, Jolanda van der. 2011. « Diastolic Myofilament Dysfunction in the Failing Human Heart ». *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 462 (1): 155-63. <https://doi.org/10.1007/s00424-011-0960-3>.
- Vignon, P. 2007. « Évaluation des pressions de remplissage ventriculaire gauche par échocardiographie-doppler ». *Réanimation* 16 (2): 139-48. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2007.02.005>.
- Wang, Jinhu, Jingli Cao, Amy L. Dickson, et Kenneth D. Poss. 2015. « Epicardial Regeneration Is Guided by Cardiac Outflow Tract and Hedgehog Signalling ». *Nature* 522 (7555): 226-30. <https://doi.org/10.1038/nature14325>.
- Wang, Yue, Shijie Jin, Yoshifumi Sonobe, Yi Cheng, Hiroshi Horiuchi, Bijay Parajuli, Jun Kawanokuchi, Tetsuya Mizuno, Hideyuki Takeuchi, et Akio Suzumura. 2014. « Interleukin-1 β Induces Blood–Brain Barrier Disruption by Downregulating Sonic Hedgehog in Astrocytes ». Édité par Jun-ichi Kira. *PLoS ONE* 9 (10): e110024. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110024>.
- Washington Smoak, I., N.A. Byrd, R. Abu-Issa, M.M. Goddeeris, R. Anderson, J. Morris, K. Yamamura, J. Klingensmith, et E.N. Meyers. 2005. « Sonic Hedgehog Is Required for Cardiac Outflow Tract and Neural Crest Cell Development ». *Developmental Biology* 283 (2): 357-72. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.04.029>.
- Wei, Hong, Djahida Bedja, Norimichi Koitabashi, Dongmei Xing, Jasper Chen, Karen Fox-Talbot, Rosanne Rouf, et al. 2012. « Endothelial expression of hypoxia-inducible factor 1 protects the murine heart and aorta from pressure overload by suppression of TGF- β signaling ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (14): E841-50. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202081109>.
- Westermann, Dirk, Diana Lindner, Mario Kasner, Christine Zietsch, K. Savvatis, F. Escher, J. von Schlippenbach, 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): 44-52. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.931451>.
- Widyantoro, Bambang, Noriaki Emoto, Kazuhiko Nakayama, Dyah W. Anggrahini, Suko Adiarto, Naoko Iwasa, Keiko Yagi, et al. 2010. « Endothelial Cell–Derived Endothelin-1 Promotes Cardiac Fibrosis in Diabetic Hearts Through Stimulation of Endothelial-to-Mesenchymal Transition ». *Circulation* 121 (22): 2407-18. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.938217>.
- Wilson, Richard M., Deepa S. De Silva, Kaori Sato, Yasuhiro Izumiya, et Flora Sam. 2009. « Effects of Fixed-Dose Isosorbide Dinitrate/Hydralazine on Diastolic Function and Exercise Capacity in Hypertension-Induced Diastolic Heart Failure ». *Hypertension* 54 (3): 583-90. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.134932>.
- Winkler, Ethan A., Jesse D. Sengillo, John S. Sullivan, Jenny S. Henkel, Stanley H. Appel, et Berislav V. Zlokovic. 2013. « Blood-Spinal Cord Barrier Breakdown and Pericyte Reductions in Amyotrophic Lateral Sclerosis ». *Acta Neuropathologica* 125 (1): 111-20. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1039-8>.
- Withaar, Coenraad, Carolyn S P Lam, Gabriele G Schiattarella, Rudolf A de Boer, et Laura M G Meems. 2021. « Heart Failure with Preserved Ejection Fraction in Humans and Mice: Embracing Clinical Complexity in Mouse Models ». *European Heart Journal* 42 (43): 4420-30. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab389>.

- Withaar, Coenraad, Laura M G Meems, George Markousis-Mavrogenis, Cornelis J Boogerd, Herman H W Silljé, Elisabeth M Schouten, Martin M Dokter, et al. 2021. « The Effects of Liraglutide and Dapagliflozin on Cardiac Function and Structure in a Multi-Hit Mouse Model of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction ». *Cardiovascular Research* 117 (9): 2108-24. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa256>.
- Wu, Jian, Fangjie Dai, Chang Li, et Yunzeng Zou. 2020. « Gender Differences in Cardiac Hypertrophy ». *Journal of Cardiovascular Translational Research* 13 (1): 73-84. <https://doi.org/10.1007/s12265-019-09907-z>.
- Xia, Meng, Xueying Yang, et Cheng Qian. 2021. « Meta-Analysis Evaluating the Utility of Colchicine in Secondary Prevention of Coronary Artery Disease ». *The American Journal of Cardiology* 140 (février): 33-38. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2020.10.043>.
- Xia, Yuan-peng, Quan-wei He, Ya-nan Li, Sheng-cai Chen, Ming Huang, Yong Wang, Yuan Gao, et al. 2013. « Recombinant Human Sonic Hedgehog Protein Regulates the Expression of ZO-1 and Occludin by Activating Angiopoietin-1 in Stroke Damage ». Édité par Renping Zhou. *PLoS ONE* 8 (7): e68891. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068891>.
- Xiao, Qing, Ning Hou, Yan-Ping Wang, Li-Shan He, Yan-Hua He, Gui-Ping Zhang, Quan Yi, Shi-Ming Liu, Min-Sheng Chen, et Jian-Dong Luo. 2012. « Impaired Sonic Hedgehog Pathway Contributes to Cardiac Dysfunction in Type 1 Diabetic Mice with Myocardial Infarction ». *Cardiovascular Research* 95 (4): 507-16. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs216>.
- Xu, Y. 2003. « Estrogen Modulation of Left Ventricular Remodeling in the Aged Heart ». *Cardiovascular Research* 57 (2): 388-94. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00705-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00705-8).
- Xu, Zhiyan, Tao Wang, Xiaoxiao Guo, Yao Li, Yi Hu, Chao Ma, et Jing Wang. 2018. « The Relationship of Serum Antigen-Specific and Total Immunoglobulin E with Adult Cardiovascular Diseases ». *Int. J. Med. Sci.* 15: 7.
- Xue, Mei, Ting Li, Yue Wang, Yunpeng Chang, Ying Cheng, Yunhong Lu, Xiangyang Liu, et al. 2019. « Empagliflozin Prevents Cardiomyopathy via SGC-CGMP-PKG Pathway in Type 2 Diabetes Mice ». *Clinical Science* 133 (15): 1705-20. <https://doi.org/10.1042/CS20190585>.
- Yang, Jeong Hoon, Masaru Obokata, Yogesh N.V. Reddy, Margaret M. Redfield, Amir Lerman, et Barry A. Borlaug. 2020. « Endothelium-dependent and Independent Coronary Microvascular Dysfunction in Patients with Heart Failure with Preserved Ejection Fraction ». *European Journal of Heart Failure* 22 (3): 432-41. <https://doi.org/10.1002/ejhf.1671>.
- Yang, Yu, Qi Li, Zhaoxia Deng, Zhiyuan Zhang, Jiancheng Xu, Guisheng Qian, et Guansong Wang. 2011. « Protection from Lipopolysaccharide-Induced Pulmonary Microvascular Endothelial Cell Injury by Activation of Hedgehog Signaling Pathway ». *Molecular Biology Reports* 38 (6): 3615-22. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0473-8>.
- Ylikorkala, O, A Orpana, J Puolakka, T Pyörälä, et L Viinikka. 1995. « Postmenopausal Hormonal Replacement Decreases Plasma Levels of Endothelin-1. » *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 80 (11): 3384-87. <https://doi.org/10.1210/jcem.80.11.7593457>.
- Zakeri, Rosita, Gilles Moulay, Qiang Chai, Ozgur Ogut, Saad Hussain, Hiroyuki Takahama, Tong Lu, et al. 2016. « Left Atrial Remodeling and Atrioventricular Coupling in a Canine Model of Early Heart Failure With Preserved Ejection Fraction ». *Circulation: Heart Failure* 9 (10). <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.003238>.
- Zannad, Faiez, João Pedro Ferreira, Stuart J Pocock, Stefan D Anker, Javed Butler, Gerasimos Filippatos, Martina Brueckmann, et al. 2020. « SGLT2 Inhibitors in Patients with Heart Failure with Reduced Ejection Fraction: A Meta-Analysis of the EMPEROR-Reduced and DAPA-HF Trials ». *The Lancet* 396 (10254): 819-29. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31824-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31824-9).
- Zeng, Heng, Xiaochen He, et Jian-Xiong Chen. 2020. « A Sex-Specific Role of Endothelial Sirtuin 3 on Blood Pressure and Diastolic Dysfunction in Female Mice ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (24): 9744. <https://doi.org/10.3390/ijms21249744>.
- Zeng, Heng, Venkata Ramana Vaka, Xiaochen He, George W. Booz, et Jian-Xiong Chen. 2015a. « High-fat Diet Induces Cardiac Remodelling and Dysfunction: Assessment of the Role Played by SIRT

- 3 Loss ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 19 (8): 1847-56.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.12556>.
- Zeng, Heng, Venkata Ramana Vaka, Xiaochen He, George W Booz, et Jian-Xiong Chen. 2015b. « High-fat diet induces cardiac remodelling and dysfunction: assessment of the role played by SIRT3 loss ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 19 (8): 1847-56.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.12556>.
- Zhang, Liyun, Juan Chen, Lianhua Yan, Qin He, Han Xie, et Manhua Chen. 2021. « Resveratrol Ameliorates Cardiac Remodeling in a Murine Model of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction ». *Frontiers in Pharmacology* 12 (juin): 646240.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.646240>.
- Zhang, Nannan, Bin Feng, Xuexing Ma, Kangyun Sun, Guidong Xu, et Yafeng Zhou. 2019. « Dapagliflozin Improves Left Ventricular Remodeling and Aorta Sympathetic Tone in a Pig Model of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction ». *Cardiovascular Diabetology* 18 (1): 107. <https://doi.org/10.1186/s12933-019-0914-1>.
- Zhang, Ning, Qunchao Ma, Yayu You, Xiangyang Xia, Cuiping Xie, Yuxue Huang, Zhuo Wang, Feiming Ye, Zhaosheng Yu, et Xiaojie Xie. 2022. « CXCR4-Dependent Macrophage-to-Fibroblast Signaling Contributes to Cardiac Diastolic Dysfunction in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction ». *International Journal of Biological Sciences* 18 (3): 1271-87.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.65802>.
- Zhang, X. M., M. Ramalho-Santos, et A. P. McMahon. 2001. « Smoothed Mutants Reveal Redundant Roles for Shh and Ihh Signaling Including Regulation of L/R Asymmetry by the Mouse Node ». *Cell* 105 (6): 781-92.
- Zhang, Xiaowei, Tiankai Li, Heng-Jie Cheng, Hao Wang, Carlos M Ferrario, Leanne Groban, et Che Ping Cheng. 2021. « Chronic GPR30 Agonist Therapy Causes Regression in a Male Mouse Model of Progressive Heart Failure: Insights into Cellular Mechanisms », 20.
- Zhang, Xin-Lin, Ting-Yu Wang, Zheng Chen, Hong-Wei Wang, Yong Yin, Lian Wang, Yong Wang, Biao Xu, et Wei Xu. 2022. « HMGB1-Promoted Neutrophil Extracellular Traps Contribute to Cardiac Diastolic Dysfunction in Mice ». *Journal of the American Heart Association* 11 (4): e023800. <https://doi.org/10.1161/JAHA.121.023800>.
- Zhang, Yan, Feng Gao, Yuan Tang, Jinwen Xiao, Chuanchuan Li, Yu Ouyang, et Yuemei Hou. s. d. « Ang II-Induced Pericyte-Myofibroblast », 14.
- Zhao, You-yang, Douglas R. Sawyer, Ragavendra R. Baliga, Douglas J. Opel, Xinqiang Han, Mark A. Marchionni, et Ralph A. Kelly. 1998. « Neuregulins Promote Survival and Growth of Cardiac Myocytes ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (17): 10261-69.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.17.10261>.
- Zhou, Yuying, Yunlong Zhu, et Jianping Zeng. 2021. « Research Update on the Pathophysiological Mechanisms of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction ». *Current Molecular Medicine*, novembre. <https://doi.org/10.2174/1566524021666211129111202>.
- Ziolo, Mark T., Mark J. Kohr, et Honglan Wang. 2008. « Nitric Oxide Signaling and the Regulation of Myocardial Function ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 45 (5): 625-32.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.07.015>.
- Zymek, Pawel, Marcin Bujak, Khaled Chatila, Anna Cieslak, Geeta Thakker, Mark L. Entman, et Nikolaos G. Frangogiannis. 2006. « The Role of Platelet-Derived Growth Factor Signaling in Healing Myocardial Infarcts ». *Journal of the American College of Cardiology* 48 (11): 2315-23. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.07.060>.

Publications, présentations orales et posters

A. Publications

Cornuault L, Mora P, Rouault P, Foussard N, Chapouly C, Alzieu P, Gadeau AP, Couffinhal T, and Renault MA. « Increased endothelium activation and leakage do not promote diastolic dysfunction in the mouse model of HFpEF triggered by a high fat diet + L-NAME combination treatment ». En cours de soumission.

Cornuault, Lauriane, François-Xavier Hérion, Paul Rouault, Ninon Foussard, Philippe Alzieu, Candice Chapouly, Alain-Pierre Gadeau, Thierry Couffinhal, et Marie-Ange Renault. 2022. « Cardiac Pericytes Are Necessary for Coronary Vasculature Integrity and Cardiomyocyte Differentiation ». Preprint. Physiology. <https://doi.org/10.1101/2022.08.29.505703>.

Cornuault, Lauriane, Paul Rouault, Cécile Duplâa, Thierry Couffinhal, et Marie-Ange Renault. 2022. « Endothelial Dysfunction in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: What are the Experimental Proofs? » Frontiers in Physiology 13 (juillet): 906272. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.906272>.

Guimbal, Sarah, **Lauriane Cornuault**, Paul Rouault, Pierre-Louis Hollier, Candice Chapouly, Marie-Lise Bats, Julien Imbault, Alain-Pierre Gadeau, Thierry Couffinhal, et Marie-Ange Renault. 2021. « Mast Cells Are the Trigger of Small Vessel Disease and Diastolic Dysfunction in Diabetic Obese Mice ». Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 41 (4). <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.121.315900>.

Hollier, Pierre-Louis, Candice Chapouly, Aissata Diop, Sarah Guimbal, **Lauriane Cornuault**, Alain-Pierre Gadeau, et Marie-Ange Renault. 2021. « Full-Length Dhh and N-Terminal Shh Act as Competitive Antagonists to Regulate Angiogenesis and Vascular Permeability ». Cardiovascular Research 117 (12): 2489-2501. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa285>.

Mora, Pierre, Pierre-Louis Hollier, Sarah Guimbal, Alice Abelanet, Aïssata Diop, **Lauriane Cornuault**, Thierry Couffinhal, et al. 2020. « Blood–Brain Barrier Genetic Disruption Leads to Protective Barrier Formation at the Glia Limitans ». Édité par Richard Daneman. PLOS Biology 18 (11): e3000946. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000946>.

Chapouly, Candice, Pierre-Louis Hollier, Sarah Guimbal, **Lauriane Cornuault**, Alain-Pierre Gadeau, et Marie-Ange Renault. 2020. « Desert Hedgehog-Driven Endothelium Integrity Is Enhanced by Gas1 (Growth Arrest-Specific 1) but Negatively Regulated by Cdon (Cell Adhesion Molecule-Related/Downregulated by Oncogenes) ». Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 40 (12). <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314441>.

B. Présentations orales

Cornuault L. Dysfonction endothéliale et ICfEp. Masterclass HTA, 2022, Paris, Communication orale.

Cornuault L. Role of cardiac pericytes. Webinar SFA, 2022, en ligne, Communication orale.

Cornuault L, Hérion FX, Rouault P, Mora P, Chapouly C, Gadeau AP, Couffinhal T and Renault MA. Endothelial protection does not prevent diastolic dysfunction in high fat diet + L-NAME treated mice. Printemps de la Cardiologie, 2022, Tours, Communication orale, Young Investigators Award.

Cornuault L. Diastolic dysfunction in high fat diet + L-NAME treated mice is associated with endothelial dysfunction. Journée de l'École Doctorale de Bordeaux, 2021, congrès en ligne, Communication orale.

Cornuault L, Guimbal S, Hollier PL, Chapouly C, Gadeau AP, Couffinhal T and Renault MA. Pericyte coverage of cardiac capillaries is decreased in diabetic obese mice. Printemps de la Cardiologie, 2020, congrès en ligne, Communication orale et poster.

C. Posters

Cornuault L, Hérion FX, Rouault P, Mora P, Chapouly C, Gadeau AP, Couffinhal T and Renault MA. Endothelial protection does not prevent diastolic dysfunction in high fat diet + L-NAME treated mice. Congrès de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose, 2022, Biarritz, Présentation poster.

Cornuault L, Hérion FX, Rouault P, Mora P, Chapouly C, Gadeau AP, Couffinhal T and Renault MA. Endothelial protection does not prevent diastolic dysfunction in high fat diet + L-NAME treated mice. Journée du département Sciences Biologiques et Médicales, 2021, Bordeaux, Présentation poster.

Cornuault L, Hérion FX, Rouault P, Mora P, Chapouly C, Gadeau AP, Couffinhal T and Renault MA. Partial cardiac pericyte depletion induces heart failure. Printemps de la Cardiologie, 2021, congrès en Ligne, Présentation poster.

Cornuault L, Hérion FX, Rouault P, Mora P, Chapouly C, Gadeau AP, Couffinhal T and Renault MA. Diastolic dysfunction in high fat diet + L-NAME treated mice is associated with endothelial dysfunction. Printemps de la Cardiologie, 2021, congrès en Ligne, Présentation poster.

Cornuault L, Hérion FX, Rouault P, Mora P, Chapouly C, Gadeau AP, Couffinhal T and Renault MA. Partial cardiac pericyte depletion induces heart failure. Congrès de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose, 2021, congrès en Ligne, Présentation poster.

Cornuault L, Hérion FX, Rouault P, Mora P, Chapouly C, Gadeau AP, Couffinhal T and Renault MA. Diastolic dysfunction in high fat diet + L-NAME treated mice is associated with endothelial dysfunction. Congrès de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose, 2021, congrès en Ligne, Présentation poster.

Cornuault L, Guimbal S, Hollier PL, Chapouly C, Gadeau AP, Couffinhal T and Renault MA. Pericyte coverage of cardiac capillaries is decreased in diabetic obese mice. Journée du département Sciences Biologiques et Médicales, 2020, congrès en ligne, Présentation poster.

Role of pericytes and endothelial cells in heart failure

Abstract

Heart failure (HF) is a major public health issue affecting between 1 to 2% of the general population. Patients with HF with preserved ejection fraction (HFpEF) represent approximately 50% of patients with HF and are often older, female, and frequently have hypertension. The high prevalence of these comorbidities suggests that they play a role in the development of the disease. There is currently no specific treatment for HFpEF, because its pathophysiology remains poorly understood and requires further investigations in order to find new therapeutic targets. Microvascular dysfunction is currently proposed as compromising the perfusion of the heart and participating in the development of diastolic dysfunction. But the role of endothelial dysfunction in the pathophysiology of HFpEF remains to be clarified.

Our objective was to better understand the role of vascular cells, pericytes and endothelial cells, in the pathophysiology of HFpEF. More specifically, this thesis aimed (1) to measure the impact of pericyte degeneration on cardiac microvascular integrity and cardiac function, (2) to test whether endothelial dysfunction participates in the development of diastolic dysfunction in a mouse model of HFpEF, and (3) to assess the sexual dimorphism associated with ICfEp.

To investigate the role of pericytes in the heart, we have developed a mouse model lacking pericytes, *Pdgfrb-Cre/ERT2*; *Rosa-DTA* mice. We demonstrated that cardiac pericytes are required for cardiac microvascular integrity and cardiac function by regulating cardiomyocyte contractility and relaxation. These results suggest that changes in the pericyte phenotype may participate in the pathophysiology of cardiovascular diseases.

To test the role of endothelial dysfunction in the pathophysiology of HFpEF, we created a mouse model in which diastolic dysfunction is induced by a high-fat diet (HFD) and by L-NAME, a NO synthase inhibitor. Firstly, we characterized the phenotype of the coronary vasculature in this model in males, females and ovariectomized females to highlight a possible sexual dimorphism. We have demonstrated that diastolic dysfunction was associated with endothelial dysfunction only in ovariectomized females. Secondly, we tested the role of endothelial dysfunction in these mice using a mouse model with preserved endothelial function under stress conditions (*Cdon*^{ECKO} mice). This experiment proved that preventing endothelial dysfunction does not prevent diastolic dysfunction induced by an HFD+L-NAME treatment.

All of these results demonstrate that the role of endothelial dysfunction in the development of HFpEF remains to be proved.

Keywords: heart failure, pericytes, endothelial dysfunction

Rôle des péricytes et des cellules endothéliales dans l'insuffisance cardiaque

Résumé

L'insuffisance cardiaque (IC) est un problème de santé publique majeur touchant entre 1 et 2 % de la population générale. Les patients atteints d'IC à fraction d'éjection préservée (ICfEp) représentent environ 50 % des patients ayant une IC et sont souvent plus âgés, de sexe féminin, et présentent fréquemment une hypertension artérielle. La prévalence élevée de ces comorbidités suggère qu'elles jouent un rôle dans le développement de la maladie. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement spécifique de l'ICfEp, car sa physiopathologie reste mal comprise et nécessite d'être approfondie afin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. La dysfonction microvasculaire est actuellement proposée comme compromettant la perfusion du cœur et participant ainsi au développement de la dysfonction diastolique. Mais l'implication de la dysfonction endothéliale dans la physiopathologie de l'ICfEp reste à démontrer.

L'objectif de cette thèse était donc de mieux comprendre le rôle des cellules vasculaires, péricytes et cellules endothéliales, dans la physiopathologie de l'ICfEp. Plus précisément, cette thèse a eu pour but (1) de mesurer l'impact de la dégénérescence des péricytes sur l'intégrité microvasculaire cardiaque et sur la fonction cardiaque, (2) de tester si la dysfonction endothéliale participe au développement de la dysfonction diastolique dans un modèle murin d'ICfEp, et (3) d'évaluer le dimorphisme sexuel associé à l'ICfEp.

Pour étudier le rôle des péricytes sur le cœur, nous avons développé un modèle de souris déficientes en péricytes, les souris *Pdgfrb-Cre/ERT2*; *Rosa-DTA*. Nous avons démontré que les péricytes cardiaques sont nécessaires à l'intégrité microvasculaire cardiaque et à la fonction cardiaque en régulant la contractilité et la relaxation des cardiomyocytes. Ces résultats suggèrent que des modifications du phénotype des péricytes pourraient participer à la physiopathologie de maladies cardiovasculaires. Pour tester le rôle de la dysfonction endothéliale dans la physiopathologie de l'ICfEp, nous avons d'abord mis en place un modèle murin, chez lequel une dysfonction diastolique est induite par un régime riche en lipides (HFD) et par le L-NAME, un inhibiteur de NO synthase. Dans un premier temps, nous avons caractérisé le phénotype de la vasculature coronaire dans ce modèle chez les mâles, les femelles et les femelles ovariectomisées pour mettre en évidence un éventuel dimorphisme sexuel. Nous avons, en effet, mis en évidence que la dysfonction diastolique était associée à une dysfonction endothéliale uniquement chez les femelles ovariectomisées. Dans un second temps, nous avons testé le rôle de la dysfonction endothéliale chez ces souris à l'aide d'un modèle murin présentant une fonction endothéliale préservée dans des conditions de stress (les souris *Cdon*^{ECKO}). Cette expérience nous a révélé que prévenir la dysfonction endothéliale ne permet pas de prévenir la dysfonction diastolique induite par le traitement HFD+L-NAME.

L'ensemble de ces résultats démontrent que le rôle de la dysfonction endothéliale dans le développement de l'ICfEp reste à prouver.

Mots clés : insuffisance cardiaque, péricytes, dysfonction endothéliale