



HAL
open science

Impact du syndrome métabolique sur les réseaux vasculaires et lymphatiques cardiaques

Hélène Chiavelli

► **To cite this version:**

Hélène Chiavelli. Impact du syndrome métabolique sur les réseaux vasculaires et lymphatiques cardiaques. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMR060 . tel-04033744

HAL Id: tel-04033744

<https://theses.hal.science/tel-04033744>

Submitted on 17 Mar 2023

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Impact du syndrome métabolique sur les réseaux vasculaires et lymphatiques cardiaques

Présentée et soutenue par
HELENE CHIAVELLI

Thèse soutenue le 04/07/2022
devant le jury composé de

MME BARBARA GARMY-SUSINI	DIRECTEUR DE RECHERCHE, UNIVERSITE TOULOUSE 3 PAUL SABATIER	Rapporteur du jury
MME MARIE-ANGE RENAULT	CHARGE DE RECHERCHE, UNIVERSITE DE BORDEAUX	Rapporteur du jury
M. GAETAN PREVOST	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., Université de Rouen Normandie	Président du jury
MME EBBA BRAKENHIELM	DIRECTEUR DE RECHERCHE, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par EBBA BRAKENHIELM (ENDOTHELIUM, VALVULOPATHIES ET INSUFFISANCE CARDIAQUE)

Remerciements

Je remercie les Dr Barbara Garmy-Susini et Marie-Ange Renault d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et de me faire l'honneur de rapporter ce travail

Je remercie le Dr Gaëtan Prevost de participer à mon jury et d'examiner mon travail

Merci Ebba Brakenheilm de m'avoir poussé à aller jusqu'au bout de cette thèse, pour ton aide et pour le temps que tu y as passé et que tu m'as consacré. Je te souhaite sincèrement le meilleur et de poursuivre avec autant de brio ta carrière.

Je remercie toute l'équipe et toute les personnes qui ont participées, de près ou de loin, à ce travail et sans qui il n'aurait pas abouti, en particulier Anaïs, Sylvanie, Marianne et Gaëtan. Je vous souhaite à tous le meilleur pour la suite de votre carrière.

Table des matières

Table des matières	1
Table des figures	4
Table des tableaux	6
Résumé	7
Abstract	9
Introduction	11
Physiologie cardiaque	11
Systole ventriculaire	11
Diastole ventriculaire	11
Volumes ventriculaires, fraction d'éjection, débit et index cardiaques	13
Déterminant du débit cardiaque	13
Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée	13
Définition et épidémiologie.....	13
Diagnostic.....	15
Signes cliniques et fonctionnels	16
Signes paracliniques.....	17
Facteurs de risque.....	20
Physiopathologie	23
Inflammation	23
Rigidité myocardique, relaxation ventriculaire et hypertrophie cardiomyocytaire.....	25
Altérations cardio-métaboliques	27
Anomalies micro-circulatoires et réserve coronaire.....	28
Pronostic et mortalité	29
Prise en charge	32
Modèles animaux	33

Le système lymphatique.....	37
Organisation et développement.....	37
Fonctions.....	39
Remodelage lymphatique et lymphangiogenèse.....	40
Système lymphatique cardiaque.....	42
Les lymphatiques en pathologie cardiaque.....	43
Lymphatiques et Sd Met.....	44
Objectif de la thèse.....	47
Matériel et méthodes.....	48
Modèles animaux.....	48
Paramètres étudiés.....	48
Paramètres métaboliques.....	48
Composition corporelle.....	48
Dosages plasmatiques.....	48
Test de tolérance au glucose et test de résistance à l'insuline.....	48
Paramètres morphométries.....	49
Paramètres cardiaques et vasculaires.....	49
Test de tolérance à l'effort.....	49
Echographie.....	49
IRM.....	50
Hémodynamique ventriculaire.....	50
Fonction coronaire.....	50
Etude de la perméabilité vasculaire.....	51
Analyses histologiques.....	52
Cytométrie en flux.....	55
Evaluation de l'expression génique.....	58
Analyses statistiques.....	60

Résultats	62
Confirmation de l'existence d'un Sd Met chez les rats ZF mâles et femelles	62
Les rats ZF présentent une dysfonction diastolique associée à une hypertrophie cardiaque, sans altération de la fonction systolique.....	66
La dysfonction diastolique chez les rats ZF est différemment associée, selon le sexe et le statut hormonal chez les femelles, à des altérations de la fonction endothéliale coronaire et de la microcirculation sanguine et à une diminution de la réserve coronaire	72
La densité lymphatique cardiaque est diminuée chez les femelles ZF, sans association avec un œdème myocardique	74
Les femelles ZF présentent une inflammation tissulaire cardiaque, non retrouvée chez les mâles.....	77
Fibrose myocardique	80
Résumé des principaux résultats obtenus chez les rats mâles ZF, chez les femelles ZF non-ovx et ovx ainsi que chez les femelles <i>Lean ovx</i>	81
Discussion	82
Développement comparable d'un Sd Met chez les rats ZF mâles et femelles.....	82
Les rats ZF présentent une dysfonction diastolique associée à une hypertrophie cardiaque, sans altération de la fonction systolique.....	84
Altérations de la fonction endothéliale coronaire vs. raréfaction de la microcirculation sanguine cardiaque chez les rats ZF.	85
Altération des lymphatiques cardiaque vs. œdème cardiaque chez les rats ZF.	86
L'inflammation cardiaque chez le rat ZF	89
Fibrose.....	90
Conclusion et perspective.....	92
Références	93
Annexes.....	109
Annexe 1 : Article en cours de soumission	109
Annexe 2 : Article en cours de soumission, <i>supplemental data</i>	150

Table des figures

Figure 1 : Courbes de pression de l'oreillette, du ventricule gauche et de l'aorte au cours d'un cycle cardiaque.....	12
Figure 2 : Synthèse du cycle cardiaque avec le détail de ses différentes phases	12
Figure 3 : Prévalence de l'insuffisance cardiaque aux USA chez les adultes ≥ 20 ans selon le sexe et l'âge (NHANES: 2013-2016)	15
Figure 4 : Algorithme diagnostique pour le diagnostic de l'IC chronique.....	16
Figure 5 : Caractéristiques du Doppler pulsé et du Doppler tissulaire de l'annulaire mitral aux différents stades de la dysfonction diastolique.....	19
Figure 6 : Prévalence de l'ICFEP et de l'ICFER selon l'âge et le sexe.....	21
Figure 7 : Comparaison de caractéristiques des patients avec une ICFEP et avec une ICFER	21
Figure 8 : Modèle physiopathologique de l'ICFEP	24
Figure 9 : Fonction diastolique du VG chez des sujets sains et porteurs d'une ICFEP	25
Figure 10 : Schéma des principaux mécanismes physiopathologiques en jeu dans le développement de l'ICFEP.	29
Figure 11 : Nombre d'hospitalisation pour IC par sexe, aux USA, entre 1997 et 2016.	30
Figure 12 : Revue systématique de la proportion de mortalité CV et non-CV chez les patients avec ICFEP.....	31
Figure 13 : Récapitulatif de essais cliniques de phase II et III réalisés chez des patients atteints d'ICFEP.....	33
Figure 14 : Caractéristiques structurelles et moléculaires des vaisseaux lymphatiques	38
Figure 15 : Illustration schématique du système VEGF-VEGFR.....	41
Figure 16 : Principe physiologique du myographe de Mulvany	51
Figure 17 : Méthode d'analyse de la fibrose myocardique et péri-vasculaire à partir de lames colorées au rouge Sirius.	53
Figure 18 : Évaluation par cytométrie en flux de l'inflammation cardiaque.....	58
Figure 19 : Comparaison des paramètres morphométriques chez les rats mâles et femelles...	63
Figure 20 : Test de tolérance au glucose	65
Figure 21 : Présence d'une hypertension artérielle chez les rats ZF.....	65
Figure 22 : Confirmation de l'existence d'une hypertrophie cardiaque chez les rats ZF mâles et femelles..	69
Figure 23 : Analyses hémodynamiques.	71
Figure 24 : Analyse de la perfusion myocardique et de la réserve coronaire par IRM.....	72

Figure 25 : Réactivité endothéliale vasculaire coronaire à l'acétylcholine (ACh) analysée ex vivo.....	73
Figure 26 : Densité capillaire myocardique.	74
Figure 27 : Remodelage lymphatique, perméabilité vasculaire et œdème.....	76
Figure 28 : Exemple d'altérations histologiques du parenchyme rénal chez les rats ZF comparé aux Lean.	77
Figure 29 : Etude de l'inflammation tissulaire cardiaque.	79
Figure 30 : Expression cardiaque de gènes impliqués dans l'inflammation	80

Table des tableaux

Tableau 1 : Définitions du Sd Met	22
Tableau 2 : Récapitulatif des différents modèles murin d'ICFEP et leurs caractéristiques.	36
Tableau 3 : Liste des anticorps primaires utilisés pour les analyses en immunohistochimie ..	55
Tableau 4 : Liste des anticorps secondaires et fluorochromes utilisés pour les analyses en immunohistochimie.....	55
Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés dans 2 panels distincts permettant d'étudier la population lymphocytaire (panel 1) et la population monocyttaire (panel 2)	57
Tableau 6 : Liste des amorces RT-PCR utilisées pour les analyses d'expression génique cardiaque	60
Tableau 7 : Paramètres biologiques plasmatiques chez les rats âgés de 24 S.....	64
Tableau 8 : Données des échographies cardiaques réalisées à 24 S.....	67
Tableau 9 : Résumé des principales altérations métaboliques et cardiaques chez les rats mâles ZF, femelles ZF non-ovx et femelles ovx ZF et Lean.....	81

Résumé

Le syndrome métabolique (Sd Met), ainsi que le sexe féminin et l'âge avancé, sont des facteurs de risque majeurs de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (ICFEP). Le manque actuel de stratégies thérapeutiques pour réduire la morbi-mortalité de l'ICFEP souligne la nécessité d'une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de la dysfonction diastolique cardiaque. Des études récentes ont révélé que le Sd Met entraîne un dysfonctionnement lymphatique systémique chez la souris et l'homme. Cependant, l'impact potentiel du Sd Met sur les lymphatiques cardiaques n'a jamais été étudié.

Nous avons émis l'hypothèse qu'une dysfonction ou un remodelage lymphatique au niveau cardiaque pourrait contribuer à aggraver l'inflammation et la dysfonction cardiaque lors du Sd Met et contribuer au développement d'ICFEP.

Après avoir validé nos modèles mâles et femelles de Sd Met et confirmé l'existence d'une dysfonction diastolique chez les rats ZF, nous avons, pendant mes travaux de thèse, tenté de déterminer les mécanismes sous-jacents à cette dysfonction cardiaque en évaluant par IRM la perfusion myocardique et la réserve coronaire. Une diminution de la réserve coronaire a été décrite chez les patients atteints d'ICFEP, pouvant refléter une raréfaction micro-vasculaire. Ainsi, nous avons ensuite évalué la densité des vaisseaux sanguins myocardiques par des techniques d'immunohistochimie. De plus, étant donné que l'hypertension décrite chez les rats ZF augmente les fuites vasculaires, nous avons également étudié la perméabilité vasculaire. Afin de vérifier si l'hypertrophie cardiaque induite par le Sd Met chez les rats ZF induit également un remodelage des vaisseaux lymphatiques cardiaques nous avons évalué, toujours par immunohistochimie, la densité en lymphatiques au sein du myocarde et étudié l'aspect de ces lymphatiques. L'une des fonctions principales des vaisseaux lymphatiques cardiaques étant de maintenir l'homéostasie tissulaire, nous avons examiné si l'hypertrophie cardiaque s'accompagnait d'un œdème tissulaire myocardique.

Le Sd Met entraîne un état pro-inflammatoire chronique systémique mais également tissulaire, nous avons évalué si la dysfonction diastolique s'accompagnait d'une inflammation cardiaque. Enfin, parmi les principaux mécanismes physiopathologiques de l'ICFEP figure la rigidité myocardique induite par l'installation d'une fibrose tissulaire. Nous avons donc évalué la fibrose cardiaque interstitielle et périvasculaire ainsi que l'expression cardiaque des gènes associés à la fibrose.

Ce travail a permis de démontrer que tandis que le Sd Met, l'hypertrophie cardiaque et la dysfonction diastolique sont comparables entre les rats mâles et femelles ZF, seules les femelles ZF présentent une raréfaction microvasculaire sanguine et lymphatique cardiaque, accentuée par l'ovariectomie, et qui contribue à l'inflammation cardiaque et probablement à l'installation d'une fibrose et à la perte de compliance du VG.

Abstract

Metabolic syndrome, along with female gender and advanced age, are major risk factors for heart failure with preserved ejection fraction (HFPEF). The current lack of therapeutic strategies to reduce the morbidity and mortality of HFPEF highlights the need for a better understanding of the pathophysiological mechanisms of cardiac diastolic dysfunction. Recent studies have revealed that metabolic syndrome causes systemic lymphatic dysfunction in mice and humans. However, the potential impact of metabolic syndrome on cardiac lymphatics has never been studied.

We hypothesized that cardiac lymphatic dysfunction or remodeling may contribute to worsening cardiac inflammation and dysfunction during metabolic syndrome and contribute to the development of HFPEF.

After having validated our male and female models of metabolic syndrome and confirmed the existence of a diastolic dysfunction in ZF rats, we have, during my thesis work, attempted to determine the mechanisms underlying this cardiac dysfunction by evaluating by MRI of myocardial perfusion and coronary reserve. A decrease in coronary reserve has been described in patients with HFPEF, which may lead to microvascular rarefaction. Thus, we then assessed the density of myocardial blood vessels by immunohistochemistry techniques. Additionally, since the hypertension described in ZF rats increases vascular leakage, we also investigated vascular permeability. In order to verify whether the cardiac hypertrophy induced by metabolic syndrome in ZF rats also induces a remodeling of the cardiac lymphatic vessels, we evaluated, still by immunohistochemistry, the density of lymphatics within the myocardium and reflected the appearance of these lymphatics. Since one of the main functions of cardiac lymphatic vessels is to maintain tissue homeostasis, we investigated whether cardiac hypertrophy is accompanied by myocardial tissue edema.

Metabolic syndrome leads to a chronic systemic but also tissue pro-inflammatory state, we assessed whether diastolic dysfunction is accompanied by cardiac inflammation.

Finally, because the main physiopathological mechanisms of HFPEF is the myocardial rigidity induced by the installation of tissue fibrosis, we therefore assessed interstitial and perivascular cardiac fibrosis as well as cardiac expression of genes associated with fibrosis.

This work demonstrated that while metabolic syndrome, cardiac hypertrophy and diastolic dysfunction are comparable between male and female ZF rats, only ZF females show microvascular blood and cardiac lymphatic rarefaction, accentuated by ovariectomy, and which

contributes to cardiac inflammation and probably to the onset of fibrosis and loss of LV compliance.

Introduction

Physiologie cardiaque

L'activité électrique périodique cardiaque engendre l'activité mécanique du cœur. La succession d'une systole et d'une diastole ventriculaires constitue un cycle cardiaque. La diastole comme la systole sont des phénomènes actifs et consomment de l'énergie.

Systole ventriculaire

La systole ventriculaire correspond à la contraction des deux ventricules, qui s'effectue de façon synchrone. Elle débute au moment de la fermeture des valves auriculo-ventriculaires (mitrale et tricuspide), suivie de l'ouverture des valves aortiques et pulmonaires. Pendant la systole, les pressions intra-ventriculaires augmentent, permettant l'éjection du sang du ventricule droit vers l'artère pulmonaire et du ventricule gauche (VG) vers l'aorte.

Diastole ventriculaire

La diastole correspond à la phase de dilatation du cœur durant laquelle celui-ci se remplit. Elle est divisée en 4 périodes : la relaxation isovolumique, le remplissage rapide, la diastasis ou remplissage lent et la systole auriculaire (Figure 1 et Figure 2).

La relaxation isovolumique débute à la fin de la systole, lorsque les valves auriculo-ventriculaires et aortique/pulmonaire sont fermées. La pression dans les ventricules diminue alors sans augmentation de leur volume. Les valves auriculo-ventriculaires s'ouvrent ensuite et débute le remplissage rapide des ventricules. La relaxation isovolumique et le remplissage rapide compte pour presque 70% du remplissage des ventricules. Ils correspondent à la première phase de la diastole dite phase de relaxation.

Lorsque la relaxation s'achève, débute la 2nde phase de la diastole qui fait appel aux capacités de distension passive des ventricules, autrement dit, à la compliance des ventricules. Elle comprend le remplissage lent passif des ventricules puis la contraction ou systole auriculaire qui va expulser le volume restant des oreillettes vers les ventricules. La systole auriculaire représente environ 30% du remplissage des ventricules. En cas de trouble de la compliance, la pression ventriculaire va augmenter anormalement et le remplissage des ventricules va alors dépendre essentiellement de la systole auriculaire.

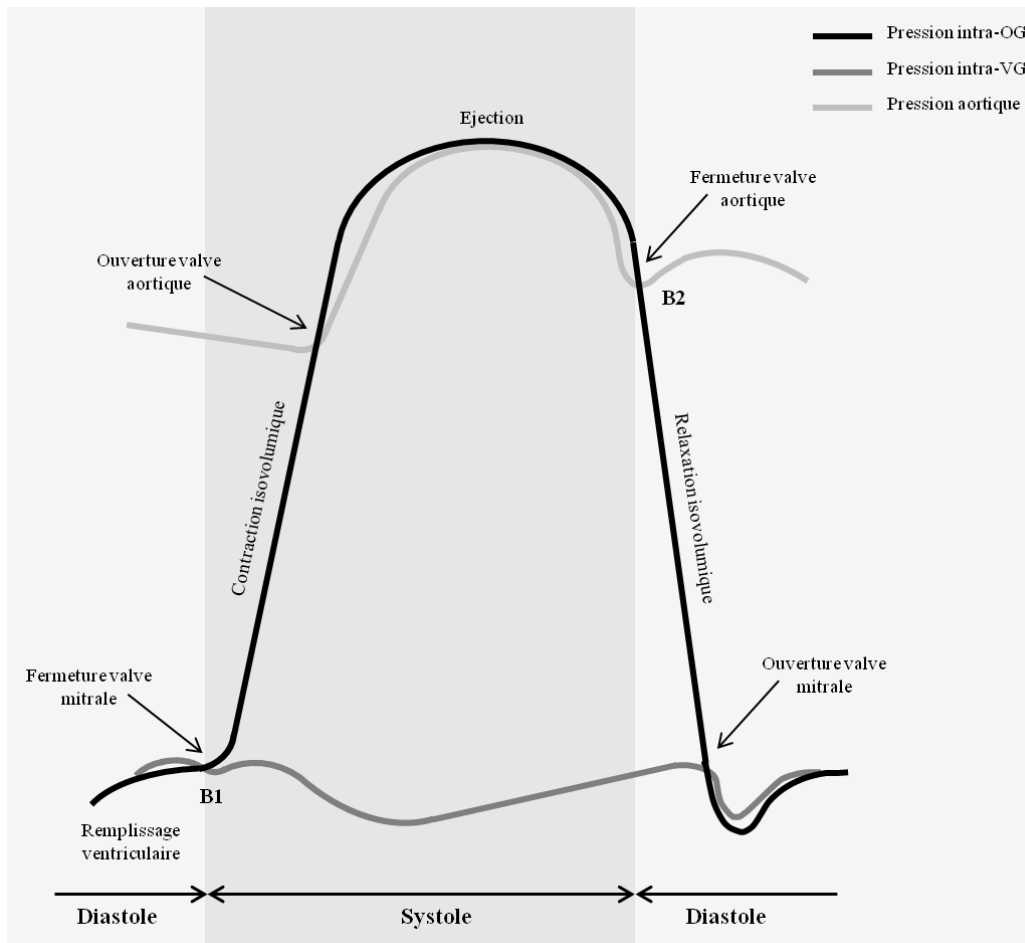


Figure 1 : Courbes de pression de l'oreillette, du ventricule gauche et de l'aorte au cours d'un cycle cardiaque.

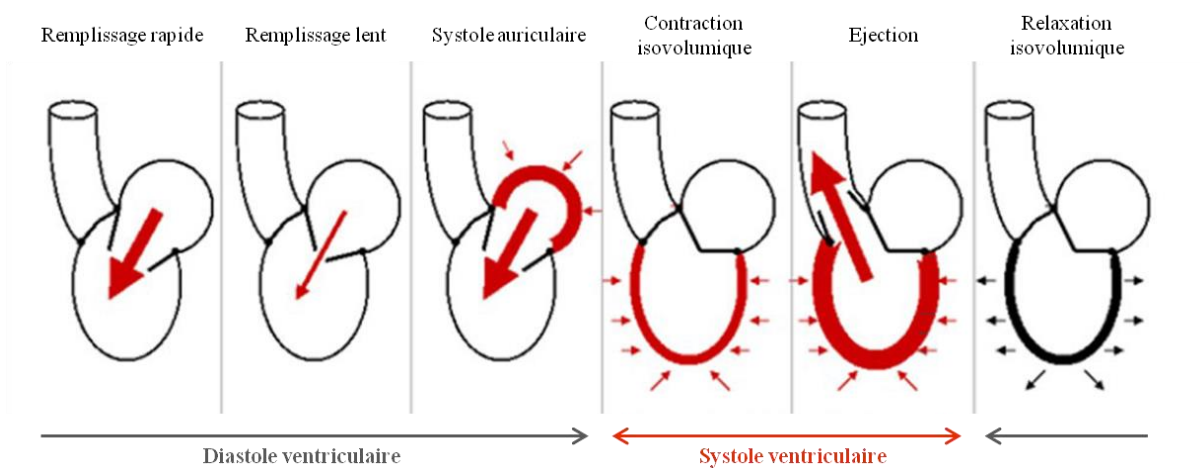


Figure 2 : Synthèse du cycle cardiaque avec le détail de ses différentes phases (d'après le Collège National des Enseignants de Cardiologie et Maladies Vasculaires)

Volumes ventriculaires, fraction d'éjection, débit et index cardiaques

Les ventricules contiennent un volume de sang appelée volume télédiastolique (VTD) en fin de diastole (VTD normal du ventricule gauche = 70 - 100 ml / m² de surface corporelle) et volume télésystolique (VTS) en fin de systole (VTS normal du ventricule gauche = 25 - 35 ml / m² de surface corporelle). La différence entre le VTD et le VTS, appelée volume d'éjection systolique (VES), correspond au volume sanguin éjecté par chaque ventricule à chaque cycle cardiaque (VES normal = 50 - 65 ml / m² au repos). La fraction d'éjection ventriculaire est le rapport entre le VES et le VTD. Sa valeur normale pour le ventricule gauche (FEVG) est > 50%.

Le débit cardiaque correspond à la quantité de sang éjectée par chaque ventricule en une minute. Il est égal au produit du volume éjecté à chaque cycle (VES) par la fréquence cardiaque. Il est exprimé en l / min. L'index cardiaque est égal au quotient du débit cardiaque par la surface corporelle et s'exprime donc en l / min / m² de surface corporelle. Il permet de comparer le débit cardiaque de sujets de taille différente.

Déterminant du débit cardiaque

Les différentes composantes participant à la régulation du débit cardiaque sont i) l'inotropisme, correspondant à la force de contraction myocardique, indépendante des conditions de charge, ii) la pré-charge ventriculaire, correspondant au volume de remplissage télédiastolique du ventricule et iii) la post-charge ventriculaire, correspondant à la force de résistance que rencontrent les fibres myocardiques lors de leur contraction. Selon la loi de Franck-Starling : plus la pré-charge augmente, plus la force de contraction est grande du fait d'une mise en tension plus importante des fibres myocardiques. La pré-charge dépend de la volémie et du tonus veineux.

Inotropisme, pré-charge et post-charge sont les 3 éléments sur lesquels vont agir les grands systèmes de régulation neuro-hormonaux pour adapter le débit cardiaque aux différentes situations physiologiques et pathologiques.

Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

Définition et épidémiologie

Les pathologies cardiovasculaires (CV) incluent les cardiopathies ischémiques, les maladies hypertensives et les cardiopathies hypertrophiques dont les cardiopathies congénitales ou rhumatismales, ainsi que les valvulopathies. La prévalence des maladies cardiovasculaires aux USA, chez les adultes ≥ 20 ans, est de 48,0% et augmente avec l'âge chez les hommes et les femmes. En excluant l'hypertension artérielle (HTA), elle est de 9,0% (24,3 millions en 2016)

(1). Les pathologies CV représentent la principale cause de mortalité dans les pays développés. On estime à 17,5 millions le nombre de décès imputables aux maladies CV dans le monde en 2013, soit 31% de la mortalité totale. Parmi ces décès, on estime que plus de 8 millions sont dus à une cardiopathie ischémique (2,3). La *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) estime que 92,1 millions d'américains de plus de 20 ans, soit 1 sur 3, sont porteurs d'au moins une pathologie CV. Parmi eux, 46,7 millions ont plus de 60 ans. En 2030 on estime que 43,9% de la population américaine sera porteur d'une pathologie CV (4). Sans prise en charge adéquate ces pathologies peuvent évoluer vers une insuffisance cardiaque (IC).

L'IC est un syndrome clinique causé par une anomalie cardiaque structurelle et / ou fonctionnelle, entraînant un débit cardiaque réduit et / ou des pressions intracardiaques élevées au repos ou pendant l'effort.

En Europe et dans les pays développés, la prévalence de l'IC est estimée à 2-3 % de la population adulte. Elle atteint plus de 10 % chez les plus de 70 ans (5). La prévalence et l'incidence de l'IC augmentent avec l'âge (Figure 3). D'après les données de la NHANES, environ 6,5 millions d'Américains âgés de plus de 20 ans souffrent d'IC (1). En Europe, on estime qu'environ 7 millions de personnes souffrent d'IC, équivalent aux populations combinées de Bruxelles, Berlin et Paris.

Les causes d'IC sont multiples (maladie coronarienne, cardiomyopathie hypertensive, cardiopathie valvulaire et congénitale, arythmie, myocardite). La principale cause d'IC dans les pays développés est la cardiopathie ischémique (6–8). Dans environ 30% des cas cependant aucune cause n'est retrouvée (6,8).

Il existe plusieurs types d'IC, selon qu'elle soit aiguë ou chronique, systolique ou diastolique. Historiquement, la terminologie utilisée pour décrire les différents types d'IC est basée sur la mesure de la FEVG. Ainsi, il existe des IC avec une FEVG normale ($\geq 50\%$) dite à fraction d'éjection préservée (ICFEP), anciennement appelé IC diastolique, et des IC avec une FEVG réduite ($< 40\%$), dites à fraction d'éjection réduite (ICFER), anciennement nommée IC systolique. Les patients avec une FEVG entre 40 et 49% appartiennent à une « zone grise » souvent mentionnée sous le terme d'IC à fraction d'éjection moyenne.

L'IC chronique désigne une situation stable dans laquelle le patient peut être asymptomatique ou peut présenter une dyspnée d'effort stable. L'IC aiguë désigne la survenue brutale d'un tableau d'IC ou une situation de décompensation d'IC chronique.

Parmi les patients présentant une IC, la prévalence de l'ICFEP est estimée entre 51% et 63% selon les études (9–11). Bien que la proportion d'ICFEP augmente légèrement depuis plusieurs années, l'incidence globale des IC diminue, probablement en raison de la diminution de la

prévalence des maladies coronariennes, en lien avec l'amélioration de la prévention et de la prise en charge thérapeutique. Cependant, cette baisse est moindre pour l'ICFEP que pour l'ICFER (9,12). En revanche, une analyse récente des hospitalisations pour IC aiguë décompensée menée entre 2005 et 2014 par le biais de l'étude de surveillance ARIC (*Atherosclerosis Risk in Communities*) a montré une augmentation des taux d'hospitalisation pour IC aiguë décompensée, principalement en lien avec une augmentation des taux d'hospitalisation pour ICFEP (13).

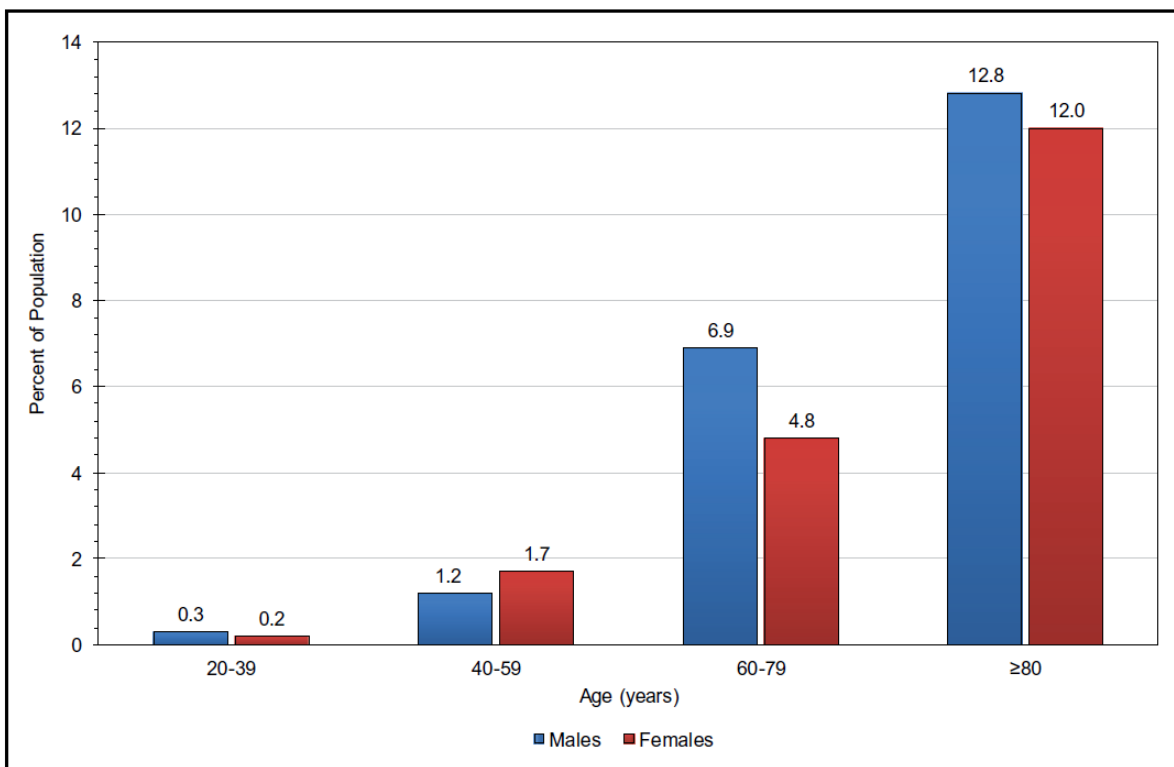


Figure 3 : Prévalence de l'insuffisance cardiaque aux USA chez les adultes ≥ 20 ans selon le sexe et l'âge (NHANES: 2013-2016), d'après Virani et al, *Heart Disease and Stroke Statistics—2020 Update*

Diagnostic

Selon la Société Européenne de Cardiologie (ESC), la présence de symptômes (au repos ou à l'effort) associés à une preuve de dysfonction cardiaque systolique et/ou diastolique (au repos) doivent être réunis pour poser le diagnostic d'IC (5) (Figure 4).

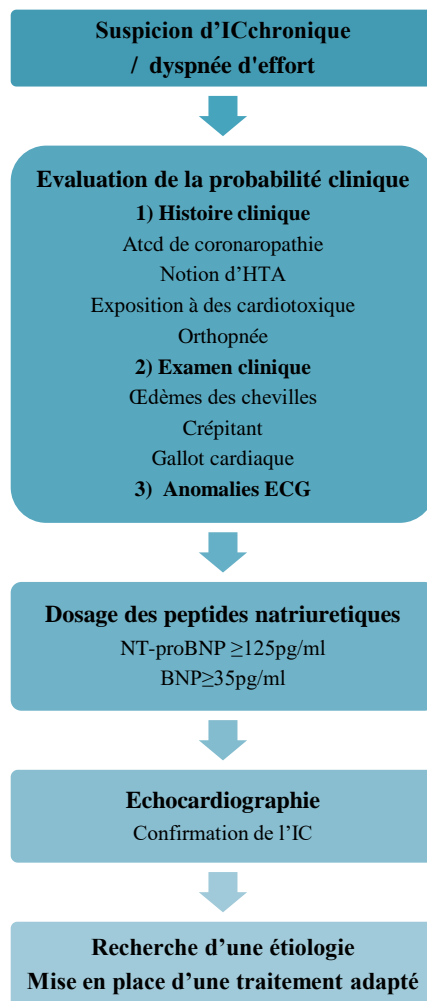


Figure 4 : Algorithme diagnostique pour le diagnostic de l'IC chronique, d'après l'ESC Guideline 2016 (5). IC : insuffisance cardiaque ; HTA : hypertension artérielle ; ECG : électrocardiogramme

Signes cliniques et fonctionnels

L'IC est caractérisé sur le plan clinique par un ensemble de symptômes et signes cliniques. Parmi les signes fonctionnels, la dyspnée est le maître symptôme. Il s'agit le plus souvent d'une dyspnée d'effort d'aggravation progressive. La dyspnée doit être gradée selon la classification de la NYHA (*New York Heart Association*) :

- stade I : dyspnée pour des efforts importants inhabituels ; aucune gêne n'est ressentie dans la vie courante ;
- stade II : dyspnée pour des efforts importants habituels, tels que la marche rapide ou en côte ou la montée des escaliers (> 2 étages) ;
- stade III : dyspnée 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 permanente de repos.

Sur le plan clinique on recherchera également la présence d'une tachycardie, d'un bruit de galop à l'auscultation ou d'œdèmes des membres inférieurs.

Les symptômes et signes de l'IC sont souvent peu spécifiques et un historique clinique détaillé doit toujours être obtenu, l'IC survenant rarement chez un patient sans antécédent médical pertinent.

Signes paracliniques

Une preuve objective d'une anomalie structurelle ou fonctionnelle du cœur au repos doit ensuite être faite. On recherchera ainsi une cardiomégalie à la radiographie du thorax, des modifications à l'électrocardiogramme (trouble de la repolarisation, hypertrophie du VG) et une élévation du taux de peptides natriurétiques sanguin (BNP et NT-proBNP). Leurs valeurs seuil sont les mêmes pour l'ICFER et pour l'ICFEP, mais les valeurs sont en général plus faibles dans l'ICFEP (5). L'échocardiographie permet ensuite de poser le diagnostic d'IC. Elle permet également souvent de poser un diagnostic étiologique et a un intérêt pronostic. Elle fournit des informations immédiates sur les volumes, la fonction ventriculaire systolique et diastolique, l'épaisseur de la paroi, la fonction valvulaire et la présence d'une hypertension artérielle pulmonaire. À l'échocardiographie, une FEVG < 40 % affirme l'ICFER.

Le diagnostic d'ICFEP reste difficile, en particulier chez le patient âgé présentant des comorbidités et aucun signe évident de surcharge volumique. La FEVG est normal et les signes et symptômes de l'IC sont souvent non spécifiques. Pour améliorer la spécificité du diagnostic de l'ICFEP, des mesures objectives du dysfonctionnement cardiaque au repos ou à l'effort doivent être effectuées. Ainsi, le diagnostic d'ICFEP nécessite que l'ensemble des critères suivants soient présents :

- La présence de symptômes et / ou de signes cliniques d'IC
- Une FEVG préservée, $\geq 50\%$
- Un taux plasmatique de peptides natriurétiques augmenté (BNP > 35 pg/ml et / ou NT-proBNP > 125 pg/ml)
- Des preuves objectives de l'existence d'altérations structurelles et / ou fonctionnelles cardiaques.

Les altérations structurelles cardiaques majeures nécessaires au diagnostic d'ICFEP sont un index de volume auriculaire gauche augmenté ($> 34 \text{ ml} / \text{m}^2$) ou un index de masse ventriculaire gauche augmenté ($\geq 115 \text{ g} / \text{m}^2$ pour les hommes et $\geq 95 \text{ g} / \text{m}^2$ pour les femmes). L'ICFEP est également fréquemment associé à une hypertrophie concentrique du VG, caractérisée en

imagerie par un épaissement de la paroi ventriculaire gauche. L'hypertrophie du VG a longtemps été considérée comme une caractéristique majeure de l'ICFEP et la cause principale de la dysfonction diastolique et de l'augmentation des pressions de remplissage. Cependant, il est maintenant reconnu que seul 50% environ des patients atteints d'ICFEP présentent une hypertrophie ventriculaire gauche (14,15).

Les altérations fonctionnelles clés pour le diagnostic d'ICFEP sont une modification du rapport E/A et une augmentation du rapport E/E' moyen ≥ 13 ou une baisse de E' septal et latéral moyen < 9 cm / sec (Figure 5).

En échographie Doppler, l'onde E proto-diastolique (E pour *Early*) représente le flux à travers la valve mitrale pendant le remplissage rapide et passif du VG. L'onde A (pour *Atrial*) représente le flux pendant la phase de systole auriculaire. La vitesse de l'onde E dépend du gradient de pression entre l'oreillette gauche (OG) et le VG juste après l'ouverture de la valve mitrale. Chez l'adulte jeune, le pic de vitesse de l'onde E est en moyenne de 85 cm/s. Il a tendance à diminuer avec l'âge. Le pic de l'onde E est influencé par la pression de l'OG, la relaxation VG et la pression systolique VG (par ordre décroissant).

Le doppler tissulaire de l'anneau mitral permet de mesurer la vitesse de l'onde E' qui représente la vitesse de déplacement de l'anneau mitral pendant le remplissage rapide et reflète l'allongement des fibres myocardiques dans le plan longitudinal. L'onde E' est peu dépendante de la pré-charge, inversement proportionnelle à la constante de relaxation isovolumique *tau* et diminue en cas de trouble de la relaxation. Sa valeur normale est > 15 cm/s sur la partie latérale de l'anneau mitral et > 10 cm/s sur la partie septale de l'anneau mitral. A' représente la vitesse de déplacement de l'anneau mitrale pendant la phase de systole auriculaire.

Le rapport E/E' va permettre d'évaluer la pré-charge. En effet l'onde E dépend à la fois de la pré-charge (gradient de pression OG-VG) et de la relaxation, et l'onde E' dépend uniquement de la relaxation. Mathématiquement leur rapport (pré-charge x relaxation / relaxation) donne une évaluation de la pré-charge. Chez le sujet sain, E/E' est < 8 .

A un stade précoce de la dysfonction diastolique, la compliance du ventricule diminue provoquant une relaxation prolongée et une diminution de la phase de remplissage rapide. La diminution de la phase de remplissage rapide est caractérisée par une diminution de la vitesse de l'onde E. Le temps de décélération de l'onde E (DT) sera quant à lui allongé en raison l'altération de la relaxation. Le cœur compense en augmentant la phase de contraction auriculaire, caractérisée par une augmentation de la vitesse de l'onde A. Au total, le rapport E/A est diminué, $< 0,8$.

A un stade plus avancé, la pression dans l'OG va augmenter pour garantir le remplissage du VG et le maintien de la pré-charge. Cette augmentation de pression permet à la phase de remplissage rapide de revenir à un état quasi normal, provoquant une ré-augmentation de la vitesse de l'onde E et du rapport E/A ($> 0,8$). Le DT diminue jusqu'à des chiffres également quasiment normaux. Cependant l'onde E', qui dépend uniquement de la relaxation, diminue. Cela provoque une augmentation du rapport E/E' > 14 .

Le stade terminal de la dysfonction diastolique, dit restrictif, est caractérisé par une importante diminution de la compliance du VG et des pressions de remplissage du VG élevés, qui se traduit par un DT très court et une augmentation de l'onde E. L'onde A est diminuée du fait de l'installation d'une dysfonction auriculaire gauche. Le rapport E/A augmente donc fortement, > 2 . L'onde E' continue de diminuer et le rapport E/E' augmente encore.

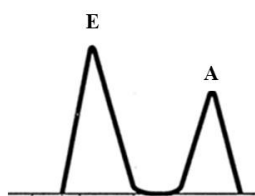
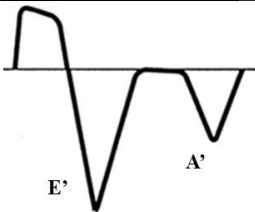
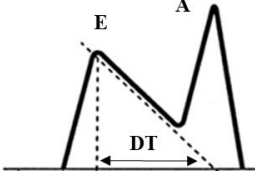
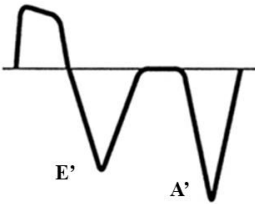
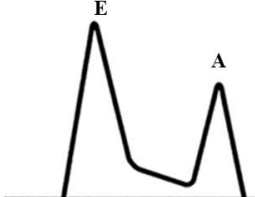
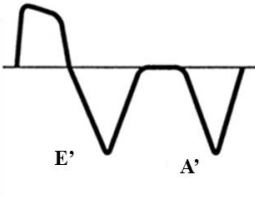
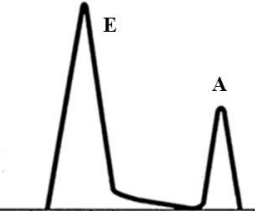
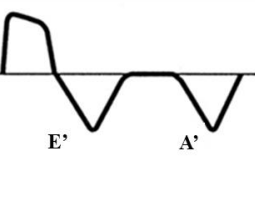
	Doppler pulsé trans-mitral	Doppler tissulaire de l'anneau mitral	
Normal			E/A normal DT normal E' normal
Grade I : Altération de la relaxation			E/A diminué DT augmenté E' diminué
Grade II : Pseudonormal			E/A normal ou augmenté DT normal E' diminué E/E' augmenté
Grade III : Restrictif			E/A très augmenté DT diminué E' diminué E/E' très augmenté

Figure 5 : Caractéristiques du Doppler pulsé et du Doppler tissulaire de l'anneau mitral aux différents stades de la dysfonction diastolique. Pour tous les stades de la dysfonction diastolique, E' est diminué.

Facteurs de risque

Les études épidémiologiques ont joué un rôle important dans l'identification des facteurs de risque (FdR) associés au développement des maladies CV. La *Framingham heart study* est sans doute la plus emblématique d'entre elle (16). Commencée en 1948 avec 5 209 sujets inclus, l'étude en est désormais à sa troisième génération de participants et a permis la publication de plus de 3000 articles. Ainsi, depuis plusieurs décennies, la dyslipidémie, le diabète, l'hypertension artérielle, l'obésité, le syndrome métabolique (Sd Met), défini par l'association d'une obésité abdominale et de 2 autres critères parmi i) un taux de triglycérides élevé, ii) un taux de HDL bas, iii) une HTA et iv) une glycémie à jeun augmentée (Tableau 1), et le tabagisme sont reconnus comme étant les principaux FdR d'IC, notamment par le biais de la survenue de lésions d'athérosclérose impliquées dans la survenue des maladies CV ischémiques (17–23).

Cependant, les FdR d'ICFEP et d'ICFER ne sont pas identiques. Des études épidémiologiques ont démontré que le Sd Met ainsi que ses différents composants pris isolément demeurent des FdR d'IC indépendamment de la survenue d'un épisode ischémique (24,25).

Les patients avec une ICFEP, comparés à ceux avec une FEVG réduite, sont plus âgés et plus souvent de sexe féminin. Dans une étude publiée en 2015, Gerber suggère que les personnes qui développent une ICFEP ont 6 ans de plus en moyenne que ceux qui développent une ICFER (12). De même, la prévalence du sexe féminin est environ 30% à 40% plus élevée chez les patients ICFEP par rapport aux patients ICFER (11) (Figure 6).

La principale maladie CV associée à l'ICFEP est l'HTA, présente chez la majorité des patients (60 à 89% selon les études) (26), avec une tension artérielle plus élevée comparée aux patients avec une ICFER. Les autres comorbidités les plus couramment associées à l'ICFEP comprennent la fibrillation auriculaire, le diabète de type 2 (avec une prévalence évaluée entre 20% et 40%), l'insuffisance rénale chronique (20% à 30%) (27) et l'obésité (prévalence estimée selon les études jusqu'à 50%) (28) (Figure 7). Bien que plus fortement associées à l'ICFER, les coronaropathies sont également fréquentes dans l'ICFEP, avec une prévalence allant de 35% à 60% selon les études (29).

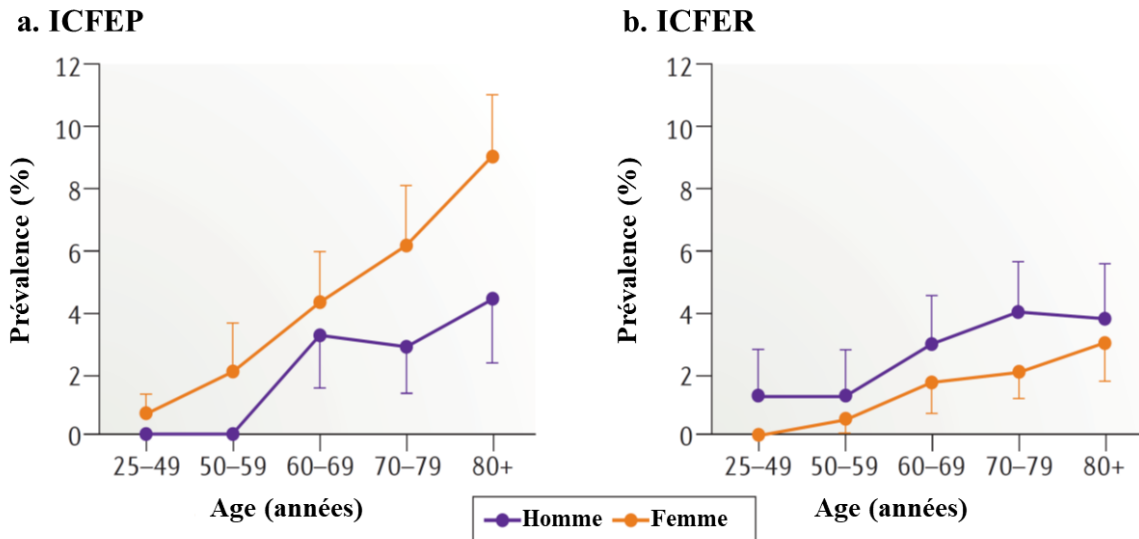


Figure 6 : Prévalence de l'ICFEP et de l'ICFER selon l'âge et le sexe, d'après Dunlay et al (30).
 a. La prévalence de l'ICFEP augmente avec l'âge pour les deux sexes, mais est plus élevée chez les femmes quel que soit l'âge.
 b. Inversement, la prévalence de l'ICFER augmente avec l'âge pour les deux sexes, mais est plus élevée chez les hommes quel que soit l'âge.

Characteristic	Reduced Ejection Fraction (N=2429)	Preserved Ejection Fraction (N=2167)	P Value	Adjusted P Value†
Age (yr)	71.7±12.1	74.4±14.4	<0.001	NA
Male sex (% of patients)	65.4	44.3	<0.001	<0.001
Body-mass index‡	28.6±7.0	29.7±7.8	0.002	0.17
Obesity (% of patients)‡§	35.5	41.4	0.007	0.002
Serum creatinine on admission (mg/dl)	1.6±1.0	1.6±1.1	0.31	0.30
Hemoglobin on admission (g/dl)	12.5±2.0	11.8±2.1	<0.001	<0.001
Hypertension (% of patients)	48.0	62.7	<0.001	<0.001
Coronary artery disease (% of patients)	63.7	52.9	<0.001	<0.001
Atrial fibrillation (% of patients)	28.5	41.3	<0.001	<0.001
Diabetes (% of patients)	34.3	33.1	0.42	0.61
Substantial valve disease (% of patients)	6.5	2.6	<0.001	0.05
Ejection fraction (%)	29±10	61±7	<0.001	NA

Figure 7 : Comparaison des caractéristiques des patients avec une ICFEP et avec une ICFER, issu de Owan et al (9)

	NCEP-ATPIII	OMS	EGIR	AACE	IDF
Requis		Resistance à l'insuline Glucose ≥ 110 mg/dL Glucose 2h postprandial ≥ 140 mg/dL	Resistance à l'insuline	IMC > 25 kg / m ² ou PA ≥ 102 cm (♂) ; ≥ 88 cm (♀)	PA : Caucasiens : ≥ 94 cm (♂) ; ≥ 80 cm (♀) ; Asiatiques : ≥ 90 cm (♂) ; ≥ 80 cm (♀)
Nb de critères	≥ 3 parmi	et ≥ 2 parmi	et ≥ 2 parmi	et ≥ 2 parmi	et ≥ 2 parmi
Glucose	≥ 100 mg/dL		≥ 110 mg/dL	≥ 110 mg/dL ≥ 140 mg/dL (2h postprandial)	≥ 100 mg/dL
HDL	< 40 mg/dL (♂) ; < 50 mg/dL (♀) ou sous traitement hypolipémiants	< 35 mg/dL (♂) ; < 40 mg/dL (♀)	< 40 mg/dL	< 40 mg/dL (♂) ; < 50 mg/dL (♀)	< 40 mg/dL (♂) ; < 50 mg/dL (♀) ou sous traitement hypolipémiants
Triglycérides	≥ 150 mg/dL sous traitement hypolipémiants	et / ou ≥ 150 mg/dL	et / ou ≥ 180 mg/dL	≥ 150 mg/dL	≥ 150 mg/dL sous traitement hypolipémiants
Obésité	PA ≥ 102 cm (♂) ; ≥ 88 cm (♀)	PA / PH $> 0,9$ (♂) ; $> 0,85$ cm (♀) ou IMC ≥ 30 kg/m ²	PA ≥ 94 cm (♂) ; ≥ 80 cm (♀)		
HTA	$\geq 130/85$ mm Hg ou sous traitement anti-hypertenseur	$\geq 140/90$ mm Hg	$\geq 140/90$ mm Hg	$\geq 130/85$ mm Hg	$\geq 130/85$ mm Hg ou sous traitement anti-hypertenseur

Tableau 1 : Définitions du Sd Met, d'après Vinluan (31). NCEP-ATPIII National Cholesterol Education Program Third Adult Treatment Panel ; WHO World Health Organisation ; EGIR European Group for the Study of Insulin Resistance ; AACE American Association of Clinical Endocrinologists ; IDF International Diabetes Federation ; IMC : indice de masse corporelle ; PA : périmètre abdominal ; PH : périmètre aux hanches

Physiopathologie

La physiopathologie de l'ICFEP est complexe, multifactorielle et encore mal comprise. Les signes et symptômes de l'ICFEP sont en grande partie liés à des troubles hémodynamiques causés par des anomalies de la structure et de la fonction cardiaque. Cependant, en plus des altérations cardiaques, des données récentes ont souligné un rôle important d'autres systèmes dans l'ICFEP, en particulier des anomalies du système vasculaire, de l'endothélium, des adipocytes.

Inflammation

Les FdR établis d'ICFEP tels que l'obésité, l'HTA, le diabète ou la dyslipidémie favorisent l'installation d'un état pro-inflammatoire systémique.

L'élévation de la masse grasseuse abdominale, classiquement en cause dans l'élévation des risques métaboliques et CV, résulte d'un déséquilibre entre l'apport et la dépense énergétiques qui, pour répondre à la demande accrue de capacité de stockage, conduit à une hyperplasie et une hypertrophie des adipocytes. Ces modifications s'accompagnent entre autre d'une altération de la sécrétion d'adipokines par le tissu adipeux. Ainsi, chez les patients obèses ou en surpoids, les adipocytes hypertrophiques sécrètent de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires telles que le *tumor necrosis factor- α* (TNF α) et l'interleukine-6 (IL-6). De même, une augmentation de la sécrétion de protéines chimio-attractantes comme le *monocyte chemoattractant protein-1* (Ccl2) par les adipocytes induit le recrutement et l'infiltration du tissu adipeux par les macrophages, en particulier des macrophages pro-inflammatoires, dit classiques. Ceux-ci contribuent aussi à l'expression accrue de cytokines pro-inflammatoires, accentuant ainsi davantage l'état inflammatoire du tissu adipeux et systémique. Alors que la majorité des adipokines est augmentée dans l'obésité, l'expression de l'adiponectine est diminuée. Contrairement à de nombreuses autres adipokines, l'adiponectine possède des propriétés insulino-sensibilisantes, anti-inflammatoires et anti-prolifératives (32,33).

Les marqueurs de l'inflammation périphérique, tels la protéine C-réactive, l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-10, ou le TNF α sont souvent élevés chez les patients ICFEP et leur augmentation est associée à un plus mauvais pronostic (34–36). Le taux de protéine C-réactive est ainsi corrélé positivement à l'augmentation de la pression ventriculaire gauche en fin de diastole (37). Au niveau cardiaque, Westermann *et coll.* ont mis en évidence une inflammation myocardique significative chez les patients présentant une ICFEP, comparée à une série de sujets sains, avec un nombre plus élevé d'éléments leucocytaires (CD45+ ou CD11a+) et en particulier de lymphocytes T (CD3+) (38). Dans une étude plus récente, également sur des biopsies endo-

myocardiques, Hahn *et coll* retrouve une infiltration par les macrophages (CD68+) plus importante chez les patients ICFEP comparée aux témoins (39). D'autres études menées sur des modèles murins d'ICFEP retrouvent également une inflammation cardiaque (40). Si elle perdure, cette inflammation tissulaire entraîne un remodelage tissulaire diffus. Au niveau de la matrice extra-cellulaire ces modifications se caractérisent par l'installation d'une fibrose myocardique. L'inflammation est également responsable d'une augmentation de la production d'espèce réactive de l'oxygène (ERO) ce qui diminue la biodisponibilité en monoxyde d'azote (NO), favorisant au niveau cardiaque l'hypertrophie globale des cardiomyocytes et la rigidité intrinsèque des myofibres, comme décrit plus bas. Enfin, l'inflammation entraîne une dysfonction endothéliale et une raréfaction micro-vasculaire aboutissant à une réduction de la réserve coronaire retrouvée chez le patients atteints d'ICFEP (41,42). L'ensemble de ces remaniements conduit à l'installation d'une dysfonction diastolique (Figure 8).

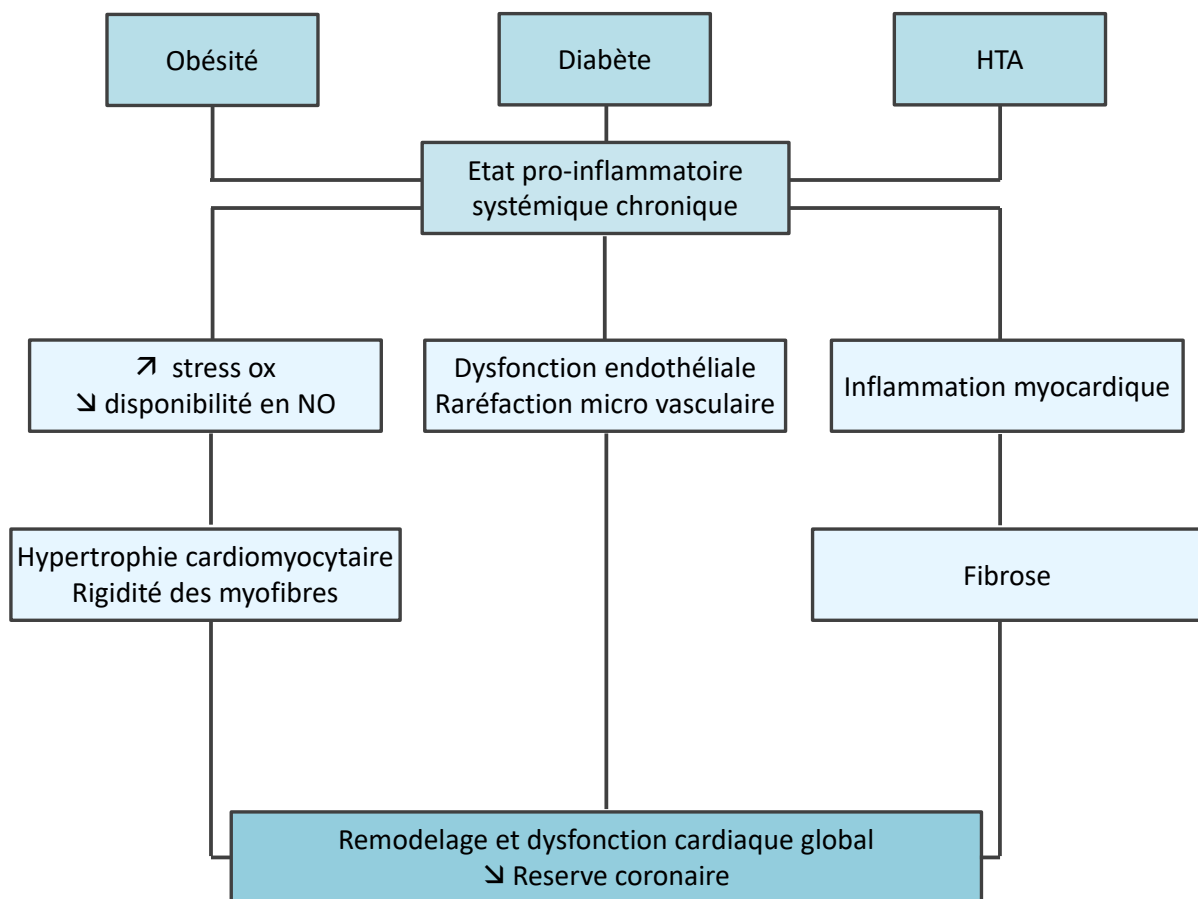


Figure 8 : Modèle physiopathologique de l'ICFEP, d'après Redfield, *N Engl J Med*, 2016

Rigidité myocardique, relaxation ventriculaire et hypertrophie cardiomyocytaire

La présence d'une dysfonction diastolique est caractéristique de l'ICFEP. Elle est le résultat de l'augmentation de la rigidité myocardique qui contribue à la diminution de la relaxation du VG et à l'augmentation de la pression intra-ventriculaire gauche en fin de diastole, principalement à l'effort, lorsque la fréquence cardiaque augmente (Figure 9).

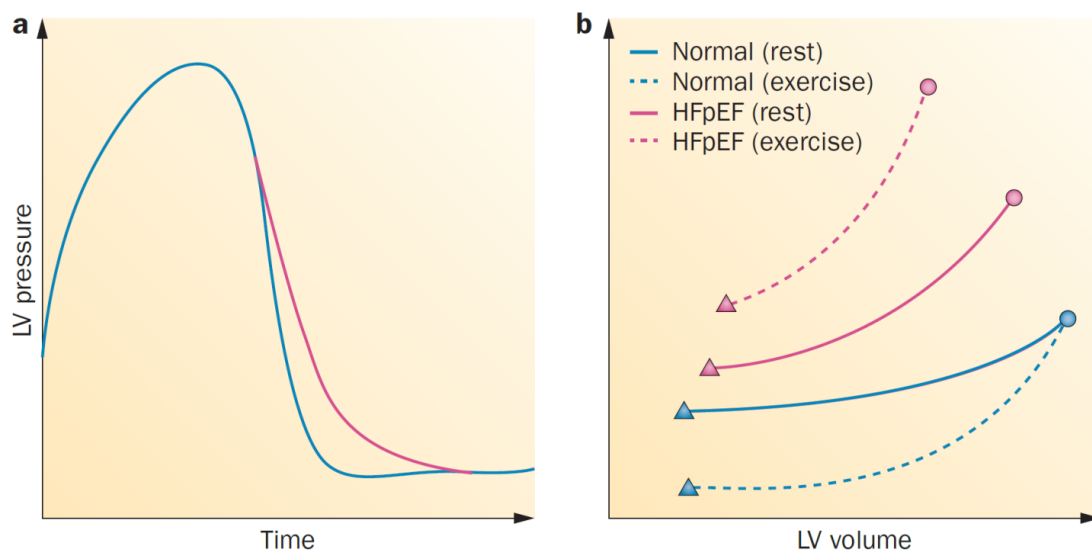


Figure 9 : Fonction diastolique du VG chez des sujets sains et porteurs d'une ICFEP, issue de Borlaug, Nat. Rev. Cardiol, 2014 (43)

a. Pression ventriculaire gauche en fonction du temps. Le temps de relaxation du VG est augmenté dans l'ICFEP (courbe rouge), comparé aux sujets sains (courbe bleue).

b. Relations pression diastolique VG-volume. Dans le VG normal au repos (trait bleu plein), l'augmentation de la pression pendant la diastole est minime malgré de fortes augmentations du volume, avec une pression télédiastolique normale (cercle bleu) lié à l'optimisation de l'aspiration diastolique précoce. A l'effort (ligne pointillée bleue), la pression télédiastolique est maintenue du fait de la diminution de la pression diastolique minimale (triangles bleus). Dans l'ICFEP, la relation pression diastolique-volume au repos (ligne continue rouge) est généralement décalée vers le haut et vers la gauche, indiquant une rigidité accrue du VG. A l'effort (ligne pointillée rouge), la courbe est décalée vers le haut, avec à la fois une pente plus raide et une pression minimale plus élevée (triangles rouges) reflétant une aspiration diastolique précoce inadéquate, et aboutissant à une augmentation spectaculaire de la pression télédiastolique (cercles rouges)

Les propriétés de rigidité passive du cœur sont déterminées par la composition de la matrice extracellulaire et des cardiomyocytes. Dans l'interstitium, la quantité et la proportion de collagène de type 1 ainsi que l'importance du niveau de « cross-linking », i.e. la réticulation des fibres de collagène entre elles sont deux déterminants majeurs de la rigidité de la matrice extracellulaire. L'augmentation de la quantité de collagène de type 1 résulte d'un déséquilibre entre sa synthèse et sa dégradation (44,45). L'expression de la VCAM-1 (*Vascular cell adhesion protein 1*) et de la E-sélectine par les cellules endothéliales en réponse à la synthèse d'ERO favorise la migration tissulaire des monocytes qui libèrent des facteurs de croissance tel que le

TGF β (*transforming growth factors β*). Celui-ci stimule la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et augmente la synthèse de collagène dans l'interstitium (46). Chez les patients ICFEP, il est de plus retrouvé une diminution de la dégradation du collagène en raison d'une baisse d'expression des métalloprotéinases de la matrice (MMP) et de la surexpression des inhibiteurs des métalloprotéinases de la matrice (TIMP) (38,47).

Cette rigidité myocardique est donc liée à des anomalies de la matrice extracellulaire, mais également à des modifications du cardiomyocyte lui-même. Dans une étude publiée en 2005, Borbély *et coll* ne retrouve, dans un tiers des biopsies endo-myocardiques de patients atteints d'ICFEP, pas de fibrose interstitielle significative (48). Hahn *et coll* retrouve quant à eux une fibrose myocardique sur 93% des biopsies myocardiques de patients ICFEP mais celle-ci reste cependant faible dans 71% des cas (39), ce qui implique une augmentation de la rigidité cardiomyocytaire intrinsèque.

La titine est une protéine du cytosquelette des cellules musculaires, dépendante de l'activité de la protéine kinase G (PKG) dépendante de la cGMP, qui régule l'élasticité du sarcomère. Elle agit comme un « tendeur » moléculaire pour résister passivement à l'étirement, maintenant ainsi l'intégrité structurelle du muscle. Dans le sarcomère cardiaque, les deux principaux isoformes de la titine sont le N2BA et le N2B, plus rigide. Un déséquilibre dans le rapport des deux isoformes majeurs de la titine a été évoqué comme mécanisme de l'augmentation de la rigidité myocardique dans l'ICFEP (49). D'autres études suggèrent que l'augmentation de la rigidité passive du myocarde peut également résulter d'altérations de l'état de phosphorylation ou d'oxydation de la titine. Dans l'ICFEP, les molécules de titine sont dans un état hypo-phosphorylé, probablement du fait de la faible biodisponibilité en NO et de la réduction de l'activité PKG, ce qui augmente la tension au repos des cardiomyocytes (50). L'activité PKG est diminuée dans l'ICFEP et a été associée à une augmentation de tension des cardiomyocytes au repos (rigidité passive) et liée à une augmentation du stress oxydatif du myocarde (51,52). Une faible activité PKG supprime également le frein sur les stimuli pro-hypertrophiques induisant une hypertrophie des cardiomyocytes (40,53).

Des anomalies dans l'homéostasie intracellulaires du calcium, décrites dans l'ICFEP, sont impliquées dans la mise en place de l'hypertrophie des cardiomyocytes (40,54). La relaxation ventriculaire pendant la diastole est assurée par la recapture du Ca²⁺ libre par le réticulum sarcoplasmique. Des anomalies de la recapture du Ca²⁺, également en partie lié aux mécanismes de stress oxydatif, ont été évoquées comme impliqués dans la mise en place de la dysfonction diastolique retrouvée dans l'ICFEP (55). Bien que cela a été décrit dans des modèles animaux de diabète, ces altérations n'ont encore jamais été rapporté chez l'homme (40). La relaxation

est de plus un processus consommateur d'énergie et l'augmentation de la rigidité des cardiomyocytes en augmente le coût énergétique de chaque cycle cardiaque. Une inadéquation entre l'offre et la demande d'énergie du myocarde peut donc contribuer au développement de l'ICFEP. Les demandes énergétiques du myocarde sont satisfaites principalement par la production mitochondriale d'adénosine triphosphate (ATP) via la phosphorylation oxydative. Des études récentes ont en effet montrées une réserve d'énergie myocardique réduite chez les patients ICFEP par rapport aux témoins (56,57).

Altérations cardio-métaboliques

L'ICFEP implique des altérations dans de multiples voies métaboliques. Dans le cœur adulte normal, les acides gras sont le substrat énergétique principal, leur β -oxydation représentant environ 70 à 90% de la production d'ATP du myocarde tandis que l'oxydation du glucose représente les 10 à 30% restants. Une flexibilité métabolique au niveau cardiaque est pourtant essentielle en particulier dans des conditions consommatrices d'énergie comme au cours d'un exercice physique et pendant les périodes de jeûne. L'absorption cellulaire des acides gras est médiée par le cluster de différenciation 36 (CD36). Le transport du glucose dans le tissu cardiaque, tout comme dans le muscle squelettique, le foie et le tissu adipeux, est médié par le transporteur de glucose de type 4 (GLUT4). L'insuline en se liant à son récepteur, stimule la translocation de GLUT4 vers la membrane cellulaire pour augmenter l'absorption du glucose (58). Cependant, dans un contexte d'hyperglycémie et de résistance à l'insuline comme dans le diabète, mais également dans un contexte d'hypertriglycéridémie, il est observé une réduction de la capacité du myocarde à utiliser le glucose comme source d'énergie, basculant alors vers une dépendance quasi totale aux acides gras. Ce phénomène est dû à l'augmentation des taux circulants d'acides gras chez les patients diabétiques ou obèses et à leur captation dans différents tissus dont le cœur, surpassant la capacité oxydative des mitochondries. Bien que la β -oxydation des acides gras génère de l'ATP, cela nécessite environ 50% d'oxygène de plus que lorsqu'elle est dérivée du métabolisme du glucose, ce qui entraîne finalement un stress oxydatif, une production accrue de ERO participant encore à la réduction de la biodisponibilité du NO (59,60) et donc, comme mentionné avant, à l'augmentation de la rigidité myocardique. L'accumulation de lipides dans le cœur entraîne également une réorientation des acides gras en excès dans des voies métaboliques non oxydatives, avec pour conséquence directe l'augmentation de la synthèse d'espèces lipidiques potentiellement toxiques. Des données récentes ont impliqué les acides gras et l'acyl coenzyme A gras, le diacylglycérol et le céramide dans la lipotoxicité cellulaire via l'induction d'une apoptose, l'altération de la signalisation insulinique et

l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique (59,61). Dans un modèle murin d'ICFEP induit par un régime riche en graisse et l'administration de L-NAME pour induire une hypertension, il a été retrouvé une stéatose cardiaque sévère avec accumulation de triglycérides dans les cardiomyocytes et altération de l'oxydation des acides gras mitochondriaux cardiaques (62).

L'hyperglycémie, la résistance à l'insuline et les altérations de la signalisation cardiaque de l'insuline sont également impliquées dans le développement de l'ICFEP. La signalisation cardiaque de l'insuline joue un rôle majeur dans l'homéostasie cellulaire. L'altération de la signalisation de l'insuline diminue le recrutement de GLUT4 vers la membrane plasmique et donc l'absorption du glucose (58,59). Une diminution de la translocation de GLUT4 à la membrane cytoplasmique des cardiomyocytes a ainsi été démontrée dans des biopsies myocardiques ventriculaires issues de patients atteints de diabète (63). L'hyperglycémie et la résistance à l'insuline favorisent également l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'hypertrophie des cardiomyocytes, tels que la chaîne lourde de la β -myosine, le récepteur du facteur de croissance 1 analogue à l'insuline (IGF-1R) et le BNP (54). Une hyperglycémie prolongée augmente la glycation des protéines interstitielles. La réticulation du collagène qui en résulte augmente à son tour la rigidité du VG, altérant ainsi la relaxation diastolique (59).

[Anomalies micro-circulatoires et réserve coronaire](#)

L'existence d'altérations micro-vasculaires coronaires a été démontrée dans l'ICFEP sur des biopsies myocardiques ainsi que par des techniques d'imageries et des techniques plus invasives (41,42,52,64–66). Cette dysfonction micro-vasculaire coronaire réduit le flux sanguin coronaire, la perfusion myocardique et la fonction ventriculaire. Les anomalies de la micro-circulation coronarienne décrites comprennent également un état pro-inflammatoire favorisant l'adhésion des cellules immunitaires, un remodelage vasculaire et une fibrose péri-vasculaire, ainsi qu'une dysfonction endothéliale avec une altération de la relaxation et de la constriction vasculaire (59). La raréfaction micro-vasculaire cardiaque retrouvée chez les patients ICFEP (41) entraîne une diminution de la réserve coronaire (42,64), et donc une perfusion inadéquate menant à une réduction de la réserve énergétique du myocarde. L'hyperglycémie chronique, la résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie sont associés à des altérations de la vasodilatation coronarienne qui diminue également la perfusion myocardique (67). Entre autre, l'activité de la NO synthase (eNOS) endothéliale au niveau coronaire, stimulée par l'insuline, est diminuée du fait de l'insulino-résistance contribuant à la diminution de la biodisponibilité en NO (58) et ainsi de la perfusion cardiaque induite par le flux.

Plusieurs études ont démontré une implication de la dysfonction endothéliale micro-vasculaire coronarienne et du stress oxydatif dans l'ICFEP (Figure 10). L'inflammation endothéliale micro-vasculaire favorise le stress oxydatif en générant des ERO, ce qui diminue l'activité myocardique de la PKG en diminuant la biodisponibilité en NO, favorisant, comme mentionné avant, l'hypertrophie des cardiomyocytes et la rigidité myocardique (51–53).

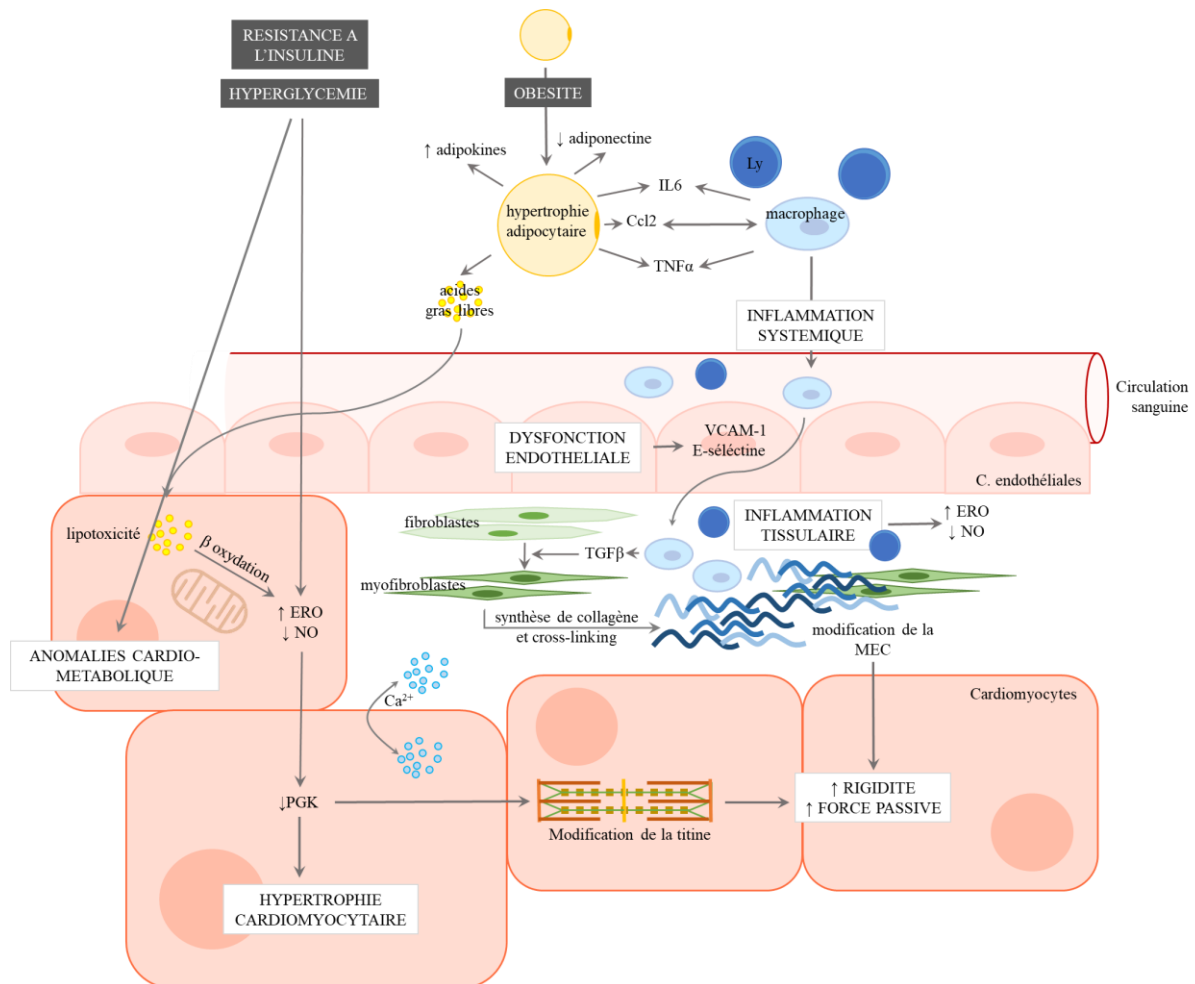


Figure 10 : Schéma des principaux mécanismes physiopathologiques en jeu dans le développement de l'ICFEP.

Pronostic et mortalité

Les hospitalisations de patients atteints d'IC, toutes causes confondues, sont fréquentes (Figure 11), avec en moyenne 1,34 hospitalisation par patient et par an (12). Le taux d'hospitalisation pour causes CV n'a pas évolué de façon significative entre 2000 et 2010, alors que celui pour causes non CV a augmenté. (12). Parmi les patients IC hospitalisés, 53% ont une FEVG réduite et 47% une FEVG préservée (4).

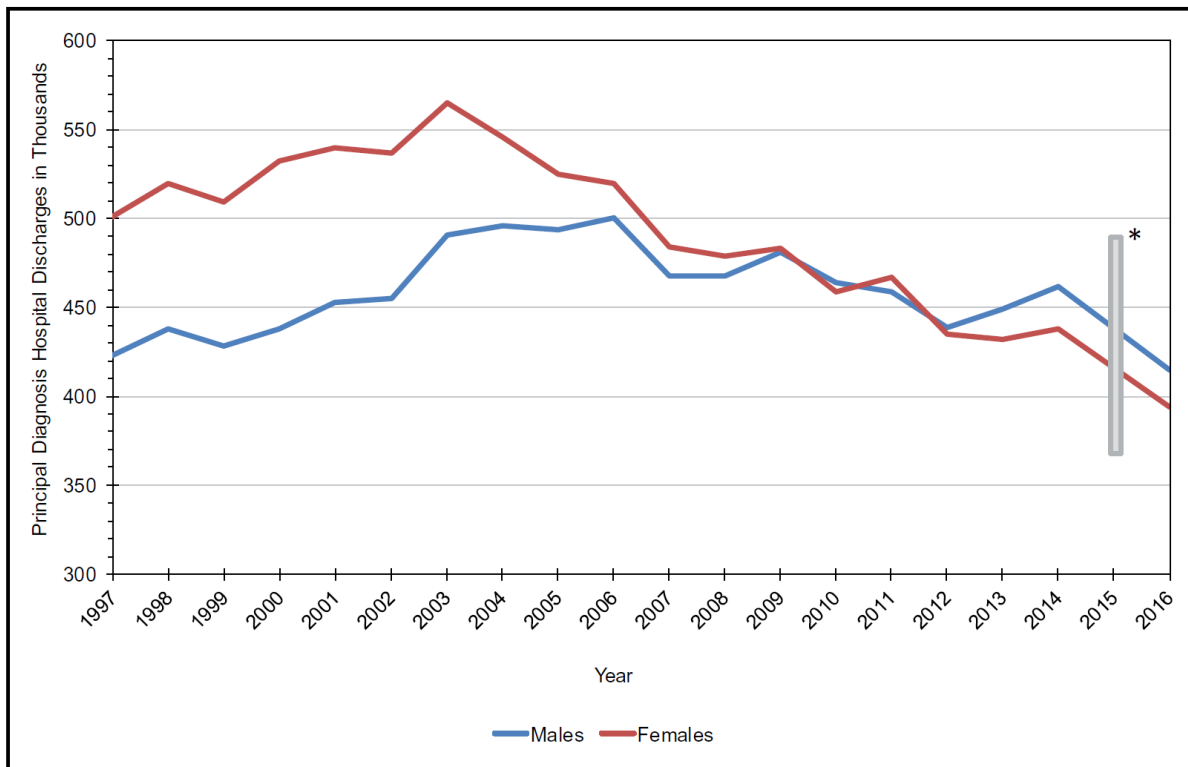


Figure 11 : Nombre d'hospitalisation pour IC par sexe, aux USA, entre 1997 et 2016, d'après Virani et al, *Heart Disease and Stroke Statistics—2020 Update*.

* Absence de donnée disponible en 2015.

Le nombre d'hospitalisation dans le cadre d'une ICFEP est en constante augmentation, sans augmentation concomitante significative des hospitalisations pour ICFER. La prévalence moyenne des hospitalisations pour ICFEP est ainsi passée de 38% à 54% en 15 ans (9). Il y a 50% de risque de ré-hospitalisation pour IC dans les 6 mois chez les patients ICFEP (68).

La mortalité est élevée parmi les patients IC. Le taux de mortalité à 1 et 5 ans de suivi après le diagnostic est respectivement de 20 et 53% (12). Le taux de mortalité spécifique de l'ICFEP varie selon les études. Dans leur étude rétrospective, Owan *et coll* l'estime à 29% à 1 an et 65% à 5 ans. Ces taux sont comparable à ceux de l'ICFER évalué dans la même étude à 32 et 68% respectivement (9). Dans leur étude prospective, Lam *et coll* estime le taux de mortalité des patients avec ICFEP à 75/1000 patients/années (69). Ce taux est évalué à 53/1000 patients/année dans la cohorte CHARM-Preserved et 54/1000 patients/année dans la cohorte I-PRESERVE (70,71).

Les études suggèrent que l'incidence de la mortalité CV est plus faible, et celle de la mortalité non CV plus élevée dans l'ICFEP par rapport à ICFER (11). Les décès chez les patients ICFEP restent principalement liés à des causes CV. Cependant, les causes non-CV représentent une

part importante de la mortalité chez les patients ICFEP (72), justifiant une prise en charge plus globale de leurs nombreuses comorbidités (Figure 12).

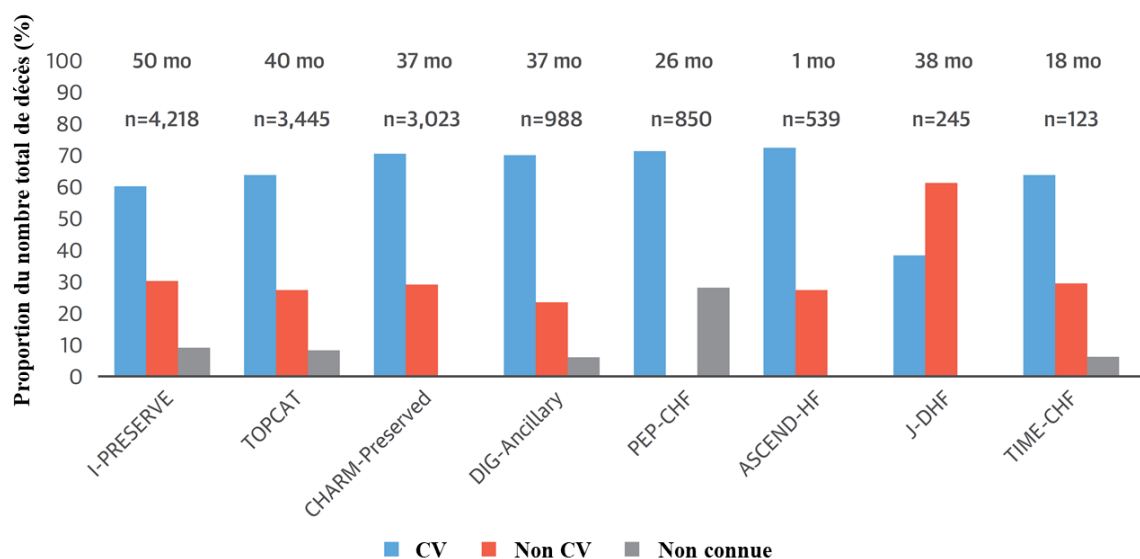


Figure 12 : Revue systématique de la proportion de mortalité CV et non-CV chez les patients avec ICFEP dans les essais contrôlés randomisés contemporains, d'après Vagudanathan et al (72). La durée moyenne du suivi (en mois) et le nombre total de patients ICFEP inclus dans chaque essai sont notés en haut du graphique.

L'hypertension artérielle pulmonaire se développe fréquemment chez les patients atteints d'ICFEP, secondairement à l'augmentation de la pression de remplissage ventriculaire gauche. Elle a été rapportée chez 40 à 80% des patients et est associée à un plus mauvais pronostic (73). L'association de l'IC et d'une dysfonction rénale est fréquente. Une insuffisance rénale chronique, définie par un débit de filtration glomérulaire $< 60\text{ml/min}/1,73\text{m}^2$, est retrouvée chez 26 à 53% des patients présentant une ICFEP et sa présence est associée à un risque de mortalité accrue (74). L'insuffisance rénale est connue pour être un facteur de risque d'ICFEP. L'ICFEP à un stade avancé aggrave à son tour la fonction rénale en participant à la diminution de la perfusion rénale. De plus, la congestion veineuse entraîne, au niveau rénal, une fibrose interstitielle et une augmentation de la pression tubulaire, réduisant encore la fonction rénale (74,75).

Lam *et coll* a comparé les différences de survie entre les sexes au sein de la cohorte de l'essai I-PRESERVE, et a constaté que les femmes avaient un risque inférieur de 21% d'hospitalisation ou de décès, toutes causes confondues (76). De même, une analyse de la cohorte issue de l'essai TOPCAT montre que les femmes atteintes d'ICFEP ont une meilleure survie globale que les hommes. Il a de plus été mis en évidence dans cette étude que les facteurs influençant le taux

de décès ou d'hospitalisation pour causes CV diffèrent entre les sexes. Chez les femmes, le différentiel de la pression artérielle (différence entre les pressions artérielles systolique et diastolique) est le principal facteur prédictif, tandis que chez les hommes, il s'agit de la fréquence cardiaque et du taux de BNP (77).

Prise en charge

L'ICFEP est associée à différents phénotypes, en particulier diverses maladies CV concomitantes, comme la fibrillation auriculaire, l'hypertension artérielle, la cardiopathie ischémique ou l'hypertension pulmonaire et des maladies non CV comme le diabète, l'insuffisance rénale chronique ou l'obésité.

Des essais cliniques de grandes ampleurs ont été réalisés ces 20 dernières années. Cependant, jusqu'à récemment, aucun des traitements efficaces en cas d'ICFER (inhibiteurs de l'enzyme de conversion à l'angiotensine (IEC), bloqueur des récepteurs de l'angiotensine 2 (ARA2), antagoniste des récepteurs aux minéralo-corticoïdes ou bêtabloquants) n'avait encore démontré de manière convaincante une efficacité dans la réduction de la mortalité chez les patients atteints d'ICFEP (Figure 13). Récemment, une grande étude « EMPEROR-preserved » a démontré l'efficacité de l'empagliflozine, un inhibiteurs du cotransporteur sodium-glucose 2 utilisé comme anti-diabétique, dans la réduction du risque combiné de décès cardiovasculaire ou d'hospitalisation pour insuffisance cardiaque chez les patients ICFEP (78).

Trial	Intervention	Major inclusion criteria	Mean follow-up	Primary endpoints
PEP-CHF ²⁰	Perindopril vs placebo.	LV wall motion index ≥ 1.4 (corresponding to LVEF $\geq 40\%$), symptomatic HF treated with diuretic, diastolic dysfunction in echocardiography, age ≥ 70 y.	2.1 y	No difference in combined all-cause mortality or cardiovascular hospitalization (36% vs 37%, $P=0.35$).
I-PRESERVE ³¹⁸	Irbesartan vs placebo.	LVEF $\geq 45\%$, NYHA III–IV with corroborative evidence, or NYHA II with HF hospitalization in recent 6 months, age ≥ 60 y.	4.1 y	No difference in combined all-cause mortality or HF hospitalization (24% vs 25%, $P=0.54$).
CHARM-Preserved ³¹⁹	Candesartan vs placebo.	LVEF $>40\%$, NYHA II–IV, history of cardiac hospitalization.	3.0 y	Trend towards a reduction in combined cardiovascular mortality or HF hospitalization by 11% (22% vs 24%, unadjusted $P=0.12$, adjusted $P=0.051$).
Aldo-DHF ³³⁰	Spirolactone vs placebo.	LVEF $\geq 50\%$, NYHA II–III, peak $VO_2 \leq 25$ mL/min/kg, diastolic dysfunction on echocardiography or atrial fibrillation, age ≥ 50 y.	1.0 y	Reduction in E/e' by -1.5 ($P < 0.001$) No change in peak VO_2 ($P=0.81$).
TOPCAT ³¹⁰	Spirolactone vs placebo.	LVEF $\geq 45\%$, ≥ 1 HF sign, ≥ 1 HF symptom, HF hospitalization within recent 12 months, or BNP ≥ 100 pg/mL or NT-proBNP ≥ 360 pg/mL, age ≥ 50 y.	3.3 y	No difference in combined cardiovascular death, aborted cardiac arrest, or HF hospitalization (19% vs 20%, $P=0.14$).
SENIORS ¹⁷³	Nebivolol vs placebo.	HF confirmed as HF hospitalization in recent 12 months and/or LVEF $\leq 35\%$ in recent 6 months, age ≥ 70 y, 36% with LVEF $>35\%$.	1.8 y	Reduction in combined all-cause mortality or cardiovascular hospitalization by 14% (31% vs 35%, $P=0.04$).
DIG-PEF ³²³	Digoxin vs placebo.	HF with LVEF $>45\%$, sinus rhythm.	3.1 y	No difference in combined HF mortality or HF hospitalization (21% vs 24%, $P=0.14$).
PARAMOUNT ³⁰⁹	Sacubitril/valsartan vs valsartan.	HF with LVEF $\geq 45\%$, NYHA II–III, NT-proBNP >400 pg/mL.	12 w	Reduction in NT-proBNP: ratio of change sacubitril/valsartan 0.77, 95% CI 0.64–0.92 ($P=0.005$).
RELAX ³¹¹	Sildenafil vs placebo.	HF with LVEF $\geq 45\%$, NYHA II–IV, peak $VO_2 < 60\%$ of reference values, NT-proBNP >400 pg/mL or high LV filling pressures.	24 w	No change in peak VO_2 ($P=0.90$).

Figure 13 : Récapitulatif de essais cliniques de phase II et III réalisés chez des patients atteints d'ICFEP tiré de (26).

Il est actuellement recommandé de dépister chez ces patients les comorbidités CV et non CV, qui, si elles sont présentes, doivent être prises en charge afin d'améliorer les symptômes, la qualité de vie et de limiter les épisodes de décompensation cardiaque. L'utilisation de diurétique est indiquée en cas de signes cliniques d'hyper-volémie (5).

Modèles animaux

Les patients atteints d'ICFEP ne sont généralement pas éligibles à une transplantation cardiaque et des biopsies cardiaques ne sont effectuées que dans de très rares centres dans le monde, de sorte que les données sur les tissus humains, en particulier sur les cardiomyocytes vivants, sont extrêmement limitées. Les modèles animaux utilisés afin d'étudier l'ICFEP ont évolué au fur et à mesure des découvertes scientifiques sur ses mécanismes physiopathologiques (Tableau 2). Du fait de leur espérance de vie courte, les petits rongeurs sont couramment utilisés pour étudier le vieillissement et les maladies liées à l'âge. Le vieillissement cardiaque chez la souris est comparable à celui de l'homme, avec l'installation progressive d'une hypertrophie ventriculaire gauche et une altération de la fonction diastolique. De même, la dégénérescence myocardique progressive et la fibrose sont connues pour se développer avec l'âge chez les rats (79).

D'autres modèles murins ont été développés en mettant l'accent sur l'HTA et l'hypertrophie ventriculaire. Ainsi, dès les années 1980 des équipes ont utilisé des rats sensibles au sel (*Dahl salt-sensitive rat*, Dahl/SS), des rats spontanément hypertendus (SHR) ou des souris avec un rétrécissement aortique chirurgical afin d'étudier l'effet de la surcharge de pression ventriculaire sur le tissu cardiaque. Les rats SHR sont issus d'une souche consanguine sélectionnée initialement pour ses chiffres de tension artérielle élevés. Ils développent une hypertrophie concentrique compensée du VG au cours de la première année. Ils évoluent vers une IC vers l'âge de 2 ans, rendant ce modèle long et donc coûteux. De plus, l'évolution des valeurs de FEVG sont variables, avec plus de 50% des individus qui dégradent leur FEVG et évoluent vers une ICFER à 20 mois, ce qui rend ce modèle peu utilisé pour la recherche sur l'ICFEP (80). Les rats Dahl/SS sont sélectionnés à partir de la souche de rat Sprague-Dawley pour les valeurs de tension artérielle élevées. Ils se caractérisent par une hypersensibilité au sodium et représentent un modèle animal d'ICFEP largement utilisé car lorsqu'ils sont nourris avec un régime riche en sel ils développent, à partir de l'âge de 7 semaines, une insuffisance rénale, une HTA (> 175 mmHg) et une hypertrophie du VG. Ils présentent les critères diagnostiques d'ICFEP entre 12 et 19 semaines. Cependant, entre 16 et 20 semaines, leur FEVG diminue, progressant ainsi vers une ICFER (81). La réalisation chirurgicale d'un rétrécissement aortique (RA) est une technique bien établie pour induire une surcharge de pression menant à une hypertrophie ventriculaire gauche chez les rongeurs. Réalisé à un âge précoce, le rétrécissement aortique entraîne une hypertrophie concentrique du VG associé à des anomalies échographiques typiques d'une dysfonction diastolique, représentant ainsi un bon modèle pour l'étude de l'ICFEP (82). Tout comme chez les rats Dahl/SS, il va cependant s'installer au fil du temps une dilatation du VG et une altération de la FEVG. L'HTA peut également être induite par administration d'angiotensine II ou l'administration, chez des souris ayant préalablement subi une néphrectomie unilatérale, d'aldostérone ou de deoxycorticostérone acétate (DOCA) et de sodium. Ces modèles sont également pertinents pour l'étude de l'ICFEP.

Depuis que les connaissances sur la physiopathologie de l'ICFEP se sont étayées et que l'obésité et le Sd Met ont été reconnu comme des FdR majeurs d'ICFEP, d'autres modèles murins ont vu le jour. Afin d'induire un Sd Met, de nombreuses approches diététiques ont été développées, comprenant l'utilisation de régime riche en fructose, riche en saccharose, riche en graisses, ou d'une combinaison de ces régimes. Les souris et les rats nourris avec ces types de régimes deviennent obèses et développent fréquemment une hypertrophie cardiaque, une fibrose myocardique et un dysfonctionnement diastolique (83). Des modèles génétiques de Sd Met ont également été utilisés, tels que les souris déficientes en leptine (ob/ob) ou les souris

déficientes en récepteurs de leptine (db/db), des rats Zucker obèse (ZF) et des rats Zucker gras diabétiques (ZDF). La leptine est une hormone sécrétée par les adipocytes matures, proportionnellement à leur taille, et absorbée dans l'hypothalamus pour diminuer l'appétit et la prise de nourriture et pour augmenter la dépense énergétique via plusieurs voies de signalisation. Les souris ob/ob et développent une obésité, une hyperinsulinémie et une hyperglycémie initialement (jusqu'à plus de 36 mois), en l'absence d'HTA et de dyslipidémie. Les souris db/db, plus utilisées, développent une obésité, une hyperglycémie et une dyslipidémie sans HTA (84). Sur le plan ultra-structurel, il a été mis en évidence chez ces souris une hypertrophie cardiomyocytaire, une fibrose interstitielle, une raréfaction capillaire et une augmentation de la proportion d'isoforme N2B de la titine, aboutissant à une dysfonction diastolique (80). Les rats ZF, qui portent une mutation faux-sens sur les 2 allèles du récepteur de la leptine (fa/fa), deviennent obèses dès 3 à 5 semaines de vie et présentent une hyperinsulinémie, une résistance à l'insuline, une intolérance au glucose légère sans diabète, une dyslipidémie et une hypertension. Les rats ZDF sont issus d'une souche de rats ZF sélectionnés pour leur taux de glucose élevé (84). Ces deux modèles développent des altérations cardiaques telles que l'hypertrophie du VG et un dysfonctionnement diastolique précoce avec une FEVG préservée. Il existe également une hypertrophie des cardiomyocytes, une raréfaction vasculaire et une fibrose (80). En 2000, le rat ZDF a été croisé avec un rat spontanément hypertendu avec IC (SHHF) pour générer le rat ZSF1. Le rat ZSF1 est caractérisé par une HTA, une obésité, une hyperlipidémie et une insulino-résistance précoce (avant 10 semaines de vie) suivi par l'apparition d'une insuffisance rénale vers 26-30 semaines de vie. Sur le plan cardiaque il présente entre autre une hypertrophie ventriculaire gauche, une dysfonction diastolique, une fibrose myocardique et une hypertrophie des cardiomyocytes et développe une ICFEP entre l'âge de 10 et 24 semaines (80). Le phénotype du rat ZSF1 est très proche de celui du patient ICFEP avec ses nombreuses comorbidités. Toutefois, si l'objectif est d'étudier l'implication de l'obésité et du Sd Met dans la physiopathologie de l'ICFEP, l'existence de ces comorbidités pourrait confondre les résultats.

Modèle	Espèce	HTA	Intolérance à l'effort	Oedeme pulmonaire	Hypertrophie VG	↓ relaxation et remplissage VG	Hypertrophie des cardiomyocytes	Fibrose myocardique	↓ densité capillaire myocardique	Inflammation myocardique
HTA et retrecissement aortique										
Dahl/SS	Rat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SHR	Rat	+	NA	NA	+	+	NA	+	NA	NA
RA	Rat et souris	+	+	+	+	+	+	+	NA	+
Métabolique										
db/db	Souris	±	+	+	+	+	+	+	+	NA
ob/ob	Souris	-	±	NA	+	+	+	+	±	NA
ZF (fa/fa)	Rat	+	NA	NA	+	+	+	+	+	NA
ZDF	Rat	+	NA	NA	+	+	+	+	+	NA
ZSF1	Rat	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Tableau 2 : Récapitulatif des principaux modèles murins d'ICFEP et leurs caractéristiques.

Le système lymphatique

Le système lymphatique forme un réseau unidirectionnel qui draine le liquide interstitiel, les lipides et autres macro-molécules de l'interstitium vers la circulation sanguine afin de maintenir l'homéostasie tissulaire. Les vaisseaux lymphatiques servent aussi à la résorption des antigènes et cellules immunitaire, assurant ainsi un rôle d'immuno-surveillance périphérique. Les vaisseaux lymphatiques sont présents dans la grande majorité des organes à l'exception de la moelle osseuse, de la cornée et du système nerveux central, à l'exception des méninges. Dans certains organes, le système lymphatique assure des fonctions spécifiques. Par exemple, dans le tube digestif les vaisseaux lymphatiques participent à l'absorption des lipides alimentaires tandis que dans l'adventice des artères ils assurent le transport reverse du cholestérol.

Le réseau lymphatique est impliqué dans de nombreuses situations pathologiques. Il régule la réponse immunitaire au cours des phénomènes inflammatoires aigus ou chroniques. En pathologie tumorale, il participe à la dissémination des cellules malignes aux ganglions lymphatiques. Enfin, l'absence ou la défaillance des vaisseaux lymphatiques aboutit à l'installation d'un lymphœdème par accumulation de lymphes dans la région concernée, entraînant une inflammation locale et des remaniements tissulaires parfois irréversibles comme l'installation d'une fibrose.

Organisation et développement

Le réseau lymphatique mature est un système borgne constitué à sa partie terminale par des capillaires lymphatiques (10-60 μm de diamètre) interconnectés qui s'abouchent à des vaisseaux pré-collecteurs puis collecteurs réalisant un système arborescent unidirectionnel pour finalement se drainer dans le système veineux sanguin au niveau de la veine sous-clavière (Figure 14). Les vaisseaux lymphatiques sont tapissés de cellules endothéliales lymphatiques (CEL). Au niveau des capillaires, les CEL adhèrent entre elles par un système de jonctions « en bouton » qui forment comme des clapets, restreignant le mouvement du liquide à un seul sens. Les CEL des capillaires reposent directement sur une membrane basale discontinue, sans couche musculaire lisse et sont rattachées à la matrice extracellulaire adjacente par des filaments d'ancrage. Ce système d'ancrage permet de maintenir les capillaires lymphatiques ouverts, même en cas de pression négative ou de compression extrinsèque par un œdème tissulaire par exemple (85,86).

La lymphe formée dans les capillaires lymphatiques à partir du liquide interstitiel est ensuite drainée dans les vaisseaux pré-collecteurs, morphologiquement proches des capillaires

lymphatiques mais possédant un système de valves endo-luminales anti-reflux similaire à ceux des veinules. Les pré-collecteurs s'abouchent ensuite dans les collecteurs lymphatiques dont les CEL, reliées par un système de jonction « zipper », forment un endothélium continu. Ils possèdent une membrane basale également continue et une couche musculaire lisse contractile. Comme au niveau des pré-collecteurs, les collecteurs lymphatiques possèdent de nombreuses valves qui assurent un flux unidirectionnel et subdivisent les collecteurs en unités structurales appelées lymphangions. La progression de la lymphe se fait grâce à des mécanismes passifs extrinsèques (contractions des muscles squelettiques, péristaltisme gastro-intestinal, mouvements respiratoires, pulsations artérielles par exemple) et actifs intrinsèques définis par la contraction rapides et forte des lymphangions initiée par les cellules musculaires lisses lymphatiques elles-mêmes (85,86).

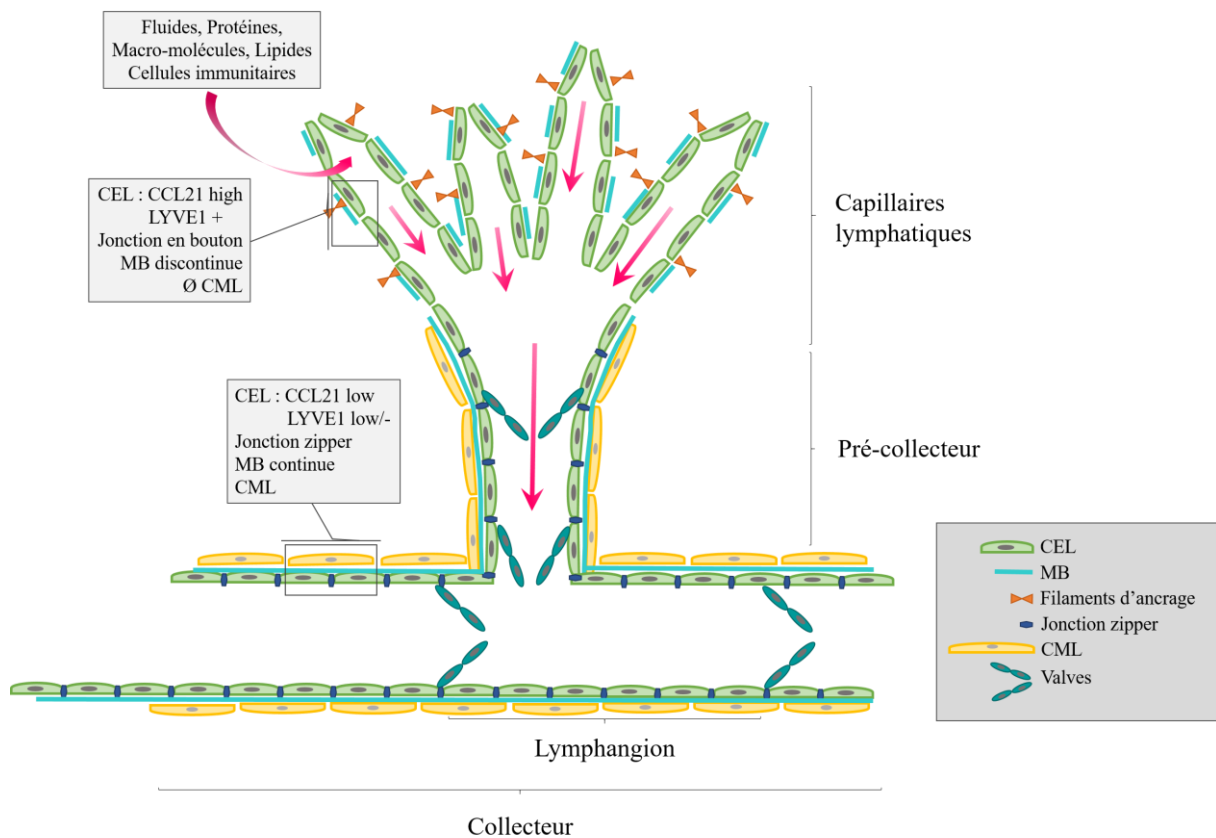


Figure 14 : Caractéristiques structurelles et moléculaires des vaisseaux lymphatiques. CEL : cellule endothéliale lymphatique ; CML : cellule musculaire lisse lymphatique ; MB : membrane basale

La mise en évidence des capillaires lymphatiques et leur distinction des capillaires sanguins sont histologiquement difficiles sur les seuls arguments morphologiques. Les principaux marqueurs utiles afin de les mettre en évidence sont la podoplanine, protéine membranaire exprimée par d'autres types cellulaires mais pas par les cellules endothéliales sanguines, le

Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor 1 (Lyve-1), récepteur à l'acide hyaluronique exprimé par les CEL des capillaires mais absents des collecteurs, et le VEGFR-3 (*vascular endothelial growth factor receptor 3*) ou encore Prox1, facteur de transcription (85–87).

Le développement du réseau lymphatique débute après que le réseau vasculaire sanguin soit mis en place, vers 6-7 semaines chez l'homme et au jour embryonnaire E9.5 chez la souris. Les CEL dérivent principalement d'une sous-population de cellules endothéliales de la veine cardinale antérieure et forment initialement des plexus lymphatiques primaires à partir desquels le système lymphatique se met en place dans les tissus avoisinants par bourgeonnements. La formation des vaisseaux collecteurs comprend le développement des valves lymphatiques intraluminales et l'acquisition de la couche musculaire lisse et de la membrane basale continue (85,86). De nombreuses voies de signalisation sont impliquées et indispensables au développement embryonnaire des lymphatiques. Les CEL doivent exprimer le facteur de transcription Prox1 pour se différencier. Chez les embryons *Prox1* déficients le bourgeonnement lymphatique s'arrête vers le jour embryonnaire E11.5, ce qui aboutit à des embryons dépourvus de système lymphatique. Les cellules endothéliales qui bourgeonnent dans les embryons *Prox1*-déficients ne co-expriment aucun marqueur lymphatique tel que le VEGFR-3 ou le LYVE-1 mais conservent un phénotype vasculaire sanguin (88). La migration et la prolifération des CEL sont dépendantes du VEGF-C (*vascular endothelial growth factor C*) et son récepteur tyrosine kinase le VEGFR-3. Alors que le VEGFR-3 est exprimé à de faibles niveaux par les cellules endothéliales sanguines lors de leur développement, *Prox1* permet le maintien d'une expression élevée de VEGFR-3 dans les CEL. La voie de signalisation VEGF-C / VEGFR-3 est nécessaire et suffisante pour stimuler la lymphangiogenèse. L'invalidation de l'un de ces composants empêche le développement d'un réseau lymphatique chez la souris (89,90). À l'âge adulte, en situation physiologique, le réseau lymphatique est quiescent et ne dépend plus de la signalisation VEGF-C / VEGFR-3.

Fonctions

La fonction principale des lymphatiques est de maintenir l'homéostasie tissulaire. Au niveau des capillaires lymphatiques les jonctions en « boutons » permettent une entrée des fluides interstitiels, des macro-molécules et des cellules immunitaires de façon passive, par gradient de pression. La lymphe ainsi formée dans les capillaires est drainée par les vaisseaux collecteurs dans le système sanguin via le canal thoracique. Au cours de ce trajet, la lymphe traverse régulièrement des ganglions lymphatiques au sein desquels elle va être concentrée par captation

d'une partie de l'eau qu'elle contient. A ce niveau le passage de la lymphe va également permettre d'assurer la surveillance immunitaire en amenant des antigènes solubles et les cellules présentatrice d'antigènes. Les CEL sécrètent des chimiokines qui attire sélectivement les cellules immunitaires qui expriment leur récepteur. Par exemple, en sécrétant les chimiokines CCL21 et le CX3CL1, les CEL vont recruter les cellules dendritiques et les lymphocytes T et B activés qui expriment respectivement le CCR7 et le CX3CR1. Une fois à l'intérieur des vaisseaux lymphatiques le transport des cellules immunitaires est également régulé par des molécules d'adhésion comme CLEVER-1 (*common lymphatic endothelial and vascular receptor-1*) qui médie la migration des lymphocytes T et B vers les ganglions lymphatiques drainants, et la sphingosine-1-phosphate (S1P) qui stimule quant à elle la sortie des lymphocytes B et T des ganglions lymphatiques *via* les vaisseaux lymphatiques efférents (86,87,91).

Les vaisseaux lymphatiques sont également essentiels à l'absorption et au transport des lipides. Les lymphatiques présents dans les villosités intestinales absorbent les lipides alimentaires sous forme de grosses particules de lipoprotéines appelées chylomicrons.

En conditions physiologiques, la néoformation des vaisseaux lymphatiques est restreinte à la grossesse. Plusieurs situations pathologiques s'accompagnent en revanche d'une néo-lymphangiogenèse comme certains états inflammatoires, la réparation tissulaire, les processus tumoraux et les transplantations d'organes.

Remodelage lymphatique et lymphangiogenèse

Les mécanismes mis en jeu lors des processus de remodelage lymphatique en situations pathologiques sont proches de ceux impliqués dans l'angiogenèse. Les CEL expriment, tout comme l'endothélium sanguin, des récepteurs aux nombreux facteurs de croissance. Le VEGFR-3, exprimé de façon spécifique par les CEL lie avec une haute affinité le VEGF-C et le VEGF-D, qui sont les principaux stimulateurs de la lymphangiogenèse.

Les VEGF-C et -D sont des dimères qui appartiennent à la même famille de facteurs de croissance que le VEGF-A, le VEGF-B, le VEGF-E et le *placental growth factor* (PIGF). Leurs récepteurs à activité tyrosine kinase, les VEGFR-1, -2 et -3, sont exprimés principalement par les cellules endothéliales. Cependant, ils ne sont pas également répartis sur les cellules endothéliales. L'expression du VEGFR-3 est largement limitée aux CEL, tandis que le VEGFR-1 est très faiblement exprimé par les CEL. Le VEGFR-2 est exprimé à la fois par les CEL et les cellules endothéliales vasculaires sanguines. Les VEGFRs sont activés par dimérisation. Les VEGFs peuvent être grossièrement classés comme pro-angiogéniques (VEGF-A, PIGF et VEGF-B) ou pro-lymphangiogéniques (VEGF-C et VEGF-D). L'interaction avec le VEGFR-1

n'est possible qu'avec les VEGFs « pro-angiogéniques », alors que seuls les membres du groupe des VEGFs « pro-lymphangiogéniques » interagissent avec le VEGFR-3. Le VEGFR2 peut être activé par des membres des deux groupes. (Figure 15)

L'activation de VEGFR-3 par le VEGF-C et le VEGF-D stimule la migration, la prolifération et la différenciation cellulaires des CEL, *via* les facteurs de transcription SOX18 et PROX1. La spécificité et l'affinité du VEGF-C et du VEGF-D pour leurs récepteurs sont régulées par des phénomènes post-traductionnels, par clivage des pro-protéines en formes clivées matures qui peuvent alors également activer le VEGFR-2 dans les CEL (85,91).

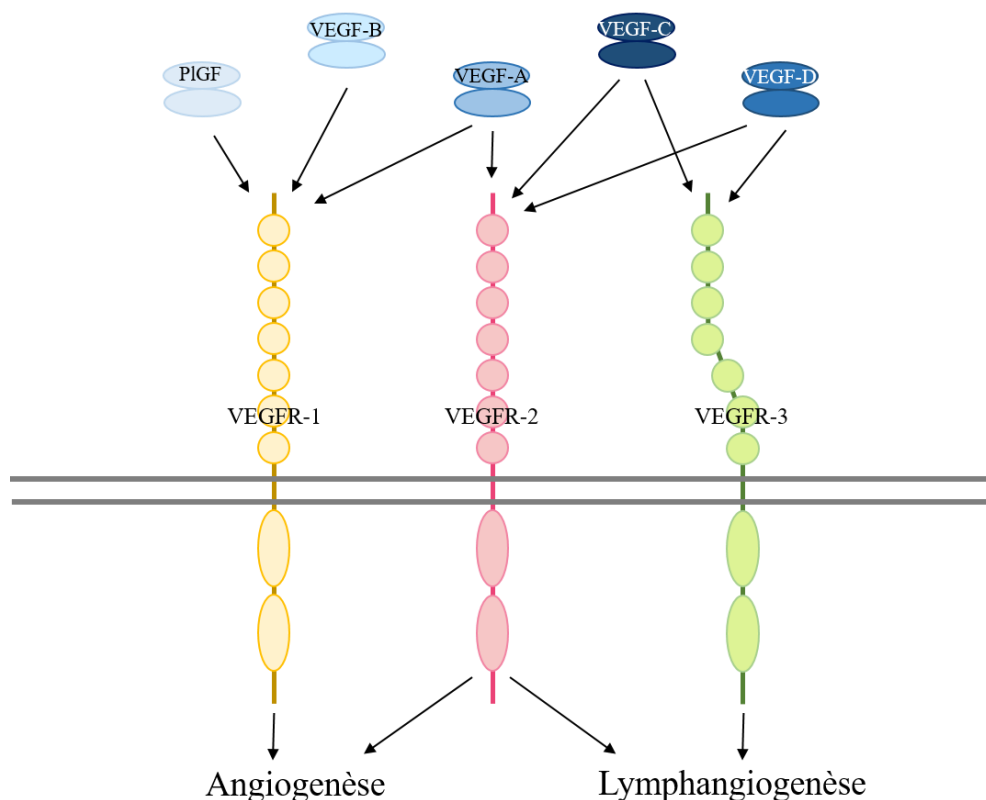


Figure 15 : Illustration schématique du système VEGF-VEGFR.

La lymphangiogenèse est activée lors des processus d'inflammation tissulaire. Les vaisseaux lymphatiques permettent le transport des antigènes solubles et des cellules présentatrices d'antigènes des tissus périphériques vers les ganglions lymphatiques afin d'initier la réponse immunitaire. Lors d'épisodes inflammatoires aigus, des cytokines pro-inflammatoires comme le $TNF\alpha$, l'interféron γ ($IFN\gamma$) et l' $IL-1\beta$, ou encore les lipopolysaccharides bactériens, induisent l'expression des VEGF-C et -D par différents types cellulaires comme les cellules immunitaires, en particulier les lymphocytes et les macrophages, via la voie de signalisation $NF-\kappa B$. La lymphangiogenèse dans les contextes inflammatoires facilite la résolution de l'œdème

tissulaire, favorise la mobilisation des cellules présentatrices d'antigènes (macrophages et cellules dendritiques) et participe à la clairance des éléments leucocytaires accumulés dans les tissus, une fois l'épisode inflammatoire résolu (86,87,91).

La lymphangiogenèse est également observée en cas de pathologie inflammatoire chronique comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), ou les pathologies rhumatismales comme le psoriasis ou la polyarthrite rhumatoïde (92). En transplantation d'organe, les cellules inflammatoires telles que les macrophages produisent des taux élevés de VEGF-C. L'activation du réseau lymphatique qui en résulte est associée à une sécrétion de CCL21 par les CEL qui participe aux phénomènes de rejet en favorisant la présentation des antigènes du donneur (allo-antigènes) par les cellules dendritiques dans les ganglions lymphatiques qui drainent le greffon. En revanche, des études ont montrés que le blocage des signaux lymphangiogéniques médiés par le VEGFR-3 permet de réduire l'expression de CCL21 et de supprimer les réponses immunitaires adaptatives dans des modèles murins de transplantation cardiaque ou pancréatiques (93,94). Sur le même principe l'administration d'anticorps monoclonaux anti-VEGFR-3 permet de diminuer l'effet *graft versus host* (GVH) et d'améliorer la survie dans un modèle murin de greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (95). Ainsi, alors que la lymphangiogenèse assure la résolution des phénomènes inflammatoires, le blocage de la lymphangiogenèse, et donc de la présentation des allo-antigènes, représentent un mécanisme anti-inflammatoire pour la prévention du rejet de greffe ou de la GVH.

Système lymphatique cardiaque

Chez l'homme, le drainage lymphatique cardiaque s'effectue de la base vers la pointe du cœur à travers 3 plexus : le plexus sub-endocardique qui se dirige vers le plexus myocardique puis le plexus épocardique. Contrairement aux vaisseaux pré-collecteurs et collecteurs des autres organes, ceux du cœur ne possède quasiment pas de couche musculaire lisse lymphatique. Le drainage lymphatique cardiaque dépend donc exclusivement de la contraction extrinsèque par les cardiomyocytes qui entourent les vaisseaux lymphatiques.

Le réseau lymphatique subendocardique est composé de capillaires ramifiés et anastomosés, situés dans le tissu conjonctif sous-endocardique. Ces capillaires sont peu nombreux mais ont la particularité de pouvoir énormément se dilater. Ils transportent la lymphe vers le plexus myocardique, composé d'un réseau dense de capillaires situés à proximité des capillaires sanguins dans le tissu interstitiel. Ces capillaires s'abouchent aux vaisseaux pré-collecteurs avant de rejoindre le plexus épocardique. Le plexus épocardique est un réseau lâche de vaisseaux

lymphatiques pré-collecteurs et collecteurs pourvus de valves. Ces vaisseaux drainent l'ensemble des fluides vers les troncs lymphatiques principaux situés à proximité des artères coronaires gauche et droite. Des vaisseaux lymphatiques sont également retrouvés à la base des valves atrio-ventriculaires (96–98).

Les lymphatiques en pathologie cardiaque

Depuis quelques années, des études ont démontré l'implication du système lymphatique dans la pathogenèse des maladies cardiovasculaires. Chez l'homme, plusieurs études cliniques à petite échelle ont révélé que les lymphatiques cardiaques se remodelent, en augmentant en densité et / ou en calibre dans diverses pathologies CV comme l'endocardite infectieuse, l'infarctus du myocarde, la maladie de Kawasaki (myocardite auto-immune) ou l'insuffisance cardiaque terminale (99–102).

L'athérosclérose augmente significativement le risque d'accident ischémique cardiaque. Dans les suites d'un infarctus du myocarde il se développe une lymphangiogenèse au sein de la région infarctée et également au pourtour, en zone non infarctée adjacente, caractérisée par une densification des capillaires lymphatiques, en particulier dans la cicatrice de l'infarctus (103–105). Cependant, parallèlement, notre équipe a observé, dans des études expérimentales, un remodelage délétère et une raréfaction des pré-collecteurs et des collecteurs dans les zones infarctées et non infarctées qui conduit, dans la phase chronique après l'épisode ischémique, à une détérioration de la capacité de transport lymphatique cardiaque et à l'installation d'un œdème tissulaire chronique (105). Récemment, notre équipe a démontré qu'une partie de ces effets délétères sur le réseau lymphatique sont médiés par les lymphocytes T infiltrant le cœur. (106). Similairement, une autre équipe a démontré que les macrophages sont impliqués dans le remodelage lymphatique contribuant à la réduction du transport lymphatique, dans un modèle de surcharge de pression chez la souris (107).

D'autre part, des études cliniques et expérimentales ont suggéré un rôle de la lymphangiogenèse dans l'athérosclérose. L'athérosclérose correspond à l'accumulation, au sein de l'intima des artères de gros et moyens calibres, de lipide, en particulier de cholestérol. Ces dépôts vont induire une réaction inflammatoire par recrutement principalement de macrophages qui vont se charger de lipides (macrophages spumeux) et conduire à la formation d'une coque fibreuse. Des cellules musculaires lisses de la média migrent également vers l'intima et se multiplient autour de la plaque athéromateuse ainsi formée conduisant à la réduction progressive du calibre de la lumière artérielle. Les lymphatiques sont retrouvés à l'état physiologique au niveau de l'adventice des artères (couche externe « nourricière »). Leur nombre est augmenté en regard

des lésions athéromateuses (108). D'autres études ont également montrée l'existence, bien que en nombre réduit, de lymphatique dans la média et l'intima, au pourtour des plaques athéromateuses (98,99,109).

Les lymphatiques assurent le transport retour du cholestérol des tissus vers le foie où il sera excrété dans la bile. Le cholestérol intracellulaire est capté par les particules de HDL (*high density lipoprotein*) dans l'espace interstitiel. Le cholestérol extracellulaire est ensuite capté par le système lymphatique via des transporteurs spécifiques comme SR-BI, avant de retourner dans la circulation sanguine. Ainsi l'altération par des procédés chirurgicaux des vaisseaux lymphatiques réduit le transport retour du cholestérol dans la zone drainée. A l'inverse, l'induction de la lymphangiogenèse par l'administration de VEGF-C améliore la fonction lymphatique et le transport retour du cholestérol dans un modèle de souris hypercholestérolémiques ApoE déficientes (87). En plus de son rôle dans l'élimination du cholestérol, le système lymphatique permet de limiter l'inflammation au sein des plaques athéromateuses en drainant les cellules inflammatoires. En outre, la sécrétion de chimiokines telles que l'IL1 β par les cellules inflammatoires présentes dans les plaques d'athérome stimule la lymphangiogenèse (108). Ceci suggère un rôle bénéfique des lymphatiques dans la limitation de l'accumulation de cholestérol et de l'inflammation chronique associées aux lésions athéromateuses. De façon semblable, plusieurs études ont démontré que l'administration d'un traitement pro-lymphangiogénique cardiaque après l'infarctus du myocarde améliore la fonction cardiaque. Il a ainsi été montré que l'administration d'une protéine recombinante VEGF-C_{156S} spécifique du VEGFR-3 chez le rat ou la souris stimule la lymphangiogenèse et limite le remodelage des vaisseaux pré-collecteurs, permettant de diminuer l'œdème, l'inflammation, la fibrose et d'améliorer la fonction cardiaque (104–106). L'effet de la stimulation de la lymphangiogenèse sur la réduction de l'inflammation locale en post-infarctus a été confirmé par l'étude de Vieira *et coll* (110). Parallèlement, le blocage de la signalisation VEGFR-3 entraîne des modifications dans la structure du réseau lymphatique cardiaque et entraîne une mortalité accrue après infarctus myocardique (111).

Lymphatiques et Sd Met

Etant donné la prévalence de l'inflammation cardiaque dans les pathologies CV, y compris dans l'ICFEP, des investigations complémentaires sont nécessaires pour déterminer le rôle des lymphatiques cardiaques dans sa physiopathologie.

Comme mentionné plus haut, l'obésité et le Sd Met sont deux principaux FdR d'ICFEP. Plusieurs études ont démontré un lien étroit entre l'obésité et / ou le Sd Met et le système

lymphatique. Les souris *prox1* haplo déficientes présentent des vaisseaux lymphatiques dysfonctionnels, perméables, et ont une tendance à l'obésité à l'âge adulte en raison d'une fuite de lymphes (112). Chez les souris ApoE déficientes, hypercholestérolémiques, il a été retrouvé des altérations structurelle et fonctionnelle du réseau lymphatique conduisant à un défaut de transport des cellules dendritiques et des fluides (113). Dans des modèles de souris obèses, induit par un régime riche en graisses, il a également été décrit une altération de la fonction lymphatique, caractérisée par une diminution de la fréquence de contraction des collecteurs lymphatiques, une augmentation de la perméabilité lymphatique et une altération du transport lymphatique associée à une diminution de la clairance des macro-molécules et une accumulation de lipides dans les tissus périphériques (114–118). Les CEL isolées de ces souris obèses présentent également une expression réduite de VEGFR-3 et Prox1 (114,119).

Ces altérations sont associées à une diminution de transport des cellules dendritiques des tissus vers les ganglions lymphatiques régionaux et à une accumulation péri-lymphatiques d'éléments inflammatoires tels que des lymphocytes T CD4⁺ ou des macrophages (117–119). Réciproquement, plusieurs données suggèrent que cette inflammation péri-lymphatique joue également un rôle dans le développement et le maintien de la dysfonction lymphatique induite par l'obésité. Ainsi, les souris déficientes en lymphocytes T CD4⁺, les souris *nude* (athymiques, déficientes en lymphocytes T) ou les souris Rag-1 (déficientes en lymphocytes T et B) ont, après un régime riche en graisse prolongé, une fonction lymphatique améliorée par rapport aux souris témoins de type sauvage nourris de manière similaire (117,118). Les cellules inflammatoires sont une source majeure de cytokines et peuvent donc avoir des effets importants sur les CEL. Les lymphocytes T par exemple sécrètent des cytokines anti-lymphangiogéniques comme l'IFN γ , l'IL-4 ou le TGF β (120–122). La contraction intrinsèque des lymphatiques est régulée par des gradients de NO qui, dans des circonstances physiologiques, est induit par l'expression de la synthase endothéliale de l'oxyde nitrique (eNOS) par les CEL (115,123). En revanche, les macrophages pro-inflammatoires, classiques, expriment fortement l'*inducible nitric oxide synthase* (iNOS) ce qui entraîne en condition inflammatoire une augmentation de la concentration et une perte du gradient de NO autour des lymphatiques collecteurs et diminue la fréquence et l'amplitude des contractions lymphatiques (118,124–126). L'inhibition *in vivo* d'iNOS chez les souris obèses améliore le drainage lymphatique et la fonction lymphatique globale (118). Parallèlement l'obésité et le Sd Met sont associés à une augmentation de l'expression du VEGF-C (127), qui est hautement chimiotactique pour les macrophages. Une étude intéressante a démontré que le blocage

systemique du VEGF-C diminue l'infiltration de macrophages pro-inflammatoires dans les tissus adipeux sous-cutanés et prévient le développement de la résistance à l'insuline (128). L'obésité est également associée à une augmentation des taux d'acide gras libres dans les tissus. En plus de leur rôle dans la résistance à l'insuline et l'inflammation tissulaire, les acides gras libres semblent directement altérer l'endothélium lymphatique. L'acide oléique par exemple est responsable d'une hyperperméabilité des CEL *in vitro*, tandis que l'acide stéarique, même à de faibles concentrations, provoque sur les CEL en culture une augmentation dose-dépendante de l'apoptose, une diminution de la prolifération et une régulation à la baisse de l'expression du PROX1 et du VEGFR-3 (114,115).

Objectif de la thèse

Dans cette étude, l'objectif était d'examiner les liens entre l'hypertrophie cardiaque, l'inflammation, les vaisseaux lymphatiques et la dysfonction diastolique induite par le Sd Met, en nous concentrant sur les mécanismes spécifiques au sexe contribuant à l'apparition d'une cardiopathie métabolique. Nous avons émis l'hypothèse qu'une dysfonction ou un remodelage lymphatique au niveau cardiaque pourrait contribuer à aggraver l'inflammation et la dysfonction cardiaque lors du Sd Met et contribuer au développement d'ICFEP.

Afin de tester cette hypothèse nous avons, pendant ce travail de thèse, examiné les mécanismes impliqués lors de la phase précoce de l'ICFEP, i.e. pendant le développement de la dysfonction diastolique chez des rats génétiquement obèses *fa/fa*, mâles et femelles, avec ou sans ovariectomie afin de modéliser la ménopause.

Matériel et méthodes

Modèles animaux

L'ensemble des études a été réalisée sur des rats Zucker *fa/fa* (ZF) mâles ou femelles et leurs contrôles non obèses, les rats *Lean Fa/fa* (*Lean*), âgés en début de protocole de 8 semaines (Laboratoire Charles River, France). Les rats femelles ont été pour certaines ovariectomisées (ovx) par chirurgie mini-invasive. Les ovariectomies ont été réalisées sous anesthésie générale à 6-7 semaines. Au total, 75 rats *fa/fa* et 56 rats contrôles ont été inclus dans l'étude.

Les expérimentations animales réalisées dans cette étude ont été soumises au comité régional d'éthique de Normandie conformément à la législation européenne et française (CENOMEXA n°54 #05 231.01 et APAFIS #21430-2019071015049227 v2)

Paramètres étudiés

Paramètres métaboliques

Composition corporelle

L'analyse de la composition corporelle a été réalisée sur animal vigile à 14 et 24 semaines par technique de résonance magnétique nucléaire avec l'échoMRI EMR.185 (EchoMRI, Houston, Texas) au sein du laboratoire Inserm 1073 du Dr. M. Coeffier. Les résultats sont donnés en pourcentage de masse grasseuse et de masse maigre.

Dosages plasmatiques

A la fin des protocoles d'étude, du sang a été prélevé, dans des tubes EDTA ou héparinés, sur des animaux à jeun. Des dosages de créatinine, cholestérol, HDL, LDL, triglycérides, glycémie et lipémie ont été réalisés à partir du plasma récupéré après centrifugation des échantillons de sang. Ces différents dosages ont été réalisés au sein du laboratoire de biochimie du Dr V. Brunel du CHU de Rouen.

Test de tolérance au glucose et test de résistance à l'insuline

Des tests de tolérance au glucose ont été réalisés sur les rats mâles et femelles ovx à 15 et 24 semaines. Les animaux ont été mis à jeun la veille puis ont reçu par gavage du glucose concentré à 2g/kg. La glycémie a été mesurée sur bandelette à partir de gouttelettes de sang prélevées au bout de la queue avant le gavage puis après 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes.

De la même façon, des tests de tolérance à l'insuline ont été réalisés sur des rats à jeun, par mesure de la glycémie après injection intra-péritonéale d'insuline rapide (Actrapid, 1 U/kg).

Paramètres morphométriques

Les animaux ont été pesés chaque semaine. A la fin de chaque protocole les cœurs (entier et ventricules droit et gauche séparément), reins, poumons et foies des différents animaux ont été pesés. Les tibias ont été mesurés afin de pouvoir rapporter ces différentes données à la taille des animaux. Les utérus des femelles ovariectomisées ont également été pesés afin de s'assurer de la réussite de l'ovariectomie.

Paramètres cardiaques et vasculaires

Test de tolérance à l'effort

Un test à l'effort a été réalisé sur les animaux des différentes études à 24 semaines. Après une phase d'accoutumance la veille du test, les rats ont été placés sur le tapis de course (Bioseb, Paris, France) à une vitesse initiale de 2,4 m/min et une pente de 5°. La vitesse augmentait de 2,4 m/min toute les minutes jusqu'à atteindre une vitesse de 14,4 m/min. Les rats étaient considérés comme fatigués lorsqu'ils commençaient à abaisser leurs arrière-trains et à relever leurs museaux, entraînant une modification significative de leurs démarches et une incapacité à rester sur le tapis roulant. Lorsque ce degré de fatigue a été noté, l'animal été retiré du tapis roulant et le temps de course total été enregistré.

Echographie

Des échographies et dopplers cardiaques ont été réalisés, sur les rats mâles et femelles ovx, à 14 et 24 semaines à l'aide d'un échographe Vivid7 Ultrasound (General Electric Healthcare), équipé d'une sonde linéaire de 14MHz (sonde M12L) et d'un système d'analyse Echopac, PC. Les animaux ont été préalablement anesthésiés par injection intra-péritonéale de Nesdonal 60mg/kg. Les dimensions du VG (épaisseur des parois antérieure et postérieure et diamètre de la cavité ventriculaire) ont été déterminées à partir de coupes para-sternale petit axe passant par les muscles papillaires du VG, en télésystole (TS) et en télédiastole (TD). La fraction de raccourcissement (FR) du VG a été calculée selon la formule :

$$FR (\%) = \frac{\text{diamètre TD} - \text{diamètre TS}}{\text{diamètre TD}} * 100$$

La fréquence cardiaque et l'intégrale temps vitesse (ITV), témoin du flux sanguin sortant du VG vers l'aorte, ont été mesurées en mode Doppler a partir de plans de coupe longitudinaux

passant par l'aorte thoracique. Le volume d'éjection systolique (VES) a été calculé selon la formule :

$$VES (ml) = ITV * \pi * \frac{\text{diamètre aorte}^2}{4}$$

Le débit cardiaque, donné en ml/min, est estimé en multipliant le VES par la fréquence cardiaque.

IRM

Des IRM cardiaques (Biospec 4.7 Tesla; Bruker France, Wissembourg, France) ont été réalisées à 24 semaines afin d'évaluer la réserve coronaire (différence entre la perfusion cardiaque basale et la capacité maximale de perfusion cardiaque) et les volumes ventriculaires, selon un protocole déjà réalisé dans plusieurs autres études de notre équipe (105,129).

Hémodynamique ventriculaire

Après 24 semaines, à la fin du protocole des analyses hémodynamiques ont été réalisées sur des animaux préalablement anesthésiés avec sodium methohexital, 60 mg/kg, administré en intrapéritonéal. Un micro-nanomètre a été introduit jusque dans le VG via l'artère carotide. La fréquence cardiaque et les pressions artérielles systolique et diastolique ont été mesurées au niveau de l'artère carotide. Dans le VG, les courbes de relation pression-volume ont été enregistrées en télésystole et en télédiastole sur plusieurs cycles cardiaques, après clampage de l'aorte abdominale afin d'augmenter la post charge. Elles ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel d'acquisition et d'analyse de données de conductance Millar LabChart (AD-Instruments, New-Zealand) afin de calculer les pressions intra-ventriculaires en fin de systole et en fin de diastole, les relation pression / volume en fin de systole et en fin de diastole, et la constante de relaxation isovolumique (τ).

Fonction coronaire

La fonction coronaire a été analysée en utilisant le myographe de Mulvany (Dual Myograph 410A, DMT, Aarhus, Danemark). Un segment d'artère coronaire septale (190 à 280 μm de diamètre) a été isolé sous loupe binoculaire directement après le sacrifice puis monté, dans la cuve du myographe, sur 2 fils de tungstène de 25 μm de diamètre chacun. Un des fils a été fixé à un support relié à une vis micrométrique permettant de faire varier la tension en étirant l'artère. L'autre fil a été fixé sur un transducteur afin de déterminer les variations de tension isométrique du muscle lisse vasculaire, indépendante de la longueur des cellules musculaires. Afin d'évaluer la réactivité vasculaire, l'artère a été pré-contracté par l'ajout de sérotonine 10^{-5} M. La

relaxation dépendante de l'endothélium a été mesurée en ajoutant des concentrations croissantes d'acétylcholine ($[ACh] = 10^{-9}$ à 3.10^{-5} M) et en établissant une courbe $[ACh] -$ force exercée sur le fil par l'artère. Après rinçage et mise au repos, l'artère a été incubée avec du N ω -nitro-L-arginine (L-NNA) 10^{-4} mM, un inhibiteur non spécifique des NOS puis de nouveau soumise à des concentrations croissantes d'ACh afin d'évaluer la part de la relaxation endothélium-dépendante, dépendante du NO. Enfin, toujours après rinçage et mise au repos, la relaxation indépendante de l'endothélium a été évaluée en ajoutant des concentrations croissantes de Nitroprussiate de Sodium (NPS), un donneur de NO ($[NPS] = 10^{-9}$ à 3.10^{-5} M).

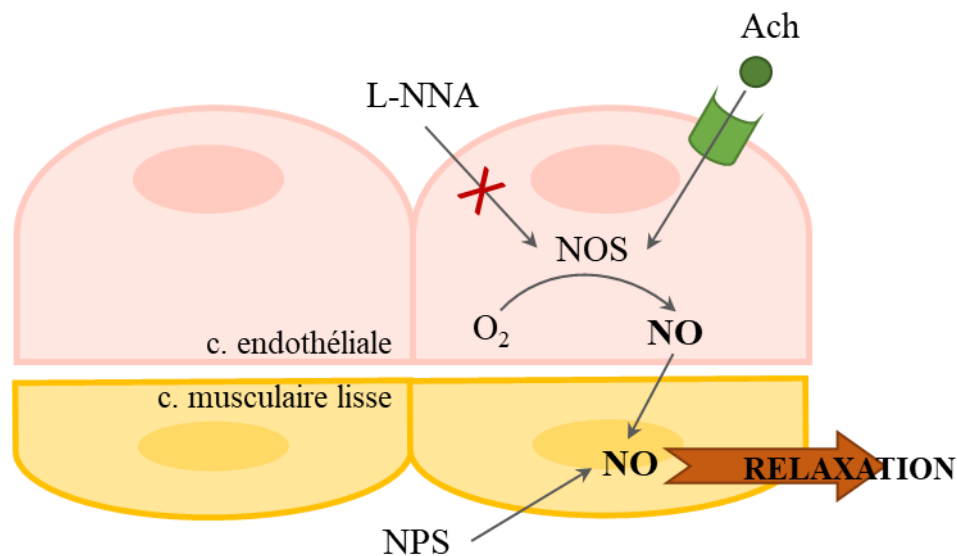


Figure 16 : Principe physiologique du myographe de Mulvany

Etude de la perméabilité vasculaire

Afin d'évaluer l'œdème tissulaire, la quantité d'eau dans le foie, les reins, les poumons et le cœur a été calculée en faisant le rapport entre le poids de ces différents organes après le sacrifice et après séchage pendant 5j à 65°C .

120 min avant le sacrifice, du bleu d'Evans a également été injecté en intra-veineux à certains animaux. Le bleu d'Evans est un colorant qui se lie à albumine. En conditions physiologiques le bleu d'Evans reste ainsi dans le compartiment vasculaire. En cas d'hyperperméabilité vasculaire l'endothélium devient perméable à de petites protéines comme l'albumine aboutissant à l'extravasation de bleu d'Evans dans les tissus. Le niveau de perméabilité vasculaire peut donc être estimé par mesure quantitative du colorant dans les tissus. La concentration plasmatique en bleu d'Evans a été mesurée à partir des prélèvements de sang récolté après le sacrifice. Des échantillons tissulaires des organes d'intérêt ont été broyés avec un pilon en verre et placés dans

des tubes Eppendorf. Le Bleu d'Evans a été extrait par incubation dans le formamide (7 µL/mg de tissu sec) pendant 12 h à 67 °C dans l'obscurité et ultracentrifugation (8000 G, 10 min) pour éliminer les débris. La quantité de Bleu d'Evans a ensuite été dosée par spectrométrie (620 nm) et réalisation d'une courbe d'étalonnage. Les résultats sont donnés en ng de bleu d'Evans par mg de tissu.

Analyses histologiques

A la fin de chaque étude, le VG a été congelé dans l'azote liquide et stocké à -80°C. Des coupes à 8µm ont été réalisées au cryostat et de nouveau stockées à -80°C. A partir de ces coupes en congélation, et après fixation, des colorations par l'HES ont été réalisées afin d'apprécier la morphologie générale du myocarde. Une coloration par le rouge Sirius, colorant de façon spécifique les collagènes I et III en rouge, a également été réalisée dans le but d'étudier la fibrose myocardique et péri-vasculaire. Les lames ainsi colorées ont été photographiées au grossissement x 200 avec un microscope optique (Zeiss) et un logiciel d'acquisition (AxioVision). Les images obtenues ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel Image J et la densité en collagène pour chaque photo a été évaluée selon la formule :

$$Fibrose (\%) = \frac{\text{nombre de pixels rouges}}{\text{nombre de pixels total}} * 100$$

La fibrose péri-vasculaire a été estimée, également à partir de photos prises au grossissement x 400 ou x 200 selon la taille de la section vasculaire, en sélectionnant manuellement, à l'aide du logiciel Image J, la surface occupée par du collagène au pourtour des lumières des artères de petits et moyens calibres (5 à 50 µm de diamètre). Elle a été exprimée en µm².

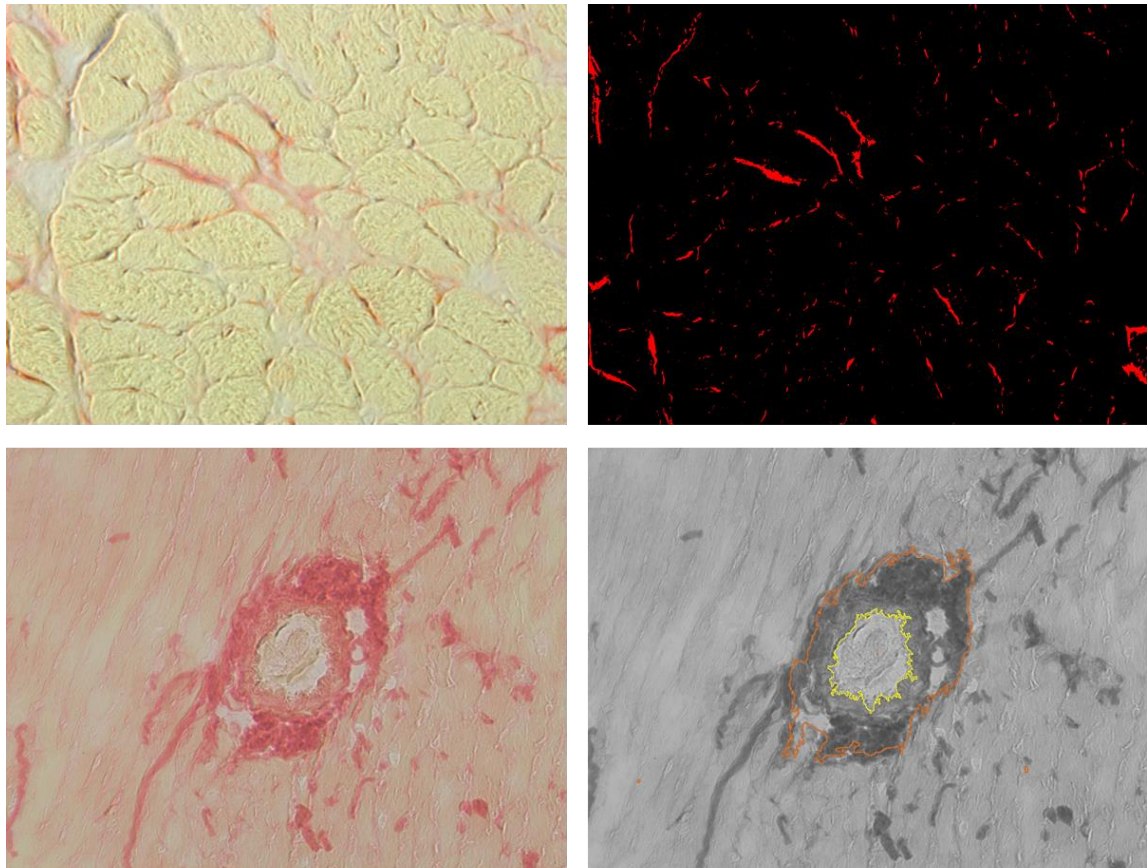


Figure 17 : Méthode d'analyse de la fibrose myocardique et péri-vasculaire à partir de lames colorées au rouge Sirius.

Pour les immunomarquages, les coupes des VG réalisées et collectées sur des lames de verre SuperFrost plus ont été décongelées puis fixées dans l'acétone pendant 10 min. Les sites de liaison non spécifiques ont été bloqués par incubation dans du BSA 3%, suivis du kit de blocage Biotine-Avidine (Thermo Scientific). Les anticorps (Ac) primaires (Tableau 3), dilués selon les recommandations dans du tampon de blocage, ont été incubés pendant 1h sur les coupes à température ambiante. Les lames ont ensuite été lavées dans du PBS. Les Ac secondaires (Tableau 4) ont été incubés pendant 30 minutes. Des colorations doubles ou triples ont été effectuées de manière séquentielle, et les contrôles négatifs ont été effectués. Les lames ont été montées dans du Vectashield contenant du DAPI, et les images ont été acquises sur un microscope à épifluorescence Zeiss (AxioImager J1) équipé d'un apotome et du logiciel Zen 2012 (Zeiss). Les images ont été analysées à l'aveugle à l'aide du logiciel ImageJ (NIH).

Un marquage par le WGA (agglutinine de germe de blé), qui se lie aux glycoprotéines des membranes cellulaires, a permis de déterminer la taille des cardiomyocytes sur des coupes de section transversale. La densité en capillaires sanguins ainsi que le rapport du nombre de capillaires sur le nombre de cardiomyocytes ont été évalués sur des sections doublement

colorées pour CD31 et WGA. Le réseau lymphatique (Lyve1+ / CD68-) a également été évalué dans les zones sous épocardiques du VG. En raison de l'absence de marqueurs permettant de distinguer les pré-collecteurs des capillaires lymphatiques chez le rat, nous nous sommes basé sur le fait que les vaisseaux pré-collecteurs fonctionnent préférentiellement de la base à l'apex, contrairement aux capillaires lymphatiques qui sont répartis de façon plus anarchique. Par conséquent, ayant réalisé des plans de coupe horizontale du VG, les vaisseaux pré-collecteurs apparaissent plus fréquemment perpendiculaires à la tranche de section et présentent donc une lumière ouverte. La taille des lumières lymphatiques et la densité de vaisseaux lymphatiques ouverts (diamètre >5µm), correspondant à une population enrichie en vaisseaux pré-collecteurs, ont été appréciées en prenant entre 10 et 20 images de la paroi libre du VG de chaque rat. Le paramètre % de surface lymphatique ouverte a été calculé comme la somme totale de tous les diamètres lymphatiques mesurés divisée par la surface cardiaque totale analysée pour chaque cœur de souris.

Les macrophages cardiaques ont été identifiés par un marquage avec l'Ac anti-CD68. Parmi cela, les macrophages alternatifs ont été définis comme co-exprimant le CD206 et les macrophages classiques comme CD206 négatifs. Les cellules T totales ont été définies comme des cellules CD3 positives, divisées en cellules CD8a positives ou CD4 positives.

Afin d'obtenir une vision plus globale des réseaux vasculaires lymphatique et sanguin, des images en feuille de lumière sur des colorations « *whole mount* » ont été réalisées. Des rats anesthésiés ont été perfusés avec du sérum physiologique chaud, suivie d'une fixation par perfusion de paraformaldéhyde (PFA) chaud à 3 %. Les cœurs ont été retirés et fixés de nouveau dans du PFA 3% pendant 7h. Après déshydratation dans des bains de méthanol et incubation dans le fixateur de Dent, les échantillons ont été blanchis dans des bains de H₂O₂. Après un blocage étendu des sites de liaison non spécifique et une perméation tissulaire au Triton-X100, les lymphatiques cardiaques ont été révélés en utilisant des Ac anti-Lyve1 et anti-podoplanine, suivi d'Ac secondaires couplés à des fluorochromes (respectivement âne anti-lapin conjugué avec du Cy5 et âne anti-souris conjugué avec du Cy3). Les artérioles ont été révélées à l'aide d'Ac anti- α SMA (monoclonal de souris, Sigma-Aldrich, #C6198, 1/300). Les cœurs ont été clarifiés à l'aide d'un protocole iDISCO+ modifié basé sur une incubation dans des bains de méthanol gradués suivie d'une incubation dans du dichlorométhane (DCM, Sigma-Aldrich, #270997-12X100ML) et de l'éther dibenzyle (DBE, Sigma-Aldrich, #108014-1KG) avant l'imagerie par feuille de lumière (ultramicroscope II, LaVision BioTec) et par la microscopie confocale à balayage laser (Leica SP8) équipé de plusieurs lignes laser (561 ou 640 nm). Des reconstructions 3D ont été réalisées à partir du logiciel IMARIS.

Antigène	Fournisseur	Référence	Espèce réactive	Espèce source	Dilution
AML-FITC	Sigma Aldrich	F3777	souris	souris	1/200
CD31	BD	555026	rat	souris	1/100
CD68	Biorad	MCA341R	rat	souris	1/400
Lyve-1	Reliatech	103-PA50	souris	lapin	1/1000
Lyve-1 b	Reliatech	103-PA50bi	souris	lapin	1/500
CD206	Invitrogen	PA546994	rat	chèvre	1/1500
Podoplanine	Reliatech	104-m40	rat	souris	1/500
WGA	Interchim	FP-CE80700	-	-	1/100

Tableau 3 : Liste des anticorps primaires utilisés pour les analyses en immunohistochimie

Antigène	Fluorochrome	Fournisseur	Référence
Âne anti-lapin	Cy3	Jackson	711-165-152
Âne anti-lapin	AF647 (Cy5)	Jackson	711-605-152
Âne anti-chèvre	Dylight 488	Interchim	A50-201D2
Âne anti-chèvre	Dylight 550	Interchim	A50-201D3
Âne anti-chèvre biot.	-	Jackson	705-065-147
Âne anti-souris	AF488	Jackson	715-545-151
Streptavidine	Fluoprobe 547 (Cy3)	Interchim	FP-CA5570
Streptavidine	Fluoprobe 647 (Cy5)	Interchim	FP-CA5640

Tableau 4 : Liste des anticorps secondaires et fluorochromes utilisés pour les analyses en immunohistochimie

Afin d'évaluer une éventuelle atteinte rénale chez les rats obèses, une analyse histologique des reins a été réalisée après coloration par le trichrome bleu ou vert. Ont ainsi été scorés, de 0 à 4, les lésions d'endartérite fibreuse, l'atrophie tubulaire, la fibrose interstitielle, l'inflammation parenchymateuse et les dépôts lipidiques tubulaires intra-cytoplasmiques.

Cytométrie en flux

Des analyses quantitative et qualitative de l'inflammation cardiaque ont été réalisées par cytométrie en flux à 14 ou 24 semaines. Après une anesthésie profonde au thiopental sodique 100 mg/kg en intra-péritonéal et dissection du thorax, l'oreillette droite a été sectionnée puis le cœur a été rincé par perfusion intra-cardiaque de 20 ml de sérum physiologique à 37°C. L'apex du VG a été prélevé, émincé au scalpel et mis dans un tube pour GentleMACS (MACS ; Miltenyi Biotec, Auburn, CA) avec 5 ml de solution de digestion (collagenase type XI, 125 U/ml, Sigma,

#C7657 ; collagenase type I, 450 U/ml, Sigma, #C0130 ; hyaluronidase type I, 60 U/ml, Sigma, #H3506 ; DNase 1, 60 U/ml, Sigma, #DN25). Le tissu cardiaque a ensuite été mis dans le GentleMACS pour être digéré (programmes pré-enregistrés *heart 01* : 514 rpm x 15sec puis *SMDK-1* : 12 rpm x 30 min à 37 °C). Après digestion, le tissu a été filtré à 70µm puis 40µm avec du milieu de FACS (RPMI ; BSA 0,2 % ; EDTA-Na₂ 3mM). La solution a ensuite été centrifugée (1500 rpm x 10min) et le surnageant a été éliminé. Le culot a été re-suspendu dans 50 ml de milieu de FACS. Cette étape de centrifugation – re-suspension a été recommencée 2 fois. La quantité de cellules a été établie sur une cellule de Malassez. Environ 1.10⁶ cellules ont été déposées dans un tube FACS dans 200µl de tampon FACS (PBS-Hépès-MgCl₂*6H₂O-CaCl₂*2H₂O ; BSA 0,2 % ; EDTA-Na₂ 3mM) puis 1µl d'Ac anti-CD32 (Fc Block) a été ajouté puis incubé pendant 15 minutes à 4°C. Les Ac d'intérêt et le Live/Dead, couplés à différents fluorochromes, ont ensuite été ajoutés aux dilutions recommandées. Après 20 minutes d'incubation à 4°C, les cellules ont été lavées avec du tampon FACS, fixées avec 400µL de para-formaldéhyde 0,5% dilué dans du PBS puis de nouveau lavées. Après une dernière centrifugation (1500 rpm x 5min) et élimination du surnageant, le culot cellulaire a été re-suspendu dans 600µL de tampon FACS et passé au cytomètre (LSRFortessa, BD Biosciences). Les monocytes ont été définis comme des cellules vivantes CD45⁺/CD172⁺/CD11b⁺/MHCII^{low}/SSC^{low}, parmi lesquels les monocytes M1 définis comme His48⁺/CD43⁻ et les monocytes M2 comme His48⁻/CD43⁺. Les lymphocytes T ont été identifiés comme étant des cellules vivantes CD45⁺/CD172⁻/CD3⁺. Les lymphocytes B ont été identifiés comme des cellules vivantes CD45⁺/B220⁺. Afin d'effectuer une analyse quantitative de l'inflammation, des billes *True-Count* (BD) ont été rajoutées dans les tubes avant de passer dans le cytomètre. Les résultats sont donnés en cellules / mg de tissu cardiaque.

Les résultats obtenus ont ensuite été analysés à l'aide du logiciel FlowJo (TreeStar, Inc, San Carlos, CA) (Figure 18).

Ac	Clone	Fluorochrome	Fournisseur	Reference	$\mu\text{l} / 10^6$ cellules
Live and Dead	-	eFluor 455UV	eBioscience	65-0863-14	1
CD32 (Fc Block)	-	-	BD	550271	-
Panel 1					
CD45	OX1	AF700	Sonybiotech	1611090	0,2
CD3	REA223	VioGreen	Mytenyi Biotec	130-102-676	0,6
CD4	W3/25	APC Cy7	Sonybiotech	1607590	0,5
CD8	OX8	PerCP-eFluor710	eBioscience	46-0084-82	0,25
B220	HIS24	PE-Cy7	eBioscience	25-0460-82	0,25
CD172a	OX41	APC	eBioscience	17-1720-82	0,5
Panel 2					
CD45	OX1	AF700	Sonybiotech	1611090	0,2
CD43	W3/13	PE	Sonybiotech	1614060	0,2
His48	HIS48	FITC	eBioscience	11-0570-82	0,2
CD172a	OX41	APC	eBioscience	17-1720-82	0,5
MHC II	OX17	PerCP-eFluor710	eBioscience	46-0463-82	0,5
CD11b/c	OX42	BV605	BD	743979	0,5

Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés dans 2 panels distincts permettant d'étudier la population lymphocytaire (panel 1) et la population monocyttaire (panel 2)

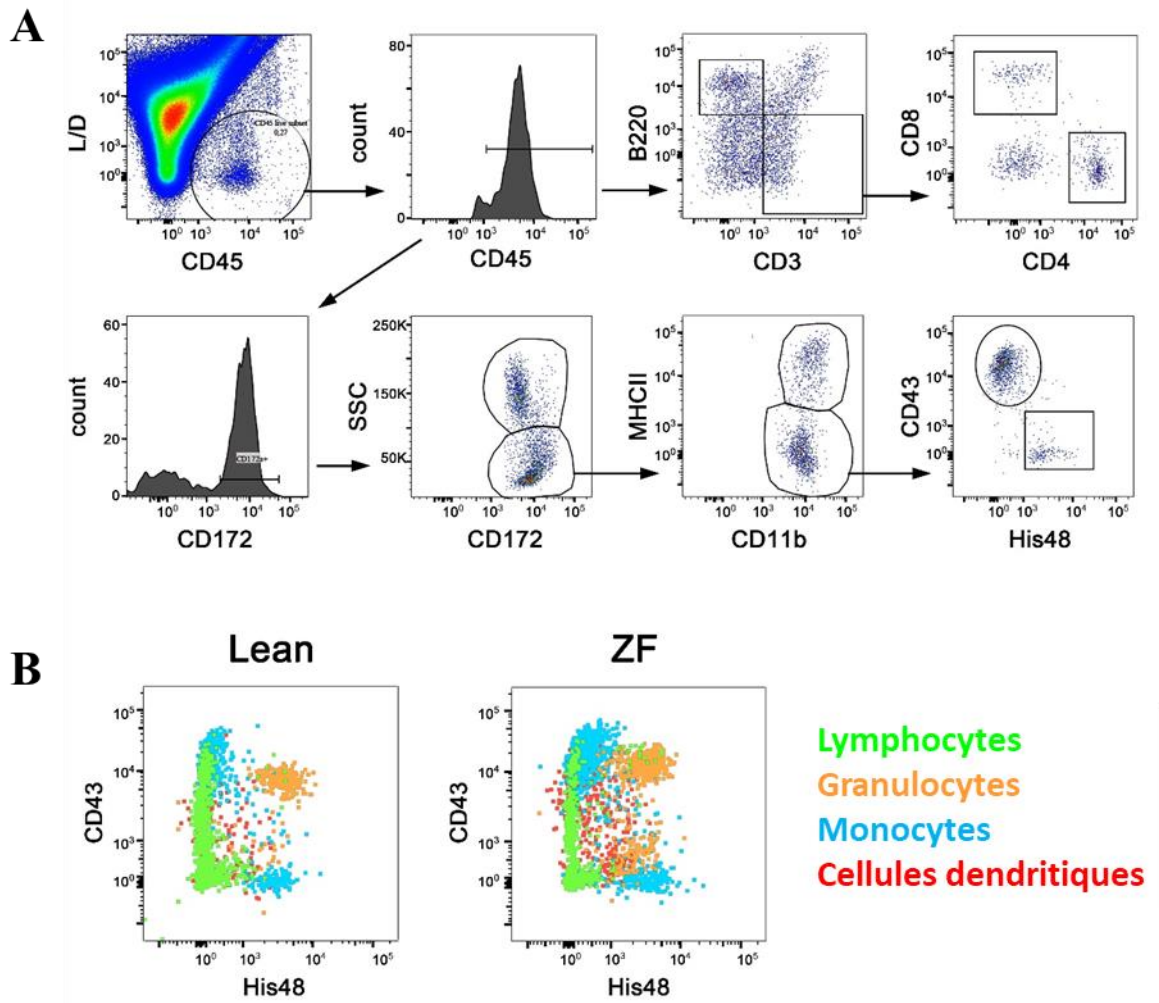


Figure 18 : Évaluation par cytométrie en flux de l'inflammation cardiaque. Exemples de stratégies de gating (A) et d'identification des différentes sous-populations de leucocytes CD45⁺ cardiaques chez les femelles ovx. (B) : les lymphocytes (verts) ont été définies comme des cellules B B220⁺ et des cellules T CD3⁺/CD4⁺ ou CD3⁺/CD8⁺, les sous-populations de cellules myéloïdes, parmi les cellules CD172⁺/CD11b⁺ totales, ont été définies comme SSChigh pour les granulocytes (orange), MHCIIhigh pour les cellules dendritiques (rouge) et les monocytes séparés en CD43⁺ ou His48⁺ parmi les cellules SSClow/MHCIIlow (bleu). L/D = Live/Dead.

Evaluation de l'expression génique

Des études d'expression géniques par RTqPCR ont également été réalisées des fragments de VG, préalablement broyés à l'aide du Precellys 24 dans un tube à billes avec 1 ml de trizol. Les broyats obtenus sont incubés avec 0,1 ml de chloroforme à température ambiante pendant 2 minutes puis centrifugés à 12000 G pendant 15 min à 4°C. Les surnageants sont ensuite incubés 10 minutes avec un tant pour tant d'isopropanol. Les culots d'ARN sont obtenus après centrifugation (12000 G x 15 min, 4°C) et lavés avec 0,5 ml d'éthanol 75%. Après une dernière centrifugation à 7500 G pendant 5 min à 4°C, les surnageants sont éliminés et les culots d'ARN

sont séchés à l'air libre pendant 5 à 10 min puis dissous dans 30 µl d'eau RNase-free. La concentration et la qualité des ARN ainsi obtenus sont évaluées à l'aide d'un spectromètre (ND1000, Nanodrop ThermoScientific, USA). 2µg d'ARN, complétés avec 16µl d'eau RNase free, ont ensuite été prélevés pour chaque échantillon puis traités par un mix contenant 2µl de DNase I (1U/%l) et 2µl de tampon DNase 10x pendant 15 min. L'ajout de 2µl d'EDTA incubé pendant 10 min à 65°C permet ensuite de désactiver la DNase restante. La concentration et la qualité des ARN sont de nouveau évaluées. La reverse transcription (RT) est réalisé sur 1µg d'ARN après incubation pendant 5 min à 65°C avec un mix contenant des dNTP, des random primers et de la RNase out puis ajout de 1µl de transcriptase inverse et incubation à 37°C pendant 1h puis chauffage à 95°C durant 5 min afin de dénaturé l'enzyme. Les ADN complémentaires (ADNc) obtenus sont conservés à -80°C. Pour l'amplification par réaction de polymérisation, les échantillons sont dilués au 1/10^{ème} avec de l'eau extra-pure, puis 2,5 µl d'ADNc sont mélangés avec 7,5 µl d'un mix contenant 1,5 µl d'eau extra-pure, 5 µl du kit *LightCycler 480 SYBR Green I Master* (Roche) et 0,5 µl d'amorces sens et anti-sens pour chaque gène ciblé (Tableau 6). Les réactions de PCR et l'analyse des données ont été réalisées sur un appareil LightCycler 480 (Roche). La concentration d'ADNc est calculée à partir d'une gamme de dilution (du 1/2 au 1/164^{ème}) réalisée préalablement en mélangeant quelques µl d'ADNc de chaque échantillon à tester. Les résultats ont été normalisés par rapport à des gènes de ménage.

Gènes	Séquence sens	Séquence anti-sens	Amplicon (bp)
CCL2	TTCTGGGCCTGTTGTTTACA	CAGCCGACTCATTGGGATCA	185
VEGFc	GACGGACACACATGGAGGTT	AGCTAAGGAAAGGCGGCTG	209
VEGFd	TTGAACACCGAGCAGTGAAG	TCCTCAGAGTGTGCGACTTG	127
Lyve1	GTAGCAAACACCCAGCACAG	TGGGCCAACTCCTGCTTT	160
Icam1	CTGCTCCTGGTCCTGGTC	GCAAGAGGAAGAGCAGTTCA	109
IL1 β	AGATTCTTCCCCTTGAGGCC	CACTGCAGGCTTCGAGATGA	154
TNF α	TCTTCTCATTCCTGCTCGTGG	TGGGCCATGGAAGTATGAG	117
IL6	CCACTGCCTTCCCTACTTCA	TTCTGACAGTGCATCATCGC	260
IFN γ	TGTCATCGAATCGCACCTGA	TGTGCTGGATCTGTGGGTTG	267
TGF β 1	CGTCAGACATTCGGGAAGCA	TCAGCAGCCGGTTACCAAG	142
Col1A1	TCAAGATGGTGGCCGTTACT	GTAGGCTACGCTGTTCTTGC	274
Cx3Cr1	CAACAGATTCCCCACCAGAC	CTACCTCCTTCCCGGAATTG	152
CCR6	AGGAGGACCATGTTGTGAGG	GCTTCTTCATCCCTTTGCTG	160
CCL6	AGATCTTGGGCCTAGCTTCA	CTGCTGCTTCTCCTATGCCT	179
CCL21	CCCCTTCCTTTCTTCCCAGA	ACCCCGGAAGCAATCTCAG	153
B2m	TCTCAGTTCCACCCACCTCA	GGTCTCGGTGGGTGTGAATT	144

Tableau 6 : Liste des amorces RT-PCR utilisées pour les analyses d'expression génique cardiaque

Analyses statistiques

Les données sont présentées en moyenne \pm s.e.m. Des comparaisons ont été sélectionnées pour déterminer l'impact de la pathologie (non obèse vs ZF, mâles ou femelles) et l'effet de la ménopause induite (rats femelles non obèses ovariectomisées vs non ovariectomisées).

Les analyses statistiques pour les comparaisons de deux groupes indépendants ont été effectuées en utilisant soit un *two-tail t-test* de Student pour les groupes avec une distribution normale, soit un test Mann Whitney U pour les échantillons où la normalité n'a pas pu être établie sur la base du test de normalité omnibus de D'Agostino et Pearson. Pour les comparaisons de trois groupes ou plus il a été utilisé soit une analyse *one-way* ANOVA suivie d'une comparaison post hoc de Bonferroni (pour les paramètres avec $n > 7$ et une distribution

normale), soit une analyse non paramétrique de Kruskal-Wallis suivie d'une comparaison post hoc multiple de Dunn (pour les paramètres avec une distribution non gaussienne). Les données morphométriques et les données d'expression génique ont été analysées par *two-way* ANOVA suivie du posthoc de Sidak pour des comparaisons par paires ou du posthoc de Dunnett pour comparer 3 groupes. Des tests Spearman, de classement non paramétrique, ont été utilisés pour évaluer les corrélations. Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism.

Résultats

Confirmation de l'existence d'un Sd Met chez les rats ZF mâles et femelles

Les mâles *Lean* grossissent plus, et plus vite, que les femelles *Lean*. Parmi les femelles *Lean*, l'ovariectomie accélère la prise de poids. A 14 semaines, les femelles *Lean* ovariectomisées (ovx) pèsent en moyenne 25% de plus que les femelles *Lean* non-ovx. La prise de poids chez les rats ZF est quant à elle comparable entre mâles et femelles. A 24 semaines, les rats mâles ont atteint un poids 40% supérieur à celui des mâles *Lean* tandis que les femelles ZF, ovx et non-ovx, pèsent en moyenne le double de leur contrôles *Lean* (Figure 19, A, B et C). Cette prise de poids est essentiellement liée à une augmentation de la masse grasseuse, passée de 10% chez les *Lean* à 40% chez les mâles ZF et jusqu'à 50% chez les femelles ZF ovx.

La taille des animaux, estimée par la mesure de la longueur de leur tibia, était comparable entre les mâles *Lean* et ZF ainsi qu'entre les femelles *Lean* non-ovx et les ZF non-ovx. Les femelles *Lean* ovx étaient quant à elles plus grandes que leurs homologues ZF (Figure 19, D). Afin de limiter le biais lié à cette différence significative de taille, l'ensemble des poids mesurés dans cette étude a été rapporté à la taille du tibia. La qualité des ovariectomies était confirmée par la réduction de la masse utérine, comparable chez les rats *Lean* et ZF (Figure 19, E).

Les rats ZF présentaient une hypertriglycémie et une hypercholestérolémie en comparaison à leurs contrôles respectifs (Tableau 7). La glycémie à jeun était comparable entre les rats ZF et les *Lean*.

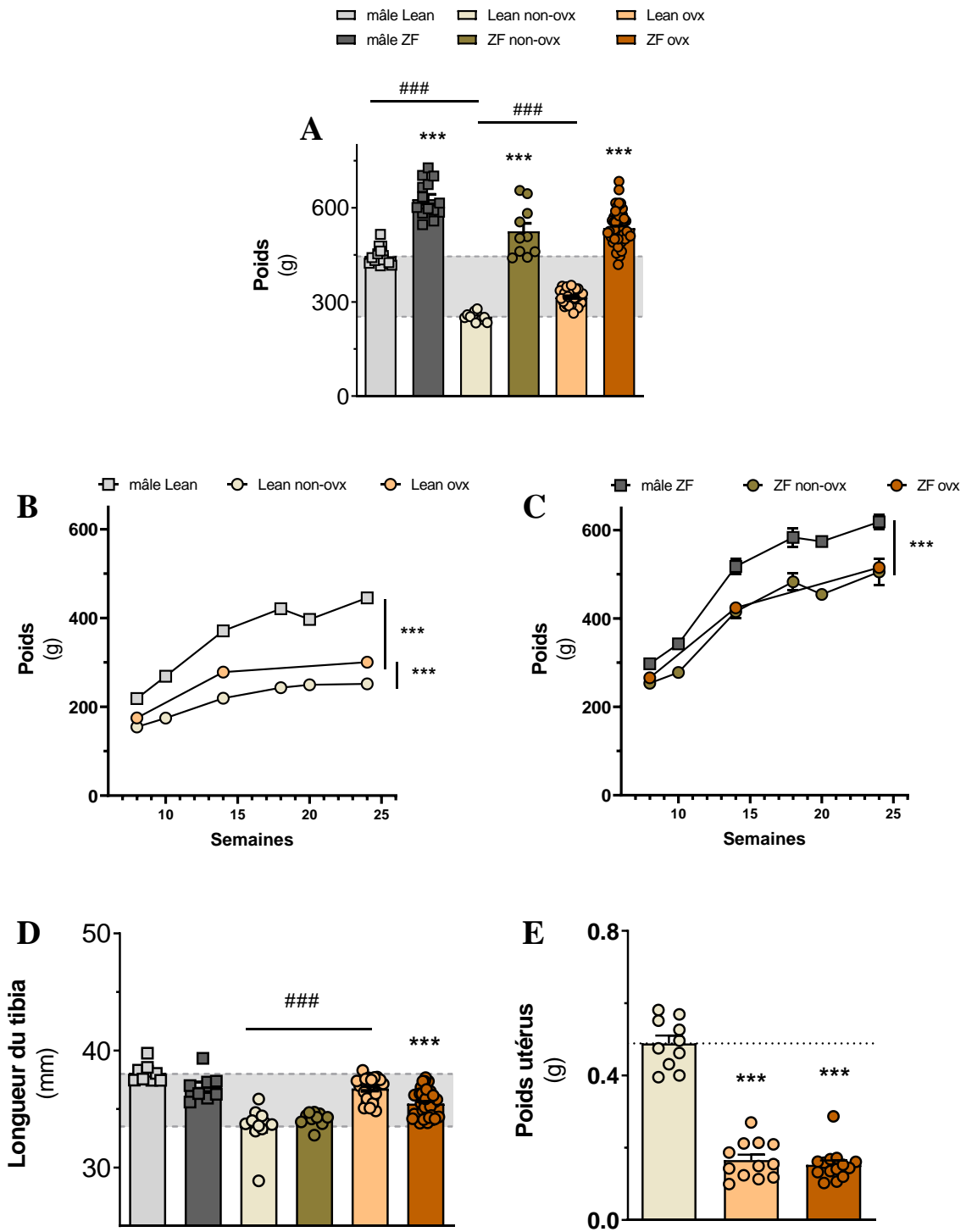


Figure 19 : Comparaison des paramètres morphométriques chez les rats mâles et femelles : Poids des rats à 24 S (A) ; Cinétique de la masse corporelle chez les rats Lean et ZF tout au long de l'étude (B et C) ; Taille du tibia à 24 S (D) ; Poids de l'utérus (E) . *** : $p < 0,001$ ZF par rapport aux témoins Lean respectifs ; ### : $p < 0,001$ femelles Lean ovx vs femelles Lean non ovx

Paramètres		Créat.	Insuline	HDL	LDL	C.T.	TgG	Gly	TG	Poids	
Unité		µmol/l	U/ml	mmol/l	mmol/l	mmol/l	A.U	mmol/l	mmol/l	g	
	n =										
♀	Lean non-ovx	7	24 ± 2	nd	1,6 ± 0,1	0,3 ± 0,0	2,2 ± 0,1	8,7 ± 0,1	4,6 ± 0,2	1,2 ± 0,1	253 ± 4
	Lean ovx	8-16	27 ± 1	nd	2,2 ± 0,1	0,4 ± 0,0	3,2 ± 0,1	8,4 ± 0,1	4,4 ± 0,2	0,8 ± 0,0	315 ± 4
	ZF non-ovx	6-7	18 ± 1	nd	2,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1	5,2 ± 0,5	10,5 ± 0,3	4,8 ± 0,3	5,0 ± 1,0	525 ± 26
	ZF ovx	8-26	24 ± 1	nd	3,2 ± 0,2	1,3 ± 0,1	8,9 ± 0,4	10,4 ± 0,1	4,5 ± 0,2	6,7 ± 1,1	535 ± 7
	non-ovx ZF vs Lean		ns	-	ns	ns	p<0,05	p<0,01	ns	p<0,05	p<0,001
	Ovx ZF vs Lean		ns	-	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	ns	p<0,001	p<0,001
♂	Lean	6-13	26 ± 1	1,3 ± 0,5	2,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1	3,2 ± 0,2	8,8 ± 0,1	5,3 ± 0,2	1,3 ± 0,1	415 ± 23
	ZF	7-15	25 ± 1	4,9 ± 0,6	3,6 ± 0,3	1,9 ± 0,2	7,5 ± 0,6	10,1 ± 0,1	5,6 ± 0,2	7,3 ± 0,9	566 ± 16
	ZF vs Lean		ns	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,001	p<0,001	ns	p<0,001	p<0,001

Tableau 7 : Paramètres biologiques plasmatiques chez les rats âgés de 24 S. One-way ANOVA ZF vs Lean ; Tg : triglycéride ; C.T : cholestérol total ; Gly : glucose ; TgG : triglycéride / glucose index ; Créat. : créatinine ; nd : non déterminé ; ns : non significatif, ZF vs Lean

Les tests de tolérance au glucose (Figure 20) ont cependant démontré une diminution de la clairance du glucose plasmatique, évaluée en mesurant l'aire sous la courbe, témoignant d'une intolérance au glucose chez les mâles ZF comparé à leur contrôle *Lean*. Les femelles ZF ovx présentent également une diminution de la clairance du glucose plasmatique, qui n'est pas retrouvée chez les ZF non-ovx. De façon similaire, l'ovariectomie chez les femelles *Lean* est associée à une augmentation des taux plasmatiques de glucose au cours du test de tolérance.

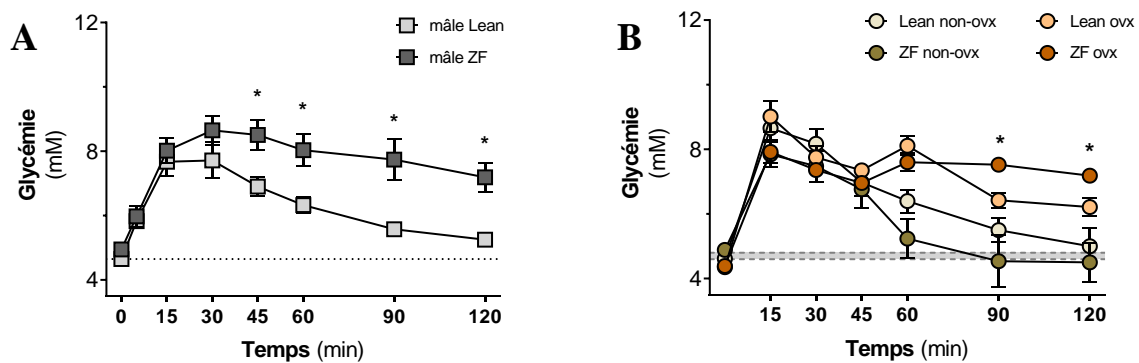


Figure 20 : Test de tolérance au glucose, réalisé à 24 semaines, chez les mâles (A) et les femelles (B) ($n = 8-14$ rats / groupe). * : $p < 0,05$ ZF par rapport aux témoins *Lean* respectifs.

L'analyse des pressions artérielles systémiques (Figure 21) met en évidence une augmentation des pressions diastoliques et systoliques chez l'ensemble des rats ZF comparé à leurs contrôles *Lean*, sans effets aggravant de l'ovariectomie.

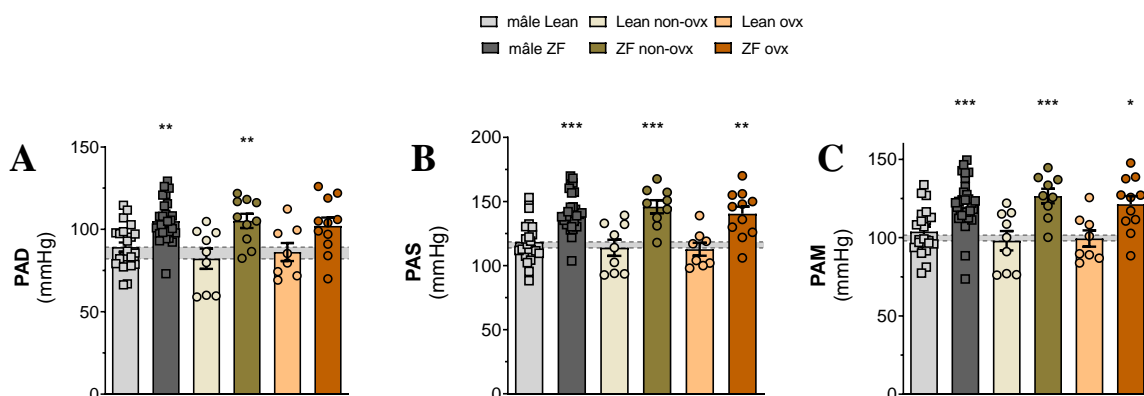


Figure 21 : Présence d'une hypertension artérielle chez les rats ZF. PAD : Pression artérielle diastolique (A), PAS : Pression artérielle systolique (B) et PAM : Pression artérielle moyenne (C) à 24 S.

Pris ensemble, ces données confirment l'existence d'un Sd Met chez les rats ZF, comparable chez les mâles et les femelles, validant ainsi la première partie du modèle.

Les rats ZF présentent une dysfonction diastolique associée à une hypertrophie cardiaque, sans altération de la fonction systolique

Les échographies cardiaques réalisées à 24 semaines ne démontrent aucune altération de la fonction systolique. La fraction d'éjection systolique ainsi que le débit cardiaque sont comparables chez les rats ZF et *Lean*. Le diamètre du VG mesuré en fin de systole et en fin de diastole est également comparable entre les rats ZF et leur contrôles *Lean*, confirmant l'absence de dilatation ventriculaire gauche dans ce modèle (Tableau 8).

Paramètres		FE	FC	DC	VES	FR	DTS VG	DTD VG	ETS VG	ETD VG	
Unité		%	bpm	ml/min	μl	%	mm	mm	mm	mm	
n =											
♀	<i>Lean ovx</i>	10-12	78 ± 1	414 ± 8	150 ± 6	365 ± 11	48 ± 1	3,5 ± 0,1	6,7 ± 0,2	3,2 ± 0,06	1,9 ± 0,08
	<i>ZF ovx</i>	25-26	80 ± 1	421 ± 4	161 ± 3	383 ± 5	50 ± 1	3,4 ± 0,1	6,8 ± 0,1	3,5 ± 0,06	2,0 ± 0,05
	<i>ZF vs Lean</i>		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	p<0,001	ns
♂	<i>Lean</i>	8-9	81 ± 2	364 ± 6	127 ± 7	348 ± 17	52 ± 2	3,6 ± 0,2	7,5 ± 0,2	3,7 ± 0,1	1,9 ± 0,08
	<i>ZF</i>	10-14	76 ± 1	334 ± 11	107 ± 5	320 ± 10	47 ± 1	4,0 ± 0,1	7,4 ± 0,2	3,9 ± 0,09	2,0 ± 0,06
	<i>ZF vs Lean</i>		ns	ns	ns	ns	p<0,05	ns	ns	ns	ns

Tableau 8 : Données des échographies cardiaques réalisées à 24 S. ETD VG : épaisseur télé-diastolique du mur antérieur du VG ; ETS VG : épaisseur télé-systolique du mur antérieur du VG ; DTD VG : diamètre télé-diastolique du VG ; DTS VG : diamètre télé-systolique du VG ; FR : fraction de raccourcissement ; VES : volume d'éjection systolique ; DC : débit cardiaque ; FC : fréquence cardiaque ; FE : fraction d'éjection du VG ; ZF versus Lean.

Les femelles ZF ovx présentent une augmentation significative de l'épaisseur de la paroi antérieure du VG en fin de systole comparé à leurs contrôles *Lean* ovx (Tableau 8), témoignant vraisemblablement d'une hypertrophie cardiaque. L'hypertrophie cardiaque, visible en échographie chez les femelles ZF ovx, est confirmée en morphométrie et retrouvée pour l'ensemble des groupes ZF (Figure 22). Le poids global du cœur rapporté à la taille des tibias est augmenté chez les rats ZF. De façon similaire, le poids des VG rapporté à la taille des tibias est significativement augmenté chez les rats ZF comparé leurs contrôles *Lean* (mâles : $20\% \pm 6\%$, femelles non-ovx : $44\% \pm 11\%$, femelles ovx : $32\% \pm 11\%$). Cette hypertrophie cardiaque globale n'est pas aggravée par l'ovariectomie chez les femelles ZF. Cependant, le poids des cœurs de femelles *Lean* ovx était significativement plus élevé que celui des femelles *Lean* non-ovx (2,603 g vs 2,347 g).

Les analyses histologiques sont également en faveur d'une hypertrophie cardiaque chez les rats ZF, avec des cardiomyocytes plus grands de $14\% \pm 7\%$, $25\% \pm 9\%$ et $17\% \pm 11\%$ chez les mâles, les femelles non-ovx et les femelles ovx ZF respectivement, comparés à leurs contrôles *Lean*. Cette différence est significative pour le groupe des femelles non-ovx.

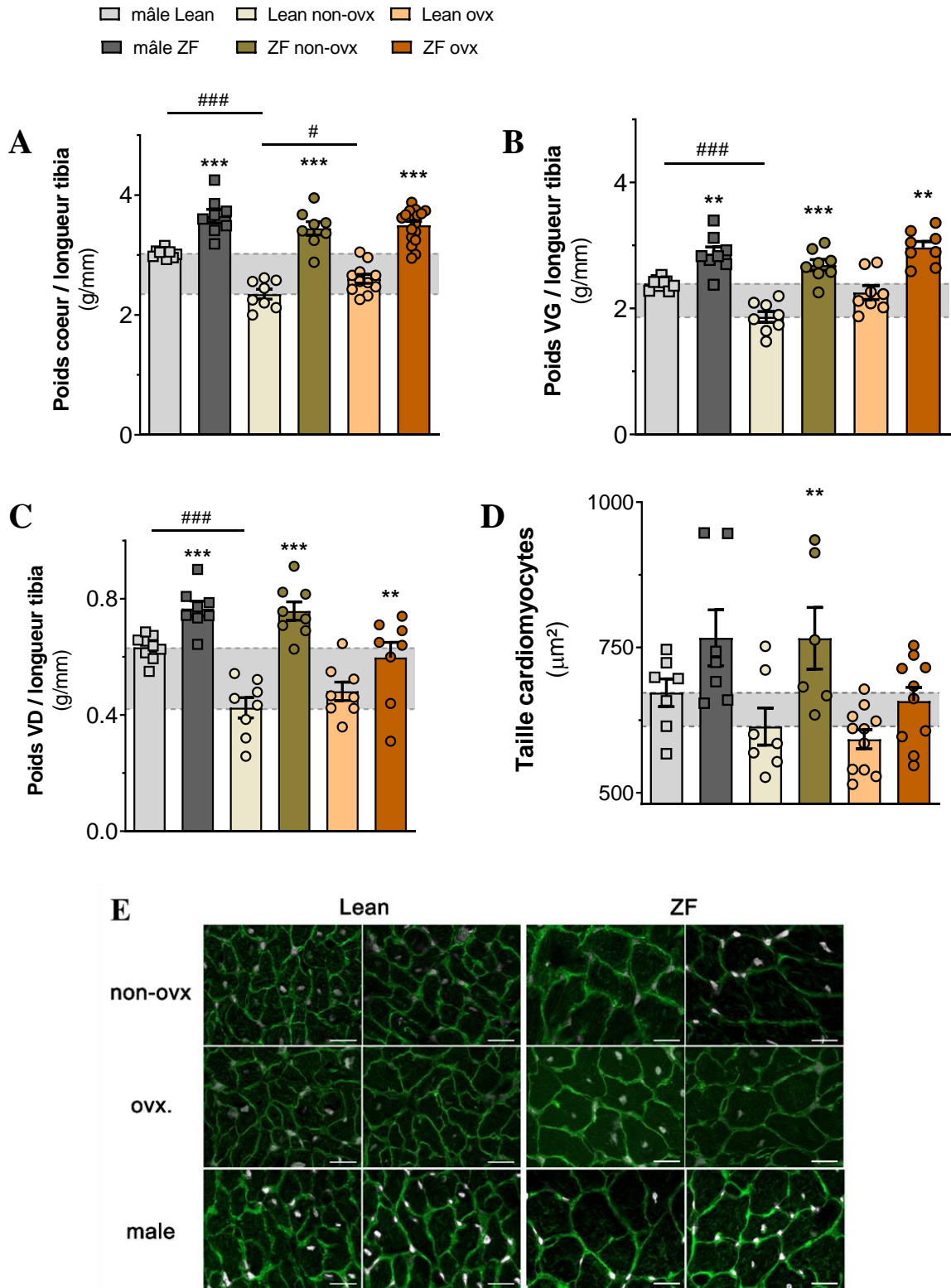


Figure 22 : Confirmation de l'existence d'une hypertrophie cardiaque chez les rats ZF mâles et femelles. Indices de masse cardiaque (A), ventriculaire gauche (B), ventriculaire droit (C) quantification de la taille des cardiomyocytes (D), normalisés par rapport aux longueurs du tibia (g/mm). Exemples de la taille des cardiomyocytes (WGA, vert, DAPI, blanc, x20). * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$ ZF par rapport aux témoins Lean respectifs ; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ mâles Lean and Lean ovx versus Lean non-ovx.

Sur le plan hémodynamique, les expérimentations ont révélé une augmentation des pressions intra-ventriculaires gauches, en fin de systole principalement mais également en diastole, chez tous les rats ZF en comparaison à leurs contrôles *Lean*, en faveur d'une dysfonction diastolique (Figure 23, A et B). La constante de relaxation isovolumique *tau* est plus élevée chez les rats ZF, en accord avec l'existence d'une dysfonction diastolique (Figure 23, E). Les données de l'analyse de la relation pression / volume vont également en ce sens avec une augmentation significative de la relation pression / volume en fin de diastole chez les rats ZF. La relation pression / volume en fin de systole est par contre comparable entre les rats ZF et leurs contrôles *Lean*, confirmant l'absence d'altération de la fonction systolique dans ce modèle (Figure 23, C et D).

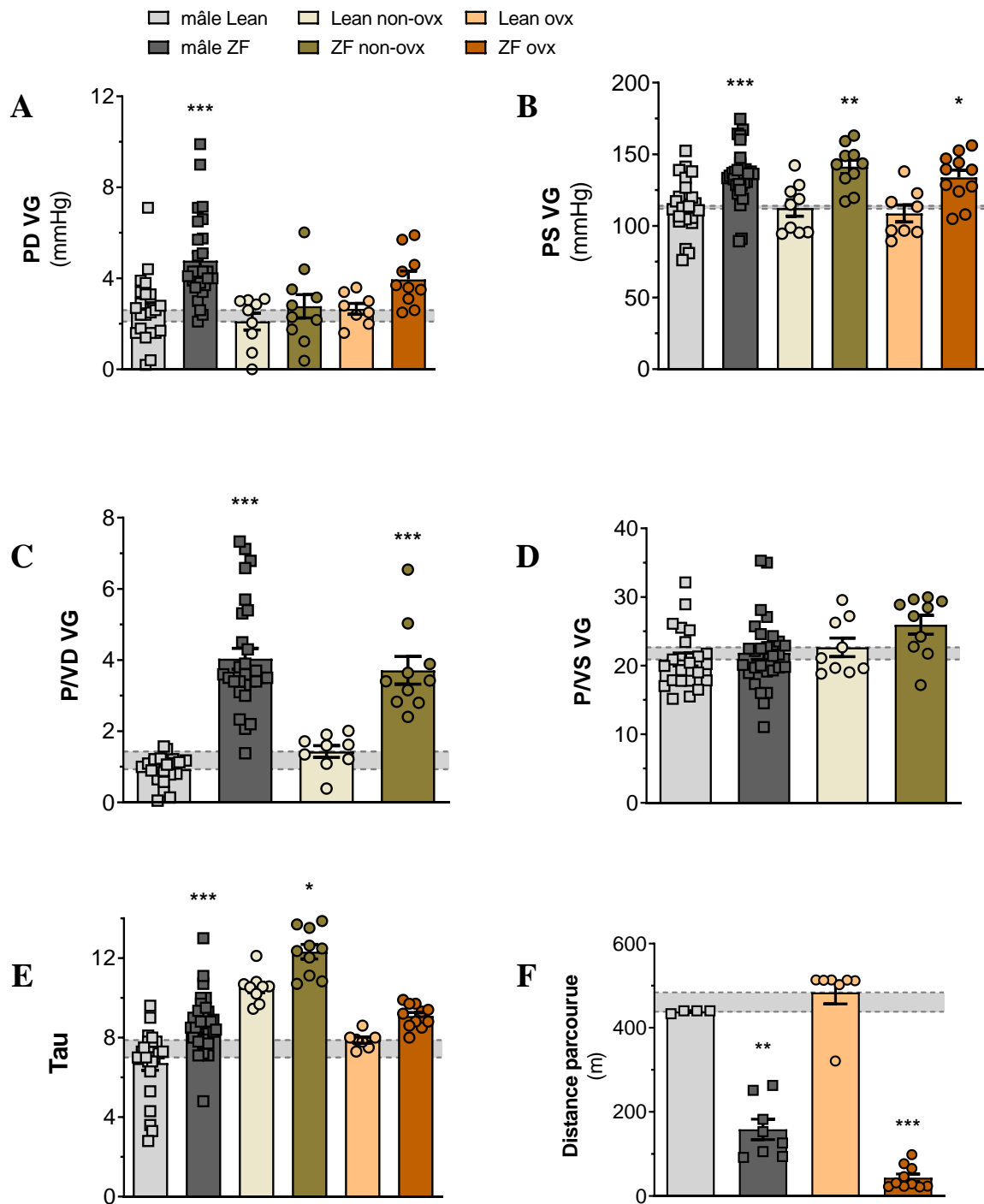


Figure 23 : Analyses hémodynamiques ($n = 8-29$ rats / groupe) effectuées pour déterminer (A) : la pression télédiastolique du VG (PD VG), (B) la pression télésystolique du VG (PS VG) et (E) la constante de relaxation tau, et calculer (C) le relation pression-volume télédiastolique du VG (P/VD VG) et (D) la relation pression-volume télésystolique du VG (P/VS VG). (F) Distance parcourue sur tapis roulant pendant 45 min lors de l'épreuve d'effort. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ZF par rapport aux témoins Lean respectifs.

En accord avec l'existence d'une dysfonction diastolique chez les rats ZF, et également probablement en lien avec une sarcopénie souvent associé au Sd Met, les rats ZF présentent une

tolérance à l'effort considérablement réduite par rapport aux *Lean* (Figure 23, F). Au total la dysfonction diastolique semble similaire chez les rats ZF des deux sexes.

La dysfonction diastolique chez les rats ZF est différemment associée, selon le sexe et le statut hormonal chez les femelles, à des altérations de la fonction endothéliale coronaire et de la microcirculation sanguine et à une diminution de la réserve coronaire

Afin de mieux comprendre les mécanismes vasculaires impliqués dans l'installation de la dysfonction diastolique observée, la perfusion cardiaque a été étudiée par IRM.

L'analyse des données d'IRM a mis en évidence une réduction significative de la perfusion myocardique à l'état basal chez les mâles ZF comparé aux mâles *Lean* (-15,4% ± 4%). La perfusion myocardique basale est par contre comparable entre les femelles ZF et *Lean*, ovx ou non (Figure 24, A). Cependant, la capacité maximale de perfusion coronaire, mesurée après administration de dipyridamole (0,1 mg kg⁻¹, IP), est diminuée de façon significative chez les femelles ZF ovx en comparaison aux femelles *Lean* ovx (Figure 24, B). Au total, la réserve coronaire, définie comme la différence entre la perfusion myocardique basale et la capacité maximale de perfusion coronaire, est diminuée de façon significative chez les femelles ovx, ZF ou *Lean*, comparé aux femelles *Lean* non ovx, ainsi que plus modérément chez les mâles ZF (Figure 24, C).

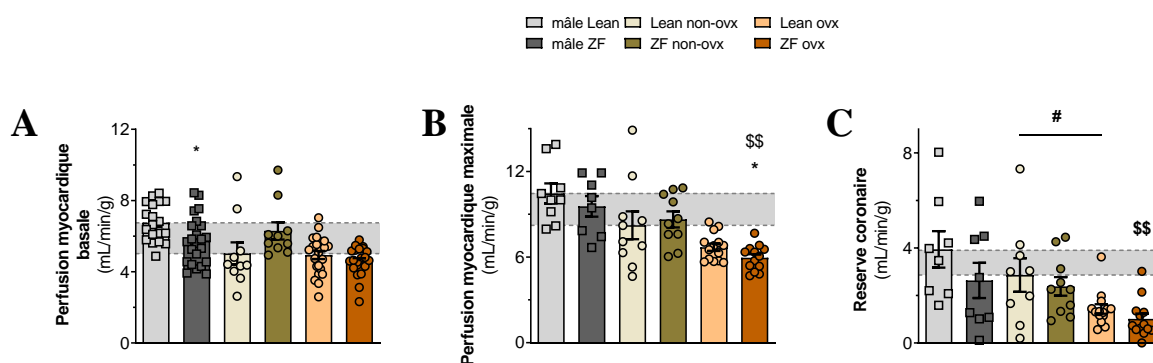


Figure 24 : Analyse de la perfusion myocardique et de la réserve coronaire par IRM. Perfusion myocardique basale (A), perfusion myocardique maximale après perfusion d'adénosine (B) et réserve coronaire (C) déterminées par analyse IRM (n = 5-23 rats / groupe). * p<0,05 ZF par rapport aux témoins *Lean* respectifs ; # p<0,05 *Lean* ovx vs *Lean* non-ovx ; \$\$ p<0,01 ZF ovx par rapport aux *Lean* non-ovx.

Comme attendu devant la diminution de la perfusion coronaire basale, les rats mâles ZF présentent une importante dysfonction coronaire, mise en évidence par les analyse *ex vivo* sur l'artériographe de Mulvany, et caractérisée par une altération de la relaxation endothéliale dépendante du NO induite par l'ACh par rapport aux mâles *Lean* (Figure 25, A). Chez les femelles, malgré une tendance chez les ZF non-ovx, il n'est pas retrouvé d'altération significative de la relaxation endothéliale induit par l'ACh entre les ZF, ovx et non ovx, et leurs contrôles respectifs. Cependant, en accord avec la diminution de la réserve coronaire retrouvée après ovariectomie, la réactivité coronaire à l'ACh est comparable chez ces femelles *Lean* et ZF ovx, et réduite chez les femelles *Lean* ovx par rapport aux femelles *Lean* non-ovx (Figure 25, B et C).

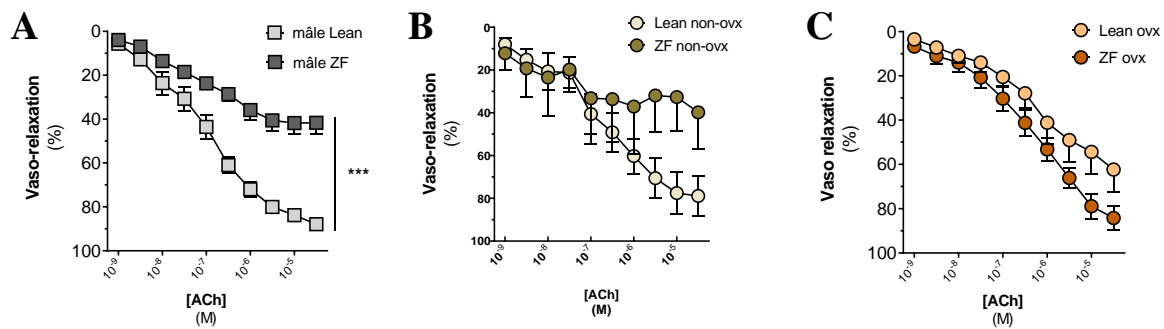


Figure 25 : Réactivité endothéliale vasculaire coronaire à l'acétylcholine (ACh) analysée *ex vivo* chez les mâles *Lean* et ZF (A), les femelles non-ovx (B) et les femelles ovx (C). *** $p < 0,001$ ZF par rapport aux témoins *Lean* respectifs

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle la diminution de la réserve coronaire chez les patients ICFEP est le reflet d'une raréfaction micro-vasculaire, la densité capillaire myocardique a été évaluée par immunohistochimie chez des rats de 24 S (Figure 26). Tandis que la densité vasculaire est comparable chez les mâles *Lean* et ZF, il est retrouvé une raréfaction capillaire chez les femelles ZF non ovx comparées aux femelles *Lean* non ovx. L'ovariectomie entraîne une diminution majeure de la densité capillaire ainsi que du rapport nombre de capillaires/cardiomyocytes (-22 ± 7 %) chez les femelles ZF et les *Lean* ovx comparées aux femelles *Lean* non-ovx. De la même façon que la réactivité coronaire à l'ACh, la densité capillaire est comparable entre les femelles ovx ZF et *Lean*.

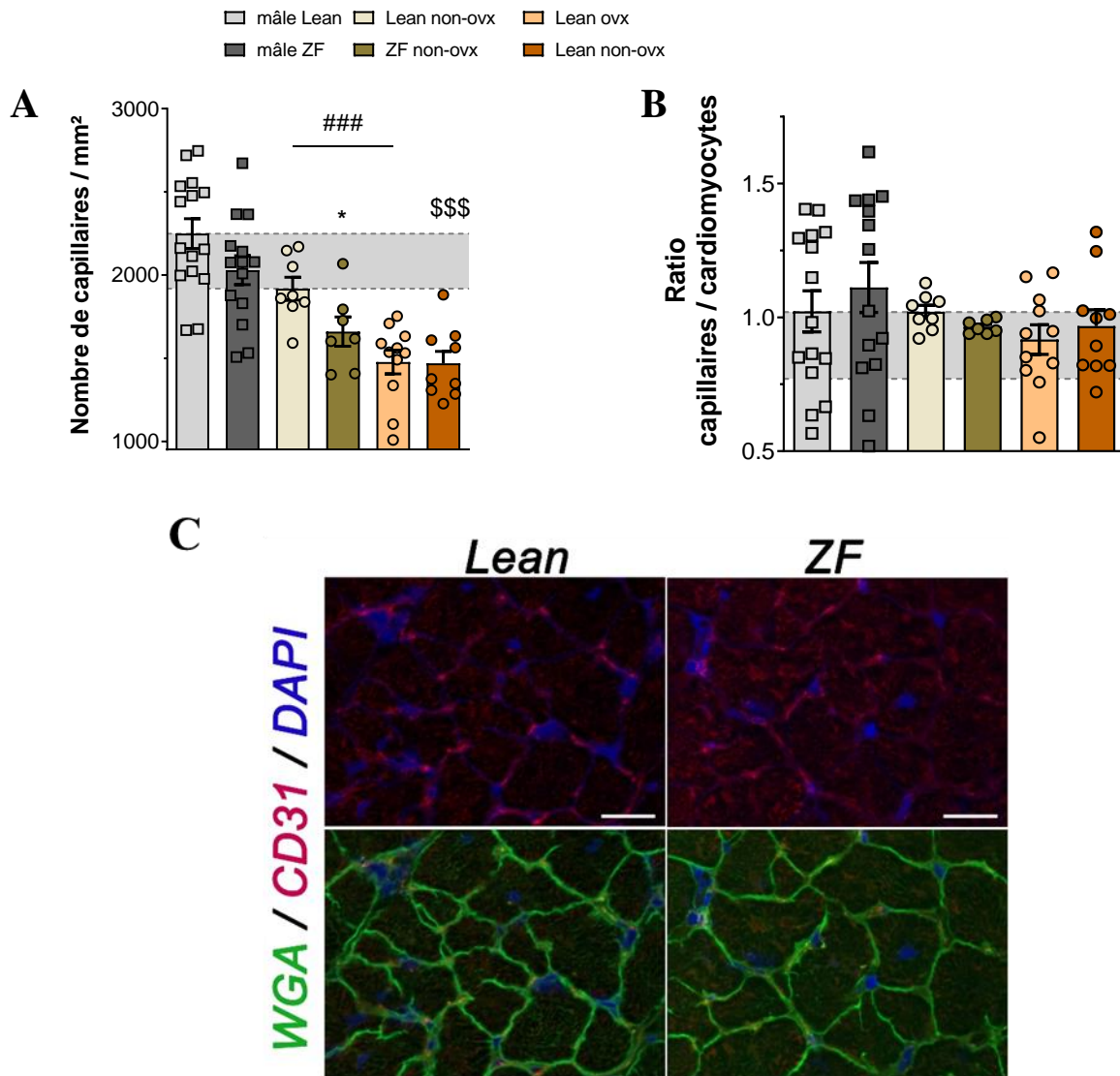


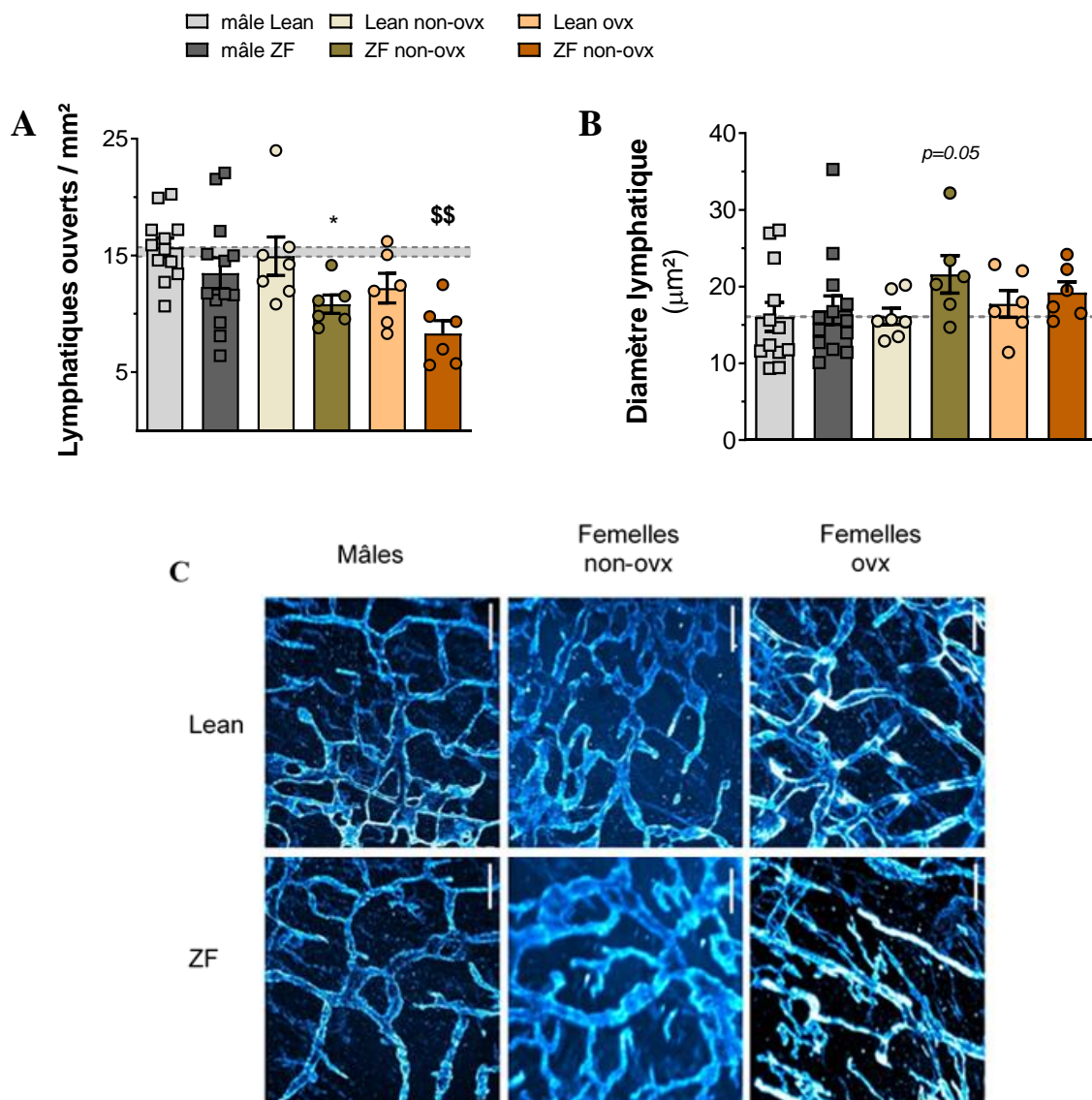
Figure 26 : Densité capillaire myocardique (A) évaluée par immunohistochimie (B, exemple ; CD31 en blanc, Ve-Cadhérine en rouge et Dapi en bleu, x 20) et rapportée au nombre de cardiomyocytes (C) ; * $p < 0,05$ ZF par rapport aux témoins Lean respectifs ; ### $p < 0,001$ Lean ovx vs Lean non-ovx ; \$\$\$ $p < 0,001$ ZF ovx par rapport aux Lean non-ovx.

La densité lymphatique cardiaque est diminuée chez les femelles ZF, sans association avec un œdème myocardique

Afin d'évaluer le réseau lymphatique sur le plan quantitatif et qualitatif, des études immunohistochimiques ont été réalisées sur des coupes de VG ainsi que sur des cœurs entiers prélevés à 24 S. Chez les femelles ZF, la densité lymphatique cardiaque est diminuée en comparaison aux femelles *Lean*. Cette raréfaction lymphatique semble également partiellement dépendante du statut hormonal, la densité lymphatique étant minimale chez les femelles ZF ovx

(Figure 27, A). Les imageries 3D mettent en évidence chez les rats femelles ZF une altération qualitative du réseau lymphatique caractérisée par des lymphatiques souvent dilatés, de calibre irrégulier. Ces aspects ne sont pas retrouvés chez les mâles ZF (Figure 27, C). L'étude du diamètre des vaisseaux lymphatiques sur coupe montre une augmentation légère, non significative de leurs diamètres chez les femelles ZF non-ovx (Figure 27, B).

L'analyse par RTqPCR de l'expression au niveau cardiaque de gènes impliqués dans la lymphangiogenèse retrouve une augmentation des taux d'expression du VEGF-C et du VEGF-D significative uniquement chez les mâles ZF (Figure 27, D). Le taux d'expression du Lyve-1, mesuré chez les femelles ovx est comparable entre les *Lean* et les ZF.



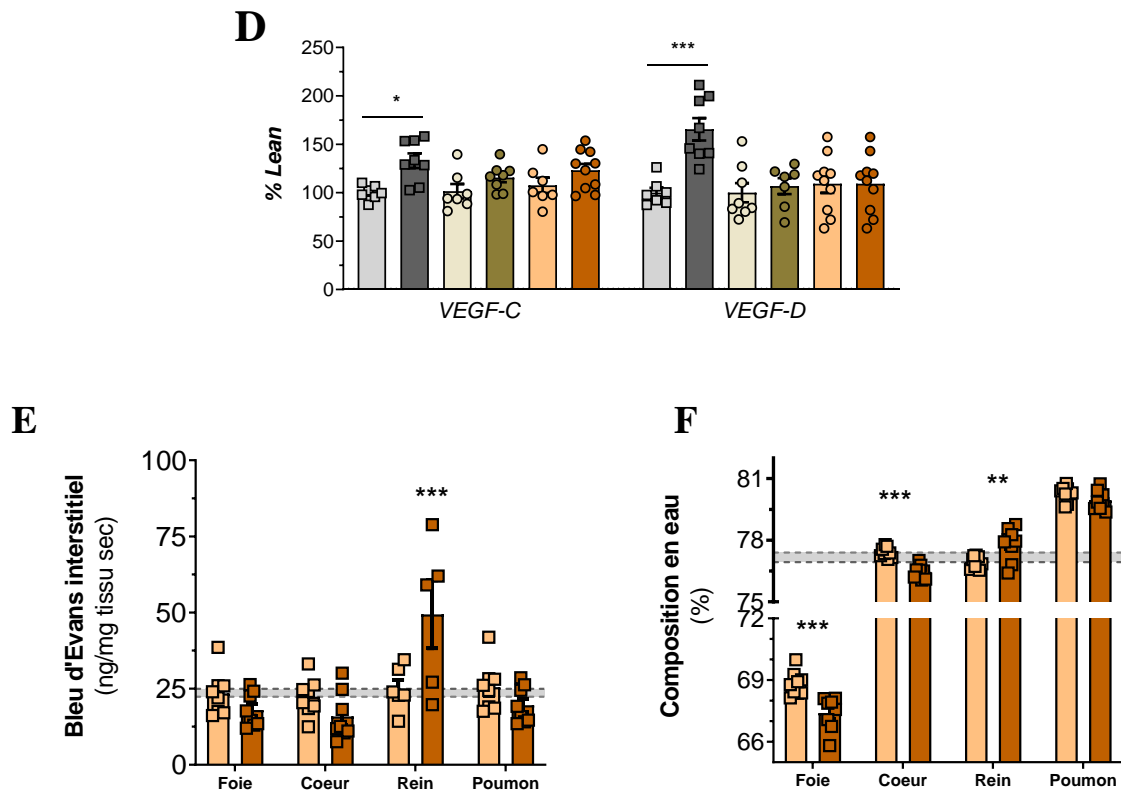


Figure 27 : Remodelage lymphatique, perméabilité vasculaire et œdème. Densité des vaisseaux lymphatiques ouverts (A) et diamètres lymphatiques (B) évalués sur des coupes immunohistochimiques ($n = 5-14$ rats / groupe). Lymphatiques cardiaques visualisés par microscopie à feuille de lumière (C, LYVE1 en bleu, $\times 20$. Barre d'échelle, $300 \mu\text{m}$). Expression cardiaque des facteurs de croissance lymphangiogénique VEGF-C et VEGF-D. Perméabilité vasculaire étudiée dans le foie, le cœur, les reins et les poumons de femelles ovx. (E) et teneur en eau dans ces mêmes organes (F). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ZF par rapport aux contrôles Lean respectifs ; \$\$ $p < 0,01$ ZF ovx versus Lean non-ovx.

Du fait de ces altérations chez les rats femelles ovx, nous avons émis l'hypothèse qu'un œdème myocardique pourrait contribuer à la dysfonction cardiaque. L'apparition d'un œdème tissulaire résultant d'une altération de la balance entre la perméabilité vasculaire et le retour lymphatique, des études complémentaires ont été réalisées afin d'évaluer la perméabilité vasculaire et l'œdème tissulaire cardiaque dans différents organes. La perméabilité vasculaire, évaluée par spectrométrie après injection de bleu d'Evans, n'est augmentée que dans les reins des femelles ZF ovx (Figure 27, E). Un œdème est présent dans les reins des femelles ZF ovx, en accord avec l'augmentation de la perméabilité vasculaire dans cet organe (Figure 27, F). Les analyses morphologiques du parenchyme rénal sur coupe en paraffine ont ainsi mis en évidence chez les rats ZF, mâles et femelles, une fibrose interstitielle et péri-vasculaire marquée associée à un infiltrat inflammatoire lympho-plasmocytaire également interstitiel et la présence de vacuoles

intra-cytoplasmiques vraisemblablement lipidiques au niveau des tubes collecteurs. Il n'a pas été observé d'altération glomérulaire (Figure 28).

Les perméabilités vasculaires cardiaque et pulmonaire sont quant à elles comparables entre les rats ZF et leurs contrôles *Lean*, en accord avec l'absence d'œdème tissulaire retrouvé. Les analyses de micro-gravimétrie montrent en effet une diminution de la teneur en eau dans le foie ainsi que dans le cœur probablement en lien avec les modifications de la composition tissulaire, en particulier l'importance de la stéatose.

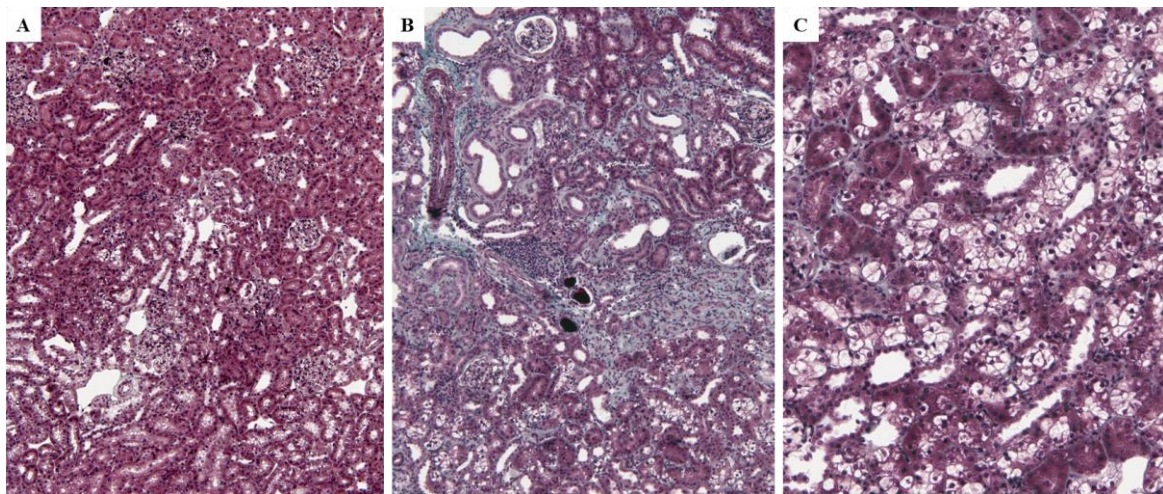
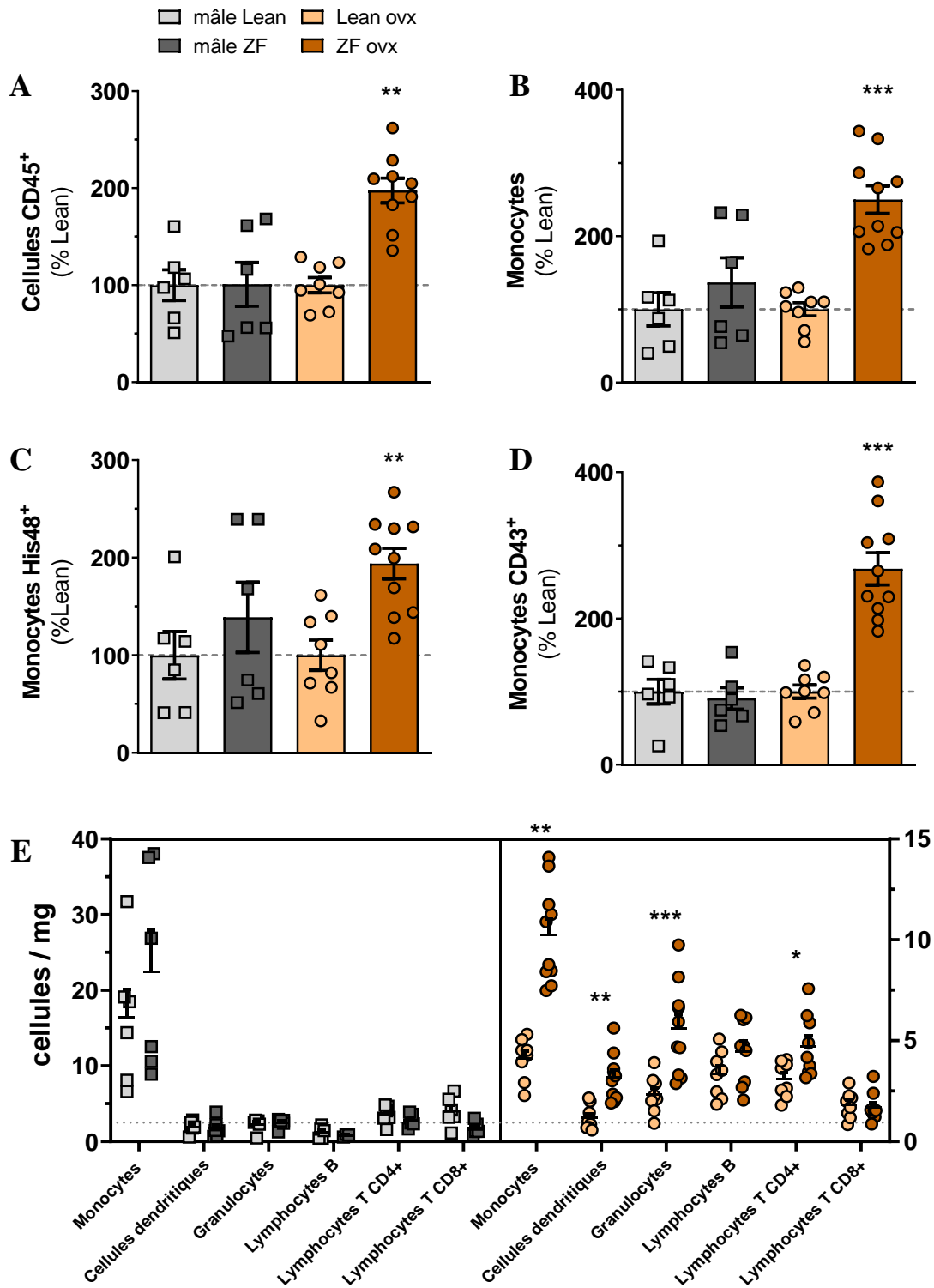


Figure 28 : Exemple d'altérations histologiques du parenchyme rénal chez les rats ZF (B et C) comparé aux *Lean* (A). Présence d'une fibrose et d'un infiltrat inflammatoire interstitiels chez les rats ZF (B), associée à une accumulation intra-cytoplasmiques probablement lipidiques au niveau des tubes collecteurs (C). Trichrome vert, x100 (A et B) et x 200 (C).

Les femelles ZF présentent une inflammation tissulaire cardiaque, non retrouvée chez les mâles

Les analyses de l'inflammation myocardique par cytométrie en flux réalisées sur des fragments de myocarde prélevés à 24 S et préalablement digérés mettent en évidence chez les femelles ZF ovx une augmentation de l'infiltrat inflammatoire ($+86 \pm 16\%$ de cellules CD45+ / mg de tissu) comparé au contrôle *Lean* ovx (Figure 29, A). Cette différence est majoritairement le reflet d'une augmentation du nombre de cellules myéloïdes tels que les monocytes, les granulocytes et les cellules dendritiques (Figure 29, B et E). L'augmentation du nombre de monocytes au sein du tissu cardiaque est lié à la fois à l'augmentation des monocytes classiques His48+ et alternatifs CD43+ (Figure 29, C et D). Il est également retrouvé une augmentation significative

du nombre de lymphocytes T CD4⁺ chez les femelles ovx, sans modification du taux de lymphocytes T totaux. Les taux de lymphocytes B est inchangé entre les femelles ovx ZF et *Lean*. Cependant, la densité myocardique en macrophages, évaluée en immunohistochimie sur des coupes de VG est comparable entre les femelles ovx ZF et *Lean*.



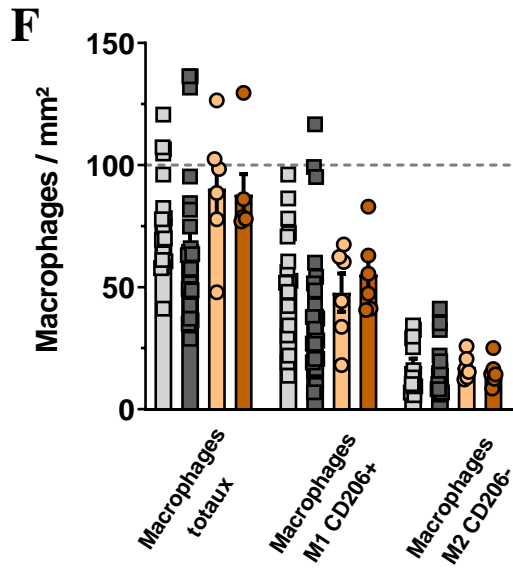


Figure 29 : Etude de l'inflammation tissulaire cardiaque. Taux de leucocytes CD45+ (A), de monocytes totaux, M1 et M2 (B, C et D) et des autres lignées myéloïdes et lymphoïdes (E) mesuré par cytométrie en flux (n=6-9 rats/groupe). Quantification des macrophages totaux, M1 et M2 (F) par analyses immunohistochimiques. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ZF par rapport aux contrôles Lean respectifs.

Afin de préciser les mécanismes associés à l'inflammation tissulaire cardiaque retrouvée chez les femelles ovx, l'expression génique cardiaque de plusieurs cytokines pro-inflammatoires et chimiokines a été analysée par RTqPCR. Ces analyses retrouvent une augmentation significative de l'expression du Cx3Cr1, de Icam1, du Ccl6 et du Ccl2 chez les femelles ZF ovx, comme attendu devant les résultats de la cytométrie en flux (Figure 30, A). Dans les groupes des rats mâles le taux d'expression d'Icam1 est également augmenté chez les ZF, sans altération des autres profils d'expression génique étudiés (Figure 30, B).

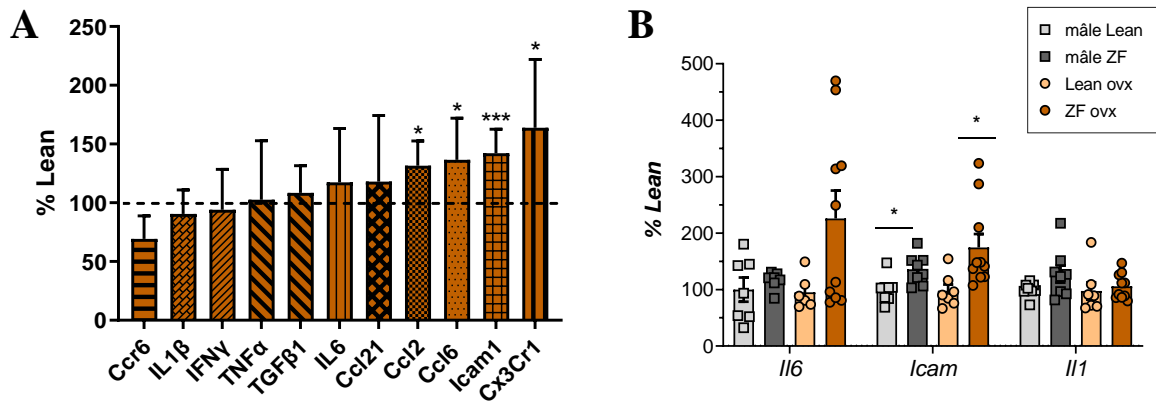


Figure 30 : Expression cardiaque de gènes impliqués dans l'inflammation chez les femelles ovx (A) et chez les mâles (B)

Fibrose myocardique

Les analyses sur coupes histologiques de la fibrose interstitielle et péri-vasculaire sont actuellement encore en cours, ne permettant pas de fournir en l'état de résultat sur ces paramètres.

Résumé des principaux résultats obtenus chez les rats mâles ZF, chez les femelles ZF non-ovx et ovx ainsi que chez les femelles *Lean* ovx

	Mâles ZF	Femelles ZF non-ovx	Femelles <i>Lean</i> ovx	Femelles ZF ovx
S Met	+	+	-	+
Glycémie à jeun	↔	↔	↔	↔
Intolérance au glucose	↑↑	↔	↑	↑↑
PAM	↑↑	↑↑	↔	↑↑
Dysf° diastolique	+	+	-	+
Hypertrophie VG	↑↑↑	↑↑↑	↑	↑↑↑
Altérations vasculaires	↓	↓↓		↓↓
Perfusion coronaire basale	↓	↔	↔	↔
Relaxation endothéliale	↓↓↓	↓	↓	↓
Reserve coronaire	↔	↔	↓	↓↓
Densité capillaire	↔	↓	↓↓	↓↓↓
Densité lymphatique	↔	↓	↓	↓↓
Inflammation cardiaque	-	na	-	++
Myéloïde	-	na	-	↑↑
Lymphoïde	-	na	-	↑
Fibrose	na	na	na	na

Tableau 9 : Résumé des principales altérations métaboliques et cardiaques chez les rats mâles ZF, femelles ZF non-ovx et femelles ovx ZF et *Lean*. ↔ : inchangé par rapport aux mâles *Lean* ou aux femelles *Lean* non-ovx ; na : non analysé

Discussion

Développement comparable d'un Sd Met chez les rats ZF mâles et femelles

Le Sd Met affecte environ 20 à 30 % de la population d'âge moyen, et la prévalence augmente dans de nombreux pays avec une obésité croissante et un mode de vie de plus en plus sédentaire. L'état post-ménopausique est associé à une augmentation de 60 % du risque de Sd Met, même après ajustement des variables confusionnelles, telles que l'âge, l'IMC, le revenu du ménage et l'inactivité physique (130). La chute des taux sériques d'œstrogène après la ménopause chez la femme est depuis longtemps connue comme associée à l'émergence de nombreuses caractéristiques du Sd Met, notamment une augmentation de la masse grasse abdominale.

Dans notre étude, la prise de poids des rats ZF par rapport à leurs contrôles respectifs est comparable. Cependant, alors que l'insuffisance ovarienne induite par l'ovariectomie a conduit à une prise de poids significative chez les femelles *Lean*, chez les ZF l'ovariectomie n'a pas eu d'impact sur la prise poids. L'effet de l'ovariectomie sur le poids des rats ZF est discuté. Dans une étude qui a évalué l'effet de l'insuffisance oestrogénique induite par ovariectomie chez des rats femelles *Lean* et ZF, Gale *et coll* retrouve un effet combiné du génotype et du statut hormonal sur la prise de poids (131). Ces résultats ne sont cependant pas retrouvés par d'autres auteurs pour qui, comme dans notre étude, l'ovariectomie n'a pas d'impact chez les rats ZF (132). L'action des œstrogènes dépend de la signalisation et de la sensibilité de leur récepteur, dont le principal et le plus étudié est l'ER α , mais également de l'activité d'enzymes comme l'aromatase impliquées dans leur biosynthèse et de mécanismes d'inactivation enzymatique (133). L'hypothalamus est une zone du système nerveux central qui, entre autres, régule l'homéostasie énergétique et la prise de poids. Dans l'hypothalamus, l'action des œstrogènes via leur récepteur ER α supprime la prise alimentaire et stimule l'activité physique et la dépense énergétique. Les souris femelles ovariectomisées ou celles avec des mutations dans le gène ER α sont obèses (134,135). Décrit pour la première fois en 1994, la leptine, sécrétée par les adipocytes, joue également un rôle majeur dans ces fonctions de balance énergétique en inhibant la prise alimentaire et en augmentant les dépenses énergétiques. Ces effets sont médiés par la forme longue du récepteur de la leptine, qui colocalise dans l'hypothalamus avec le récepteur aux œstrogènes ER α , suggérant que les œstrogènes modulent l'action catabolique de la leptine dans l'hypothalamus. Ainsi l'ovariectomie chez des rats *wild-type* réduit la sensibilité à la leptine. Les femelles ZF sont par définition résistantes à la leptine et donc probablement

déjà peu sensible à l'action centrale des œstrogènes, malgré qu'elles présentent des taux normaux d'œstrogènes plasmatiques (133).

Deux schémas de distribution de la graisse corporelle ont été observés, gynoïde et androïde. Les hommes, en moyenne, ont une plus forte proportion de tissu adipeux intra-abdominal / viscéral, tandis que les femmes ont tendance à avoir plus de graisse en localisation sous cutanée. L'accumulation de graisse viscérale est l'un des principaux déterminants du Sd Met. Une obésité androïde est associée à un risque plus élevé de diabète, d'hyper-triglycéridémie, d'hyper-LDL et d'hypertension et est logiquement apparue comme un FdR CV, indépendant de l'obésité globale. (130). Ce dysmorphisme sexuel dans la distribution du tissu adipeux explique en partie le plus grand risque de maladie CV chez les hommes par rapport aux femmes pré-ménopausées. Après la ménopause, la distribution des graisses chez les femmes se modifie vers un phénotype androïde. Bien qu'il soit communément admis que la ménopause est associée à une prise de poids, il ne semble pas y avoir d'effet indépendant de la ménopause sur le poids corporel. La plupart des études ne révèlent pas d'augmentation de l'IMC indépendante du vieillissement normal. Cependant, même en l'absence de prise de poids, la répartition de la graisse corporelle change après la ménopause avec une augmentation préférentielle de l'adiposité abdominale, indépendamment de l'effet de l'âge et de la masse grasse totale (130). Dans notre étude l'analyse de la proportion de masse grasse a été mesurée de façon globale. Nous n'avons pas comparé la répartition des graisses chez les animaux de notre étude.

L'existence d'un diabète, et donc d'une résistance à l'insuline, entraîne des déficiences dans la capacité de l'hormone à inhiber la production de glucose par le foie et à réguler l'absorption et le métabolisme du glucose dans les tissus sensibles à l'insuline (le muscle strié et le tissu adipeux) responsables d'une augmentation de la glycémie à jeun et d'une diminution de la tolérance au glucose. Par rapport aux hommes du même âge, les femmes pré-ménopausées ont une meilleure sensibilité à l'insuline. En effet, bien qu'une réduction de 40 à 50 % de l'élimination du glucose induite par l'insuline soit systématiquement observée chez les souris mâles après une alimentation riche en graisses, les femelles pré-ménopausées, avec des taux normaux d'œstrogènes, soumises au même régime sont généralement protégées contre l'apparition d'une hyperglycémie. Parallèlement, les souris et les rats ovariectomisés ont une sensibilité à l'insuline diminuée et sont plus sensibles aux effets délétères d'un excès de graisse. La restauration de concentrations physiologiques d'œstrogènes permet le maintien de l'action de l'insuline et de la tolérance au glucose (133). Comme décrit dans la littérature (80,84,129),

les rats ZF dans notre étude ne sont pas diabétiques. Nous avons cependant observé une diminution de la clairance du glucose plasmatique chez les mâles ZF et les femelles ovx. De façon intéressante ces altérations de la tolérance au glucose ne sont pas retrouvées chez les femelles non-ovx, qu'elles soient *Lean* ou ZF.

En conclusion, notre étude démontre l'apparition d'un Sd Met comparable chez les mâles et les femelles ZF, sans effet majeur de l'ovariectomie. Notamment, bien que les différences dans certains paramètres, tels que l'augmentation de masse corporelle, la dyslipidémie ou la diminution de la tolérance au glucose, soient plus prononcées lorsque l'on compare les femelles ZF ovx avec les femelles *Lean* non-ovx plutôt qu'avec les *Lean* ovx, l'ovariectomie seule ne suffit pas à induire un Sd Met dans notre modèle.

Les rats ZF présentent une dysfonction diastolique associée à une hypertrophie cardiaque, sans altération de la fonction systolique

Les différents résultats fonctionnels obtenus dans notre étude ont permis de confirmer l'existence d'une dysfonction diastolique chez l'ensemble des rats ZF, validant ainsi notre modèle. L'hypertrophie cardiaque, caractérisée par l'augmentation de la masse cardiaque et la taille des cardiomyocytes, a bien été retrouvée chez les mâles et les femelles ZF avec cependant des différences plus marquées par rapport aux *Lean* chez les femelles. De même, l'épaississement de la paroi du VG en échographie n'est retrouvé que chez les femelles. En clinique, bien que cela puisse s'expliquer en partie par la répartition des sexes en fonction de l'âge et les effets de l'âge sur la prévalence et la gravité des principales comorbidités (notamment l'obésité, la résistance à l'insuline/le diabète et l'hypertension) il existe également des différences physiologiques fondamentales entre les sexes dans la structure et la fonction cardiaque. Les femmes ont une cavité VG plus petite et par conséquent des volumes systoliques inférieurs. Leur fréquence cardiaque au repos plus élevée assure le maintien d'un débit cardiaque similaire à celui des hommes. Les femmes ont également une rigidité du VG plus élevée que les hommes du même âge (136,137). Sur le plan vasculaire également il existe des différences liées au sexe. Les femmes ont une rigidité et une pression artérielles plus élevées que les hommes.

Cependant, la prévalence de la dysfonction diastolique ventriculaire gauche n'augmente fortement chez les femmes qu'à partir d'un certain âge. Le vieillissement normal entraîne des changements structurels et fonctionnels du système cardiovasculaire tels qu'une augmentation

de l'épaisseur de la paroi et une diminution des dimensions télédiastoliques du VG. Le remodelage vasculaire et des grosses artères participe à l'augmentation de la postcharge et à l'hypertrophie ventriculaire. La dégénérescence myocardique progressive et la fibrose se développent également avec l'âge (136,138). Au total, les différences entre les hommes et les femmes sur le plan cardiaque ont tendance à s'accroître avec le vieillissement. Plusieurs études se sont intéressées aux mécanismes impliqués dans la prédisposition des femmes âgées à la dysfonction diastolique et la diminution du taux d'œstrogènes circulants avec la ménopause semble de nouveau étroitement liée aux modifications myocardiques observées dans ICFEP. Des études échocardiographiques ont montré que les femmes avec une ICFEP étaient plus susceptibles d'avoir un remodelage concentrique du VG, un dysfonctionnement diastolique plus sévère (une diminution plus marquée de la relaxation du VG une rigidité diastolique plus importante) et des pressions de remplissage du VG plus élevées, par rapport aux hommes avec ICFEP (137).

En conclusion, notre modèle expérimental permet d'étudier les différences entre les sexes dans les mécanismes précoces de développement de l'ICFEP. Il a été noté que l'hypertrophie cardiaque et le dysfonctionnement diastolique étaient comparables chez les mâles et les femelles ZF, sans effet aggravant de l'ovariectomie. Il est important de noter que l'ovariectomie chez les femelles *Lean* n'a pas induit d'altération de la fonction cardiaque ce qui indique qu'en l'absence de Sd Met la ménopause n'est pas suffisante pour induire un dysfonctionnement diastolique.

Altérations de la fonction endothéliale coronaire vs. raréfaction de la microcirculation sanguine cardiaque chez les rats ZF.

Notre étude a mis en évidence des profils d'altération vasculaire différents selon le sexe. Ainsi, nous avons observé chez les mâles ZF une diminution de la perfusion coronaire à l'état basal, comme précédemment décrit par notre laboratoire (129), associée à une dysfonction coronaire endothéliale majeure, sans altération de la densité micro-vasculaire sanguine myocardique. Ces données peuvent paraître étonnantes, les altérations macro-vasculaires étant supposées plutôt associées à l'ICFER. Bien que certains FdR soit plus spécifiques d'un type d'IC, il existe un chevauchement important des FdR d'ICFEP et ICFER comme l'âge, l'obésité, et l'hypertension artérielle. *Ho et coll* ont développé et validé, à partir des données de 4 importantes cohortes regroupant au total plus de 1000 patients, des modèles de prédiction de risques distincts pour l'ICFEP et l'ICFER. L'utilisation de méthodes statistiques multivariées spécifiques afin

d'analyser simultanément tous les FdR concurrents aux 2 sous-types d'IC n'a pas identifié le sexe comme un FdR d'ICFEP. Le sexe masculin reste par ailleurs un facteur prédictif important d'ICFER dans cette étude (139). De même, bien que l'existence d'une maladie coronarienne soit reconnue comme un important FdR d'ICFER mais pas d'ICFEP, Ho *et coll* démontrent qu'elle est également significativement associée à un risque plus élevé de développer une ICFEP.

En revanche, dans notre étude expérimentale, les altérations micro-vasculaires sont au premier plan chez les femelles ZF avec une diminution nette de la densité capillaire myocardique et du ratio capillaires / cardiomyocytes notamment après ovariectomie. Effectivement, en accord avec le rôle protecteur connu des œstrogènes sur l'endothélium, l'ovariectomie semble un facteur aggravant de la raréfaction capillaire dans les cœurs hypertrophiés mais également dans les cœurs des femelles *Lean ovx*. Dans un modèle murin d'ICFEP induit par rétrécissement aortique, Iorga *et coll* ont montré une ré-augmentation de la densité capillaire cardiaque associée à une augmentation de l'expression génique de VEGF-A après injection d'œstrogènes, chez les souris femelles et les mâles (140). De ce fait, la comparaison dans notre étude de modèles murins femelles exclusivement ovariectomisés a atténué les différences apparentes entre les *Lean* et les ZF sur plusieurs paramètres. Ainsi par exemple la réserve coronaire, la réactivité coronaire à l'ACh, et la densité capillaire sont comparables chez les femelles *ovx Lean* et ZF. Ces résultats nous ont convaincu de la nécessité de compléter notre étude en ajoutant des groupes de femelles non-*ovx Lean* et ZF.

Altération des lymphatiques cardiaque vs. œdème cardiaque chez les rats ZF.

Pendant longtemps le système lymphatique n'a été que peu étudié en raison de la difficulté à différencier les CEL des cellules endothéliales sanguines. Ce n'est qu'à la fin du siècle dernier que l'identification de marqueurs moléculaires spécifiques, tels que Prox-1, Lyve1 et Podoplanine, a enfin permis d'étudier les caractéristiques des vaisseaux lymphatiques dans différents organes et pathologies. Dès lors, de nombreuses études ont pu démontrer l'implication d'une dysfonction et/ou d'un remodelage lymphatique dans diverses pathologies, inflammatoires, tumorales ou métaboliques. Ainsi, des études utilisant des modèles murins d'obésité, soit génétique soit induite par l'alimentation, ont identifié chez ces animaux une diminution de la densité lymphatique associée à une dysfonction vasculaire lymphatique. D'autre part, de plus en plus de publications sont focalisées l'impact des lymphatiques dans les

maladies CV comme détaillé dans l'introduction, et une étude récente chez des patients ICFEP à décrit une dysfonction lymphatique au niveau cutané (141).

Cependant, l'état du réseau lymphatique cardiaque dans l'ICFEP n'a pas été étudié. Dans notre étude nous avons mis en évidence, en plus de la raréfaction capillaire myocardique, une diminution de la densité lymphatique au sein du myocarde chez les femelles ZF, associée à des altérations morphologiques des vaisseaux lymphatiques résiduels. Ces effets, non retrouvés chez les mâles ZF, semblent cumulatifs entre le Sd Met et de la ménopause, et ce remodelage lymphatique est susceptible d'avoir contribué à accentuer l'inflammation myocardique par rapport aux mâles. L'expression cardiaque plus faible du VEGF-C et VEGF-D pendant l'hypertrophie cardiaque chez les rats ZF ovx par rapport aux mâles ZF suggère une diminution de la signalisation pro-lymphangiogénique qui pourrait en partie dépendre de l'absence des effets bénéfiques de l'œstrogène. Malgré une abondante littérature démontrant l'effet protecteur des œstrogènes sur les vaisseaux sanguins, nous ne savons à l'heure actuelle que peu de choses de leurs effets sur l'endothélium lymphatique. En 2018, Morfisse *et coll* ont démontré que ER- α , exprimé par les CEL, active directement l'expression de gènes liés à la lymphangiogénèse, comme le *Vegfr3/Flt4*, le *Vegfd* et *Lyve-1*, et que son blocage pharmacologique par le tamoxifène ou sa délétion par un système Cre-Lox entraîne une diminution significative du réseau vasculaire lymphatique et une augmentation du lymphœdème chez la souris (142). En accord avec ces données, nous avons retrouvé une expression du *Vegfd* au niveau cardiaque supérieure de 36 % \pm 11 chez les femelles *Lean* non-ovx par rapport aux mâles *Lean*. Par contre, l'ovariectomie chez les rats *Lean* ne réduit pas les taux cardiaques du *Vegfd* dans notre étude. Cependant, parmi les rats ZF, le taux d'expression du *Vegfd* était étonnamment inférieur chez les femelles ovx par rapport aux mâles. Une étude récente a mis en évidence, au niveau cardiaque, une densité lymphatique plus élevée chez les souris femelles que chez les mâles à l'état basal (143). Chez les rats *Lean* dans notre étude nous n'avons pas retrouvé cette différence.

Récemment, notre équipe a montré, dans un modèle d'hypertrophie cardiaque induite par une surcharge de pression chez la souris, que la dilatation du VG plutôt que l'épaississement de sa paroi entraîne une activation de la lymphangiogénèse (144). Différentes études cliniques et expérimentales ont décrit des différences entre les sexes dans l'adaptation à la surcharge de pression, qui induit chez les femmes un remodelage du VG de nature concentrique, plutôt qu'excentrique chez les hommes (136,137). Dans notre étude, de manière similaire, le diamètre télésystolique du VG a tendance à augmenter chez les mâles ZF, mais pas chez les femelles ZF,

tandis que l'épaisseur de la paroi du VG est augmentée chez les femelles mais pas chez les mâles (Tableau 8). L'ensemble de ces données laisse à penser que l'augmentation des contraintes exercées sur la paroi du VG (définies selon la loi de Laplace comme proportionnelles au rayon du VG et inversement proportionnelles à l'épaisseur de sa paroi) chez les mâles peut avoir déclenchée l'expression cardiaque de *Vegfc* et *Vegfd* afin de maintenir la densité lymphatique pendant l'hypertrophie cardiaque induite par le Sd Met. Ainsi, la différence observée entre les sexes dans la lymphangiogenèse cardiaque dans notre étude peut être le reflet de ces différences dans le remodelage cardiaque.

Nous n'avons pas retrouvé d'œdème au niveau myocardique comme nous aurions pu nous y attendre en lien avec la diminution de la densité lymphatique cardiaque et l'augmentation de la pression artérielle moyenne. Comme mentionné dans l'introduction, plusieurs études utilisant à la fois des modèles murins d'obésité et de Sd Met ont montré une fuite lymphatique et des altérations de la contraction des vaisseaux collecteurs au niveau cutané et mésentérique. Les anomalies de la perméabilité vasculaire sanguine et lymphatique au cours de l'obésité pourraient être liées à une inflammation péri-vasculaire et une production accrue de cytokines pro-inflammatoires (145). Ainsi par exemple, Hespe *et coll* ont observé au niveau sous cutané, dans leur modèle de souris obèses sédentaires, une diminution de la densité des vaisseaux lymphatiques et de la capacité de drainage des vaisseaux lymphatiques collecteurs associés à une accumulation de cellules immunitaires et une augmentation de la fuite lymphatique. Ils ont également mis en évidence une augmentation du taux plasmatique de TGF β et une augmentation tissulaire d'autres marqueurs inflammatoires ayant une action anti-lymphangiogénique (IFN γ et TNF α) ainsi qu'une diminution de l'expression de marqueurs lymphatiques spécifiques comme le VEGFR-3, Prox1 et CCL21 (146).

Bien que leurs taux de créatinine plasmatique soient dans les limites de la normale, les rats ZF présentent des troubles rénaux, comme en témoigne les remaniements du parenchyme rénal en histologie, caractérisés essentiellement par une fibrose et une inflammation interstitielle, et également la présence d'un œdème tissulaire rénal et d'une hyperperméabilité vasculaire sanguin. L'ICFEP et la dysfonction rénale coexistent souvent et sont intimement liées. En d'autres termes, l'ICFEP peut altérer la fonction rénale et inversement une dysfonction rénale peut induire l'apparition ou la progression de l'ICFEP. La dysfonction endothéliale et l'état pro-inflammatoire systémique associés au Sd Met sont apparus comme des médiateurs importants dans cette relation bidirectionnelle. L'augmentation de la pression veineuse au cours de l'ICFEP constitue un facteur de risque de diminution ou d'aggravation de la fonction rénale

(74). Dans notre étude, les rats ont été maintenus jusqu'à 24 semaines de vie, ce qui constitue un âge avancé et un risque d'apparition de facteurs confondants tels qu'une dysfonction rénale chez cette souche.

L'inflammation cardiaque chez le rat ZF

Il est reconnu qu'une inflammation chronique systémique de bas grade et une activation du système immunitaire sont impliquées dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline liée à l'obésité et au Sd Met. Certains marqueurs inflammatoires systémiques sont d'ailleurs élevés chez ces patients et leur augmentation est positivement corrélée aux anomalies clinico-biologiques du Sd Met, indépendamment du degré d'obésité. De plus, l'étude de Chirinos *et coll* a démontré à partir de la cohorte de patients ICFEP TOPCAT une corrélation entre certains biomarqueurs de l'inflammation, comme l'IL-6 et le TNF α , et le risque de décès par IC (36,147). D'autre part, les femmes sont plus susceptibles de présenter une augmentation des cytokines pro-inflammatoires en réponse à l'augmentation de la graisse corporelle que les hommes (148).

Nous n'avons pas mesuré dans notre étude les marqueurs inflammatoires systémiques. Nous avons axé notre étude sur le tissu myocardique et avons ainsi mis en évidence une inflammation myocardique chez les femelles ZF ovx, avec une augmentation préférentielle du nombre de monocytes et de cellule dendritiques. Nous avons également retrouvé une augmentation tissulaire myocardique de l'expression de cytokines et molécules impliquées dans l'inflammation telles que l'IL6, le Ccl2, le Ccl6, Icam-1 (*InterCellular Adhesion Molecule 1*) et le Cx3Cr1. Cette inflammation tissulaire cardiaque n'est pas retrouvée chez les mâles ZF. Dans une étude récente chez des souris femelles *db/db*, Guimbal *et coll* retrouvent également au niveau myocardique une surexpression du Ccl2 et d'Icam-1 ainsi qu'une surcharge inflammatoire (149). La particularité de cette étude est d'avoir mis en évidence une proportion importante de mastocytes dans le tissu cardiaque. Nous n'avons pas spécifiquement ciblé les mastocytes dans notre étude mais ils seraient présents dans notre *gate* cytométrique des granulocytes, largement augmentée chez nos rats femelles ovx ZF.

L'utilisation d'une technique de cytométrie en flux sur fragment tissulaire cardiaque dans notre étude a permis de mettre en évidence des différences qui ne seraient sans doute pas significatives sur une analyse histologique. Nous n'avons par exemple pas retrouvé de différence significative

entre les *Lean* et les ZF quant au nombre de macrophages cardiaques. Le niveau d'inflammation cardiaque chez les femelles ZF reste tout de même faible dans notre étude. Ceci peut s'expliquer par le choix du modèle. La leptine joue un rôle central dans les réponses immunitaires et l'inflammation en stimulant la prolifération des monocytes et leur production de cytokines pro-inflammatoires. Les niveaux de leptine sont augmentés dans de nombreuses pathologies inflammatoires et auto-immunes. Dans le Sd Met, la leptine augmente proportionnellement à la masse corporelle et à la résistance à l'insuline (148). Ainsi, en utilisant des rats résistant à la leptine nous risquons d'avoir limité les signaux pro-inflammatoires induits par l'obésité. Il est à noter que la synthèse de leptine est également influencée par le sexe. Par rapport aux hommes, les femmes ont des niveaux plus élevés de leptine (150). Le choix d'utiliser d'autres modèles de Sd Met liés au diabète plutôt qu'à une mutation dans la voie de la leptine pourrait apporter un contexte plus inflammatoire, plus semblable à la réalité clinique des patients atteints d'ICFEP.

Fibrose

La fibrose myocardique constitue l'une des caractéristiques phares de l'ICFEP. Notre équipe a décrit une fibrose interstitielle myocardique diffuse, ainsi qu'une fibrose périvasculaire, chez des rats mâles ZF (129). Les œstrogènes jouent un rôle protecteur contre le développement d'une fibrose myocardique (151,152). Nous nous attendons donc à retrouver une fibrose interstitielle et périvasculaire majeure chez les rats mâles ZF et les femelles ZF ovx et potentiellement moindre chez les femelles ZF non ovx. Cependant, une étude récente chez des rats obèses mâles et femelles ZSF1 non-ovx a rapporté des augmentations similaires de la fibrose myocardique chez les deux sexes (153). En effet, alors que les œstrogènes peuvent inhiber la production de collagène I et III par les fibroblastes chez les femelles, les androgènes peuvent au contraire induire l'expression du TGF- β , un puissant médiateur pro-fibrotique (152). La fibrose cardiaque peut également être induite par une inflammation et un œdème. En accord, notre équipe a précédemment démontré qu'une réduction de l'inflammation et de l'œdème cardiaques par thérapie lymphangiogénique était suffisante pour réduire la fibrose interstitielle post-IM chez les rats (105). En revanche, nous avons récemment démontré dans un modèle de surcharge de pression chez la souris qu'une réduction de la densité lymphatique au cours de l'hypertrophie cardiaque aggrave la fibrose périvasculaire, mais pas interstitielle (144). Ainsi, sur la base de nos découvertes chez les rats femelles ZF ovx, qui présentent une raréfaction

lymphatique et une inflammation tissulaire cardiaque, nous pensons mettre en évidence une aggravation de la fibrose périvasculaire par rapport aux rats femelles *Lean* non ovx. Les analyses sont actuellement en cours de finalisation.

Conclusion et perspective

Dans cette étude, nous avons démontré que l'ensemble des rats ZF présentent un Sd Met qui conduit à une dysfonction diastolique. Nous avons cependant mis en évidence des différences fonctionnelles et cellulaires entre les rats ZF mâles et femelles. Ainsi uniquement chez les femelles ZF nous avons mis en évidence une raréfaction micro-vasculaire sanguine et lymphatique cardiaque associée à une hypertrophie cardiaque concentrique, accentuées par l'ovariectomie, et qui contribuent à l'inflammation cardiaque et probablement à l'installation d'une fibrose et à la perte de compliance du VG.

Notre équipe a précédemment démontré que les thérapies lymphangiogéniques avec le VEGF-C réduisaient l'inflammation cardiaque, l'œdème, la fibrose et le dysfonctionnement cardiaque post-infarctus du myocarde chez les rongeurs (105,106). De même, l'activation de la lymphangiogenèse dans un modèle murin d'hypertension a réduit de manière prometteuse l'inflammation et la dysfonction rénale (154). Initialement dans ce projet nous avons prévu d'évaluer les effets d'un traitement pro-lymphangiogénique sur notre cohorte de rats femelles ovx *Lean* et ZF. Cependant, devant les premiers résultats que nous avons obtenus en comparant les femelles ovx *Lean* et ZF, qui ne démontraient pas de différences significatives en particulier concernant la densité lymphatique cardiaque, nous n'avons pas poursuivi cette option thérapeutique. L'ajout dans l'étude, dans un second temps, des groupes de rats femelles non-ovx a finalement permis de mettre en lumière les altérations du réseau lymphatique présents chez les femelles ZF ovx.

Alors que les études futures devraient déterminer si l'activation thérapeutique de la lymphangiogenèse cardiaque suffira à améliorer la fonction diastolique chez les femelles ZF ovx, nos données suggèrent que des thérapies angiogéniques et lymphangiogéniques combinées pourraient être nécessaires afin de réduire l'inflammation cardiaque et le dysfonctionnement diastolique chez les patients atteints d'ICFEP.

Références

1. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 3 mars 2020;141(9):e139-596.
2. Roth GA, Forouzanfar MH, Moran AE, Barber R, Nguyen G, Feigin VL, et al. Demographic and epidemiologic drivers of global cardiovascular mortality. *N Engl J Med*. 2 avr 2015;372(14):1333-41.
3. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Lond Engl*. 10 janv 2015;385(9963):117-71.
4. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 7 mars 2017;135(10):e146-603.
5. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail*. août 2016;18(8):891-975.
6. Fox KF, Cowie MR, Wood DA, Coats AJ, Gibbs JS, Underwood SR, et al. Coronary artery disease as the cause of incident heart failure in the population. *Eur Heart J*. févr 2001;22(3):228-36.
7. Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KK. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA*. 22 mai 1996;275(20):1557-62.
8. Cowie MR, Wood DA, Coats AJ, Thompson SG, Poole-Wilson PA, Suresh V, et al. Incidence and aetiology of heart failure; a population-based study. *Eur Heart J*. mars 1999;20(6):421-8.
9. Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*. 20 juill 2006;355(3):251-9.
10. Bursi F, Weston SA, Redfield MM, Jacobsen SJ, Pakhomov S, Nkomo VT, et al. Systolic and diastolic heart failure in the community. *JAMA*. 8 nov 2006;296(18):2209-16.
11. Pfeffer MA, Shah AM, Borlaug BA. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction In Perspective. *Circ Res*. 24 mai 2019;124(11):1598-617.

12. Gerber Y, Weston SA, Redfield MM, Chamberlain AM, Manemann SM, Jiang R, et al. A contemporary appraisal of the heart failure epidemic in Olmsted County, Minnesota, 2000 to 2010. *JAMA Intern Med.* juin 2015;175(6):996-1004.
13. Chang PP, Wruck LM, Shahar E, Rossi JS, Loehr LR, Russell SD, et al. Trends in Hospitalizations and Survival of Acute Decompensated Heart Failure in Four US Communities (2005-2014): ARIC Study Community Surveillance. *Circulation.* 3 juill 2018;138(1):12-24.
14. Zile MR, Gottdiener JS, Hetzel SJ, McMurray JJ, Komajda M, McKelvie R, et al. Prevalence and significance of alterations in cardiac structure and function in patients with heart failure and a preserved ejection fraction. *Circulation.* 6 déc 2011;124(23):2491-501.
15. Redfield MM, Chen HH, Borlaug BA, Semigran MJ, Lee KL, Lewis G, et al. Effect of phosphodiesterase-5 inhibition on exercise capacity and clinical status in heart failure with preserved ejection fraction: a randomized clinical trial. *JAMA.* 27 mars 2013;309(12):1268-77.
16. Mahmood SS, Levy D, Vasan RS, Wang TJ. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. *Lancet Lond Engl.* 15 mars 2014;383(9921):999-1008.
17. Kannel WB, LeBauer EJ, Dawber TR, McNamara PM. Relation of body weight to development of coronary heart disease. The Framingham study. *Circulation.* avr 1967;35(4):734-44.
18. Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol.* juill 1974;34(1):29-34.
19. Kannel WB, Castelli WP, Gordon T, McNamara PM. Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham study. *Ann Intern Med.* janv 1971;74(1):1-12.
20. Kannel WB, Castelli WP, McNamara PM. Serum lipid fractions and risk of coronary heart disease. The Framingham study. *Minn Med.* août 1969;52(8):1225-30.
21. Kannel WB, Schwartz MJ, McNamara PM. Blood pressure and risk of coronary heart disease: the Framingham study. *Dis Chest.* juill 1969;56(1):43-52.
22. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA.* 11 mai 1979;241(19):2035-8.
23. Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PWF, Benjamin EJ, Larson MG, et al. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med.* 1 août 2002;347(5):305-13.
24. Wang J, Sarnola K, Ruotsalainen S, Moilanen L, Lepistö P, Laakso M, et al. The metabolic syndrome predicts incident congestive heart failure: a 20-year follow-up study of elderly Finns. *Atherosclerosis.* mai 2010;210(1):237-42.
25. Ingelsson E, Arnlöv J, Lind L, Sundström J. Metabolic syndrome and risk for heart failure in middle-aged men. *Heart Br Card Soc.* oct 2006;92(10):1409-13.

26. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Drazner MH, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 15 oct 2013;62(16):e147-239.
27. Brouwers FP, de Boer RA, van der Harst P, Voors AA, Gansevoort RT, Bakker SJ, et al. Incidence and epidemiology of new onset heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction in a community-based cohort: 11-year follow-up of PREVEND. *Eur Heart J*. mai 2013;34(19):1424-31.
28. Dhingra A, Garg A, Kaur S, Chopra S, Batra JS, Pandey A, et al. Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Curr Heart Fail Rep*. déc 2014;11(4):354-65.
29. Lam CSP, Donal E, Kraigher-Krainer E, Vasan RS. Epidemiology and clinical course of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur J Heart Fail*. janv 2011;13(1):18-28.
30. Dunlay SM, Roger VL, Redfield MM. Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol*. 11 mai 2017;
31. Vinluan CM, Zreikat HH, Levy JR, Cheang KI. Comparison of different metabolic syndrome definitions and risks of incident cardiovascular events in the elderly. *Metabolism*. mars 2012;61(3):302-9.
32. Brede S, Serfling G, Klement J, Schmid SM, Lehnert H. Clinical Scenario of the Metabolic Syndrome. *Visc Med*. oct 2016;32(5):336-41.
33. Taube A, Schlich R, Sell H, Eckardt K, Eckel J. Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1 juin 2012;302(11):H2148-2165.
34. Cheng JM, Akkerhuis KM, Battes LC, van Vark LC, Hillege HL, Paulus WJ, et al. Biomarkers of heart failure with normal ejection fraction: a systematic review. *Eur J Heart Fail*. déc 2013;15(12):1350-62.
35. DuBrock HM, AbouEzzedine OF, Redfield MM. High-sensitivity C-reactive protein in heart failure with preserved ejection fraction. *PloS One*. 2018;13(8):e0201836.
36. Chirinos JA, Orlenko A, Zhao L, Basso MD, Cvijic ME, Li Z, et al. Multiple Plasma Biomarkers for Risk Stratification in Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol*. 24 mars 2020;75(11):1281-95.
37. Shah SJ, Marcus GM, Gerber IL, McKeown BH, Vessey JC, Jordan MV, et al. High-sensitivity C-reactive protein and parameters of left ventricular dysfunction. *J Card Fail*. févr 2006;12(1):61-5.
38. Westermann D, Lindner D, Kasner M, Zietsch C, Savvatis K, Escher F, et al. Cardiac inflammation contributes to changes in the extracellular matrix in patients with heart failure and normal ejection fraction. *Circ Heart Fail*. janv 2011;4(1):44-52.
39. Hahn VS, Yanek LR, Vaishnav J, Ying W, Vaidya D, Lee YZJ, et al. Endomyocardial Biopsy Characterization of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction and Prevalence of Cardiac Amyloidosis. *JACC Heart Fail*. sept 2020;8(9):712-24.

40. Mishra S, Kass DA. Cellular and molecular pathobiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol*. 11 janv 2021;
41. Mohammed SF, Hussain S, Mirzoyev SA, Edwards WD, Maleszewski JJ, Redfield MM. Coronary microvascular rarefaction and myocardial fibrosis in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation*. 10 févr 2015;131(6):550-9.
42. Kato S, Saito N, Kirigaya H, Gytoku D, Iinuma N, Kusakawa Y, et al. Impairment of Coronary Flow Reserve Evaluated by Phase Contrast Cine-Magnetic Resonance Imaging in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Heart Assoc*. 23 févr 2016;5(2).
43. Borlaug BA. The pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol*. sept 2014;11(9):507-15.
44. Weber KT, Brilla CG, Janicki JS. Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc Res*. mars 1993;27(3):341-8.
45. Levick SP, Widiapradja A. The Diabetic Cardiac Fibroblast: Mechanisms Underlying Phenotype and Function. *Int J Mol Sci*. 1 févr 2020;21(3).
46. Paulus WJ, Tschöpe C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol*. 23 juill 2013;62(4):263-71.
47. Ahmed SH, Clark LL, Pennington WR, Webb CS, Bonnema DD, Leonardi AH, et al. 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*. 2 mai 2006;113(17):2089-96.
48. Borbély A, van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer JGF, Edes I, Stienen GJM, et al. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation*. 15 févr 2005;111(6):774-81.
49. Zile MR, Baicu CF, Ikonomidis JS, Stroud RE, Nietert PJ, Bradshaw AD, et al. Myocardial stiffness in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: contributions of collagen and titin. *Circulation*. 7 avr 2015;131(14):1247-59.
50. Borbély A, Papp Z, Edes I, Paulus WJ. Molecular determinants of heart failure with normal left ventricular ejection fraction. *Pharmacol Rep PR*. févr 2009;61(1):139-45.
51. van Heerebeek L, Hamdani N, Falcão-Pires I, Leite-Moreira AF, Begieneman MPV, Bronzwaer JGF, et al. Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation*. 14 août 2012;126(7):830-9.
52. Franssen C, Chen S, Unger A, Korkmaz HI, De Keulenaer GW, Tschöpe C, et al. Myocardial Microvascular Inflammatory Endothelial Activation in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *JACC Heart Fail*. avr 2016;4(4):312-24.
53. van Heerebeek L, Borbély A, Niessen HWM, Bronzwaer JGF, van der Velden J, Stienen GJM, et al. Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation*. 25 avr 2006;113(16):1966-73.

54. Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol.* juill 2018;15(7):387-407.
55. Borlaug BA, Paulus WJ. Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Eur Heart J.* mars 2011;32(6):670-9.
56. Phan TT, Abozguia K, Nallur Shivu G, Mahadevan G, Ahmed I, Williams L, et al. Heart failure with preserved ejection fraction is characterized by dynamic impairment of active relaxation and contraction of the left ventricle on exercise and associated with myocardial energy deficiency. *J Am Coll Cardiol.* 28 juill 2009;54(5):402-9.
57. Smith CS, Bottomley PA, Schulman SP, Gerstenblith G, Weiss RG. Altered creatine kinase adenosine triphosphate kinetics in failing hypertrophied human myocardium. *Circulation.* 12 sept 2006;114(11):1151-8.
58. Jia G, DeMarco VG, Sowers JR. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol.* mars 2016;12(3):144-53.
59. Jia G, Hill MA, Sowers JR. Diabetic Cardiomyopathy: An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity. *Circ Res.* 16 févr 2018;122(4):624-38.
60. Meagher P, Adam M, Civitarese R, Bugyei-Twum A, Connelly KA. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction in Diabetes: Mechanisms and Management. *Can J Cardiol.* mai 2018;34(5):632-43.
61. Drosatos K, Schulze PC. Cardiac lipotoxicity: molecular pathways and therapeutic implications. *Curr Heart Fail Rep.* juin 2013;10(2):109-21.
62. Schiattarella GG, Altamirano F, Kim SY, Tong D, Ferdous A, Pirstine H, et al. Xbp1s-FoxO1 axis governs lipid accumulation and contractile performance in heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Commun.* 16 mars 2021;12(1):1684.
63. Cook SA, Varela-Carver A, Mongillo M, Kleinert C, Khan MT, Leccisotti L, et al. Abnormal myocardial insulin signalling in type 2 diabetes and left-ventricular dysfunction. *Eur Heart J.* janv 2010;31(1):100-11.
64. Srivaratharajah K, Coutinho T, deKemp R, Liu P, Haddad H, Stadnick E, et al. Reduced Myocardial Flow in Heart Failure Patients With Preserved Ejection Fraction. *Circ Heart Fail.* juill 2016;9(7).
65. Shah SJ, Lam CSP, Svedlund S, Saraste A, Hage C, Tan RS, et al. Prevalence and correlates of coronary microvascular dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction: PROMIS-HFpEF. *Eur Heart J.* 1 oct 2018;39(37):3439-50.
66. Dryer K, Gajjar M, Narang N, Lee M, Paul J, Shah AP, et al. Coronary microvascular dysfunction in patients with heart failure with preserved ejection fraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1 mai 2018;314(5):H1033-42.
67. Shome JS, Perera D, Plein S, Chiribiri A. Current perspectives in coronary microvascular dysfunction. *Microcirc N Y N 1994.* janv 2017;24(1).

68. Bhuiyan T, Maurer MS. Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: Persistent Diagnosis, Therapeutic Enigma. *Curr Cardiovasc Risk Rep.* oct 2011;5(5):440-9.
69. Lam CSP, Gamble GD, Ling LH, Sim D, Leong KTG, Yeo PSD, et al. Mortality associated with heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction in a prospective international multi-ethnic cohort study. *Eur Heart J.* 21 mai 2018;39(20):1770-80.
70. Yusuf S, Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJV, et al. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial. *Lancet Lond Engl.* 6 sept 2003;362(9386):777-81.
71. Massie BM, Carson PE, McMurray JJ, Komajda M, McKelvie R, Zile MR, et al. Irbesartan in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *N Engl J Med.* 4 déc 2008;359(23):2456-67.
72. Vaduganathan M, Patel RB, Michel A, Shah SJ, Senni M, Gheorghiade M, et al. Mode of Death in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol.* 7 févr 2017;69(5):556-69.
73. Lam CSP, Voors AA, de Boer RA, Solomon SD, van Veldhuisen DJ. Heart failure with preserved ejection fraction: from mechanisms to therapies. *Eur Heart J.* 7 août 2018;39(30):2780-92.
74. Ter Maaten JM, Damman K, Verhaar MC, Paulus WJ, Duncker DJ, Cheng C, et al. Connecting heart failure with preserved ejection fraction and renal dysfunction: the role of endothelial dysfunction and inflammation. *Eur J Heart Fail.* juin 2016;18(6):588-98.
75. Damman K, Testani JM. The kidney in heart failure: an update. *Eur Heart J.* 14 juin 2015;36(23):1437-44.
76. Lam CSP, Carson PE, Anand IS, Rector TS, Kuskowski M, Komajda M, et al. Sex differences in clinical characteristics and outcomes in elderly patients with heart failure and preserved ejection fraction: the Irbesartan in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction (I-PRESERVE) trial. *Circ Heart Fail.* 1 sept 2012;5(5):571-8.
77. Beale AL, Nanayakkara S, Kaye DM. Impact of Sex on Ventricular-Vascular Stiffness and Long-Term Outcomes in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: TOPCAT Trial Substudy. *J Am Heart Assoc.* 2 juill 2019;8(13):e012190.
78. Anker SD, Butler J, Filippatos G, Ferreira JP, Bocchi E, Böhm M, et al. Empagliflozin in Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction. *N Engl J Med.* 14 oct 2021;385(16):1451-61.
79. Loffredo FS, Nikolova AP, Pancoast JR, Lee RT. Heart failure with preserved ejection fraction: molecular pathways of the aging myocardium. *Circ Res.* 20 juin 2014;115(1):97-107.
80. Valero-Muñoz M, Backman W, Sam F. Murine Models of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: a « Fishing Expedition ». *JACC Basic Transl Sci.* déc 2017;2(6):770-89.

81. Doi R, Masuyama T, Yamamoto K, Doi Y, Mano T, Sakata Y, et al. Development of different phenotypes of hypertensive heart failure: systolic versus diastolic failure in Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens.* janv 2000;18(1):111-20.
82. Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas PS. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation.* 15 mai 1995;91(10):2642-54.
83. Carbone S, Mauro AG, Toldo S, Abbate A. Diet-Induced Obesity HFpEF Murine Models. *JACC Basic Transl Sci.* févr 2018;3(1):157.
84. Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Fairus A, Ima-Nirwana S. Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr Metab.* 2016;13:65.
85. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature.* 15 déc 2005;438(7070):946-53.
86. Tammela T, Alitalo K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell.* 19 févr 2010;140(4):460-76.
87. Aspelund A, Robciuc MR, Karaman S, Makinen T, Alitalo K. Lymphatic System in Cardiovascular Medicine. *Circ Res.* 5 févr 2016;118(3):515-30.
88. Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G, Gunn MD, et al. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J.* 2 avr 2002;21(7):1505-13.
89. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol.* janv 2004;5(1):74-80.
90. Karkkainen MJ, Ferrell RE, Lawrence EC, Kimak MA, Levinson KL, McTigue MA, et al. Missense mutations interfere with VEGFR-3 signalling in primary lymphoedema. *Nat Genet.* juin 2000;25(2):153-9.
91. Alitalo K. The lymphatic vasculature in disease. *Nat Med.* 7 nov 2011;17(11):1371-80.
92. Schwager S, Detmar M. Inflammation and Lymphatic Function. *Front Immunol.* 2019;10:308.
93. Yin N, Zhang N, Xu J, Shi Q, Ding Y, Bromberg JS. Targeting Lymphangiogenesis After Islet Transplantation Prolongs Islet Allograft Survival. *Transplantation.* 15 juill 2011;92(1):25-30.
94. Nykänen AI, Sandelin H, Krebs R, Keränen MAI, Tuuminen R, Kärpänen T, et al. Targeting lymphatic vessel activation and CCL21 production by vascular endothelial growth factor receptor-3 inhibition has novel immunomodulatory and antiarteriosclerotic effects in cardiac allografts. *Circulation.* 30 mars 2010;121(12):1413-22.

95. Mertlitz S, Shi Y, Kalupa M, Grötzinger C, Mengwasser J, Riesner K, et al. Lymphangiogenesis is a feature of acute GVHD, and VEGFR-3 inhibition protects against experimental GVHD. *Blood*. 30 mars 2017;129(13):1865-75.
96. Loukas M, Abel N, Tubbs RS, Grabska J, Birungi J, Anderson RH. The cardiac lymphatic system. *Clin Anat N Y N*. sept 2011;24(6):684-91.
97. Lupinski RW. Aortic fat pad and atrial fibrillation: cardiac lymphatics revisited. *ANZ J Surg*. févr 2009;79(1-2):70-4.
98. Brakenhielm E, Alitalo K. Cardiac lymphatics in health and disease. *Nat Rev Cardiol*. janv 2019;16(1):56-68.
99. Kholová I, Dragneva G, Cermáková P, Laidinen S, Kaskenpää N, Hazes T, et al. Lymphatic vasculature is increased in heart valves, ischaemic and inflamed hearts and in cholesterol-rich and calcified atherosclerotic lesions. *Eur J Clin Invest*. mai 2011;41(5):487-97.
100. Niinimäki E, Mennander AA, Paavonen T, Kholová I. Lymphangiogenesis is increased in heart valve endocarditis. *Int J Cardiol*. 15 sept 2016;219:317-21.
101. Dashkevich A, Bloch W, Antonyan A, Fries JUW, Geissler HJ. Morphological and quantitative changes of the initial myocardial lymphatics in terminal heart failure. *Lymphat Res Biol*. 2009;7(1):21-7.
102. Ebata R, Abe J, Yasukawa K, Hamada H, Higashi K, Suwazono Y, et al. Increased production of vascular endothelial growth factor-d and lymphangiogenesis in acute Kawasaki disease. *Circ J Off J Jpn Circ Soc*. 2011;75(6):1455-62.
103. Ishikawa Y, Akishima-Fukasawa Y, Ito K, Akasaka Y, Tanaka M, Shimokawa R, et al. Lymphangiogenesis in myocardial remodelling after infarction. *Histopathology*. sept 2007;51(3):345-53.
104. Klotz L, Norman S, Vieira JM, Masters M, Rohling M, Dubé KN, et al. Cardiac lymphatics are heterogeneous in origin and respond to injury. *Nature*. 4 juin 2015;522(7554):62-7.
105. Henri O, Poueche C, Houssari M, Galas L, Nicol L, Edwards-Lévy F, et al. Selective Stimulation of Cardiac Lymphangiogenesis Reduces Myocardial Edema and Fibrosis Leading to Improved Cardiac Function Following Myocardial Infarction. *Circulation*. 12 avr 2016;133(15):1484-97; discussion 1497.
106. Houssari M, Dumesnil A, Tardif V, Kivelä R, Pizzinat N, Boukhalfa I, et al. Lymphatic and Immune Cell Cross-Talk Regulates Cardiac Recovery After Experimental Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. juill 2020;40(7):1722-37.
107. Bizou M, Itier R, Majdoubi M, Abbadı D, Pichery E, Dutaur M, et al. Cardiac macrophage subsets differentially regulate lymphatic network remodeling during pressure overload. *Sci Rep*. 19 août 2021;11(1):16801.
108. Rademakers T, van der Vorst EPC, Daissormont ITMN, Otten JJT, Theodorou K, Theelen TL, et al. Adventitial lymphatic capillary expansion impacts on plaque T cell accumulation in atherosclerosis. *Sci Rep*. 28 mars 2017;7:45263.

109. Nakano T, Nakashima Y, Yonemitsu Y, Sumiyoshi S, Chen YX, Akishima Y, et al. Angiogenesis and lymphangiogenesis and expression of lymphangiogenic factors in the atherosclerotic intima of human coronary arteries. *Hum Pathol.* avr 2005;36(4):330-40.
110. Vieira JM, Norman S, Villa Del Campo C, Cahill TJ, Barnette DN, Gunadasa-Rohling M, et al. The cardiac lymphatic system stimulates resolution of inflammation following myocardial infarction. *J Clin Invest.* 1 août 2018;128(8):3402-12.
111. Vuorio T, Ylä-Herttuala E, Laakkonen JP, Laidinen S, Liimatainen T, Ylä-Herttuala S. Downregulation of VEGFR3 signaling alters cardiac lymphatic vessel organization and leads to a higher mortality after acute myocardial infarction. *Sci Rep.* 12 nov 2018;8(1):16709.
112. Harvey NL, Srinivasan RS, Dillard ME, Johnson NC, Witte MH, Boyd K, et al. Lymphatic vascular defects promoted by Prox1 haploinsufficiency cause adult-onset obesity. *Nat Genet.* oct 2005;37(10):1072-81.
113. Lim HY, Rutkowski JM, Helft J, Reddy ST, Swartz MA, Randolph GJ, et al. Hypercholesterolemic mice exhibit lymphatic vessel dysfunction and degeneration. *Am J Pathol.* sept 2009;175(3):1328-37.
114. García Nores GD, Cuzzone DA, Albano NJ, Hespe GE, Kataru RP, Torrisi JS, et al. Obesity but not high-fat diet impairs lymphatic function. *Int J Obes* 2005. oct 2016;40(10):1582-90.
115. Kataru RP, Park HJ, Baik JE, Li C, Shin J, Mehrara BJ. Regulation of Lymphatic Function in Obesity. *Front Physiol.* 2020;11:459.
116. Blum KS, Karaman S, Proulx ST, Ochsenbein AM, Luciani P, Leroux JC, et al. Chronic high-fat diet impairs collecting lymphatic vessel function in mice. *PloS One.* 2014;9(4):e94713.
117. Weitman ES, Aschen SZ, Farias-Eisner G, Albano N, Cuzzone DA, Ghanta S, et al. Obesity impairs lymphatic fluid transport and dendritic cell migration to lymph nodes. *PloS One.* 2013;8(8):e70703.
118. Torrisi JS, Hespe GE, Cuzzone DA, Savetsky IL, Nitti MD, Gardenier JC, et al. Inhibition of Inflammation and iNOS Improves Lymphatic Function in Obesity. *Sci Rep.* 22 janv 2016;6:19817.
119. Savetsky IL, Torrisi JS, Cuzzone DA, Ghanta S, Albano NJ, Gardenier JC, et al. Obesity increases inflammation and impairs lymphatic function in a mouse model of lymphedema. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 15 juill 2014;307(2):H165-172.
120. Clavin NW, Avraham T, Fernandez J, Daluvoy SV, Soares MA, Chaudhry A, et al. TGF-beta1 is a negative regulator of lymphatic regeneration during wound repair. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* nov 2008;295(5):H2113-2127.
121. Savetsky IL, Ghanta S, Gardenier JC, Torrisi JS, García Nores GD, Hespe GE, et al. Th2 cytokines inhibit lymphangiogenesis. *PloS One.* 2015;10(6):e0126908.

122. Shin K, Kataru RP, Park HJ, Kwon BI, Kim TW, Hong YK, et al. TH2 cells and their cytokines regulate formation and function of lymphatic vessels. *Nat Commun.* 4 févr 2015;6:6196.
123. Liao S, von der Weid PY. Inflammation-induced lymphangiogenesis and lymphatic dysfunction. *Angiogenesis.* avr 2014;17(2):325-34.
124. Zawieja SD, Gasheva O, Zawieja DC, Muthuchamy M. Blunted flow-mediated responses and diminished nitric oxide synthase expression in lymphatic thoracic ducts of a rat model of metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1 févr 2016;310(3):H385-393.
125. Zawieja SD, Wang W, Chakraborty S, Zawieja DC, Muthuchamy M. Macrophage alterations within the mesenteric lymphatic tissue are associated with impairment of lymphatic pump in metabolic syndrome. *Microcirc N Y N 1994.* oct 2016;23(7):558-70.
126. Zawieja SD, Wang W, Wu X, Nepiyushchikh ZV, Zawieja DC, Muthuchamy M. Impairments in the intrinsic contractility of mesenteric collecting lymphatics in a rat model of metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1 févr 2012;302(3):H643-653.
127. Zafar MI, Mills K, Ye X, Blakely B, Min J, Kong W, et al. Association between the expression of vascular endothelial growth factors and metabolic syndrome or its components: a systematic review and meta-analysis. *Diabetol Metab Syndr.* 2018;10:62.
128. Karaman S, Hollmén M, Robciuc MR, Alitalo A, Nurmi H, Morf B, et al. Blockade of VEGF-C and VEGF-D modulates adipose tissue inflammation and improves metabolic parameters under high-fat diet. *Mol Metab.* févr 2015;4(2):93-105.
129. Lachaux M, Soulié M, Hamzaoui M, Bailly A, Nicol L, Rémy-Jouet I, et al. Short-and long-term administration of imeglimin counters cardiorenal dysfunction in a rat model of metabolic syndrome. *Endocrinol Diabetes Metab.* juill 2020;3(3):e00128.
130. Carr MC. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab.* juin 2003;88(6):2404-11.
131. Gale SK, Van Itallie TB. Genetic obesity: estrogenic influences on the body weight and food intake of lean and obese adult Zucker (fa/fa) rats. *Physiol Behav.* juill 1979;23(1):111-20.
132. Shaw MA, Whitaker EM, Hervey E, Hervey GR. The effects of ovarian hormones on regulation of energy balance in Zucker rats. *J Endocrinol.* août 1983;98(2):165-71.
133. Mauvais-Jarvis F, Clegg DJ, Hevener AL. The Role of Estrogens in Control of Energy Balance and Glucose Homeostasis. *Endocr Rev.* juin 2013;34(3):309-38.
134. Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7 nov 2000;97(23):12729-34.
135. Rogers NH, Perfield JW, Strissel KJ, Obin MS, Greenberg AS. Reduced Energy Expenditure and Increased Inflammation Are Early Events in the Development of Ovariectomy-Induced Obesity. *Endocrinology.* mai 2009;150(5):2161-8.

136. Beale AL, Meyer P, Marwick TH, Lam CSP, Kaye DM. Sex Differences in Cardiovascular Pathophysiology: Why Women Are Overrepresented in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation*. 10 juill 2018;138(2):198-205.
137. Lam CSP, Arnott C, Beale AL, Chandramouli C, Hilfiker-Kleiner D, Kaye DM, et al. Sex differences in heart failure. *Eur Heart J*. 14 déc 2019;40(47):3859-3868c.
138. Redfield MM, Jacobsen SJ, Borlaug BA, Rodeheffer RJ, Kass DA. Age- and gender-related ventricular-vascular stiffening: a community-based study. *Circulation*. 11 oct 2005;112(15):2254-62.
139. Ho JE, Enserro D, Brouwers FP, Kizer JR, Shah SJ, Psaty BM, et al. Predicting Heart Failure With Preserved and Reduced Ejection Fraction: The International Collaboration on Heart Failure Subtypes. *Circ Heart Fail*. juin 2016;9(6):e003116.
140. Iorga A, Li J, Sharma S, Umar S, Bopassa JC, Nadadur RD, et al. Rescue of Pressure Overload-Induced Heart Failure by Estrogen Therapy. *J Am Heart Assoc*. 22 janv 2016;5(1):e002482.
141. Rossitto G, Mary S, McAllister C, Neves KB, Haddow L, Rocchiccioli JP, et al. Reduced Lymphatic Reserve in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol*. 15 déc 2020;76(24):2817-29.
142. Morfoisse F, Tatin F, Chaput B, Therville N, Vaysse C, Métivier R, et al. Lymphatic Vasculature Requires Estrogen Receptor- α Signaling to Protect From Lymphedema. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. juin 2018;38(6):1346-57.
143. Trincot CE, Xu W, Zhang H, Kulikauskas MR, Caranasos TG, Jensen BC, et al. Adrenomedullin Induces Cardiac Lymphangiogenesis After Myocardial Infarction and Regulates Cardiac Edema Via Connexin 43. *Circ Res*. 4 janv 2019;124(1):101-13.
144. Heron C, Dumesnil A, Houssari M, Renet S, Lebon A, Godefroy D, et al. Regulation and impact of cardiac lymphangiogenesis in pressure-overload-induced heart failure [Internet]. *BioRxiv*; 2021 avr [cité 30 sept 2021]. Disponible sur: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.04.27.441616>
145. Norden PR, Kume T. The Role of Lymphatic Vascular Function in Metabolic Disorders. *Front Physiol*. 2020;11:404.
146. Hespe GE, Kataru RP, Savetsky IL, García Nores GD, Torrisi JS, Nitti MD, et al. Exercise training improves obesity-related lymphatic dysfunction. *J Physiol*. 1 août 2016;594(15):4267-82.
147. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. août 2014;105(2):141-50.
148. Packer M, Lam CSP, Lund LH, Maurer MS, Borlaug BA. Characterization of the inflammatory-metabolic phenotype of heart failure with a preserved ejection fraction: a hypothesis to explain influence of sex on the evolution and potential treatment of the disease. *Eur J Heart Fail*. sept 2020;22(9):1551-67.

149. Guimbal S, Cornuault L, Rouault P, Hollier PL, Chapouly C, Bats ML, et al. Mast Cells Are the Trigger of Small Vessel Disease and Diastolic Dysfunction in Diabetic Obese Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* avr 2021;41(4):e193-207.
150. Ferrario CM, Jessup JA, Smith RD. Hemodynamic and hormonal patterns of untreated essential hypertension in men and women. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* déc 2013;7(6):293-305.
151. Zhao Z, Wang H, Jessup JA, Lindsey SH, Chappell MC, Groban L. Role of estrogen in diastolic dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1 mars 2014;306(5):H628-640.
152. Sickinghe AA, Korporaal SJA, den Ruijter HM, Kessler EL. Estrogen Contributions to Microvascular Dysfunction Evolving to Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Front Endocrinol.* 2019;10:442.
153. Nguyen ITN, Brandt MM, van de Wouw J, van Drie RWA, Wesseling M, Cramer MJ, et al. Both male and female obese ZSF1 rats develop cardiac dysfunction in obesity-induced heart failure with preserved ejection fraction. *PloS One.* 2020;15(5):e0232399.
154. Lopez Gelston CA, Balasubramanian D, Abouelkheir GR, Lopez AH, Hudson KR, Johnson ER, et al. Enhancing Renal Lymphatic Expansion Prevents Hypertension in Mice. *Circ Res.* 13 avr 2018;122(8):1094-101.
155. Sundström J, Risérus U, Byberg L, Zethelius B, Lithell H, Lind L. Clinical value of the metabolic syndrome for long term prediction of total and cardiovascular mortality: prospective, population based cohort study. *BMJ.* 15 avr 2006;332(7546):878-82.
156. Forti P, Pirazzoli GL, Maltoni B, Bianchi G, Magalotti D, Muscari A, et al. Metabolic syndrome and all-cause mortality in older men and women: Metabolic Syndrome And Mortality In Older Age. *Eur J Clin Invest.* sept 2012;42(9):1000-9.
157. He D, Zhang X, Chen S, Dai C, Wu Q, Zhou Y, et al. Dynamic Changes of Metabolic Syndrome Alter the Risks of Cardiovascular Diseases and All-Cause Mortality: Evidence From a Prospective Cohort Study. *Front Cardiovasc Med.* 4 août 2021;8:706999.
158. The GBD 2015 Obesity Collaborators. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med.* 6 juill 2017;377(1):13-27.
159. Lam CSP, Arnott C, Beale AL, Chandramouli C, Hilfiker-Kleiner D, Kaye DM, et al. Sex differences in heart failure. *Eur Heart J.* 14 déc 2019;40(47):3859-3868c.
160. Borlaug BA. The pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol.* sept 2014;11(9):507-15.
161. Obokata M, Reddy YNV, Pislaru SV, Melenovsky V, Borlaug BA. Evidence Supporting the Existence of a Distinct Obese Phenotype of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation.* 4 juill 2017;136(1):6-19.
162. Sorimachi H, Obokata M, Takahashi N, Reddy YNV, Jain CC, Verbrugge FH, et al. Pathophysiologic importance of visceral adipose tissue in women with heart failure and preserved ejection fraction. *Eur Heart J.* 21 avr 2021;42(16):1595-605.

163. Paulus WJ, Tschöpe C. A Novel Paradigm for Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol.* juill 2013;62(4):263-71.
164. Cuijpers I, Simmonds SJ, van Bilsen M, Czarnowska E, González Miqueo A, Heymans S, et al. Microvascular and lymphatic dysfunction in HFpEF and its associated comorbidities. *Basic Res Cardiol.* 25 2020;115(4):39.
165. Henri O, Poueche C, Houssari M, Galas L, Nicol L, Edwards-Lévy F, et al. Selective Stimulation of Cardiac Lymphangiogenesis Reduces Myocardial Edema and Fibrosis Leading to Improved Cardiac Function Following Myocardial Infarction. *Circulation.* 12 avr 2016;133(15):1484-97; discussion 1497.
166. Houssari M, Dumesnil A, Tardif V, Kivelä R, Pizzinat N, Boukhalfa I, et al. Lymphatic and Immune Cell Cross-Talk Regulates Cardiac Recovery After Experimental Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(7):1722-37.
167. Chakraborty S, Zawieja S, Wang W, Zawieja DC, Muthuchamy M. Lymphatic system: a vital link between metabolic syndrome and inflammation: Roles of lymphatics in metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* oct 2010;1207:E94-102.
168. Scallan JP, Zawieja SD, Castorena-Gonzalez JA, Davis MJ. Lymphatic pumping: mechanics, mechanisms and malfunction: Lymphatic pumping mechanisms. *J Physiol.* 15 oct 2016;594(20):5749-68.
169. Lim HY, Rutkowski JM, Helft J, Reddy ST, Swartz MA, Randolph GJ, et al. Hypercholesterolemic mice exhibit lymphatic vessel dysfunction and degeneration. *Am J Pathol.* sept 2009;175(3):1328-37.
170. Morfoisse F, Tatin F, Chaput B, Therville N, Vaysse C, Métivier R, et al. Lymphatic Vasculature Requires Estrogen Receptor- α Signaling to Protect From Lymphedema. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* juin 2018;38(6):1346-57.
171. Trincot CE, Xu W, Zhang H, Kulikauskas MR, Caranasos TG, Jensen BC, et al. Adrenomedullin Induces Cardiac Lymphangiogenesis After Myocardial Infarction and Regulates Cardiac Edema Via Connexin 43. *Circ Res.* 4 janv 2019;124(1):101-13.
172. Dubois C, Rocks N, Blacher S, Primac I, Gallez A, García-Caballero M, et al. Lymph/angiogenesis contributes to sex differences in lung cancer through oestrogen receptor alpha signalling. *Endocr Relat Cancer.* févr 2019;26(2):201-16.
173. Brakenhielm E, Alitalo K. Cardiac lymphatics in health and disease. *Nat Rev Cardiol.* janv 2019;16(1):56-68.
174. Brakenhielm E, González A, Díez J. Role of Cardiac Lymphatics in Myocardial Edema and Fibrosis: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol.* 11 août 2020;76(6):735-44.
175. Fudim M, Salah HM, Sathananthan J, Bernier M, Pabon-Ramos W, Schwartz RS, et al. Lymphatic Dysregulation in Patients With Heart Failure. *J Am Coll Cardiol.* juill 2021;78(1):66-76.

176. Rossitto G, Mary S, McAllister C, Neves KB, Haddow L, Rocchiccioli JP, et al. Reduced Lymphatic Reserve in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol*. déc 2020;76(24):2817-29.
177. Medina-Contreras J, Villalobos-Molina R, Zarain-Herzberg A, Balderas-Villalobos J. Ovariectomized rodents as a menopausal metabolic syndrome model. A minireview. *Mol Cell Biochem*. déc 2020;475(1-2):261-76.
178. Lachaux M, Soulié M, Hamzaoui M, Bailly A, Nicol L, Rémy-Jouet I, et al. Short-and long-term administration of imeglimin counters cardiorenal dysfunction in a rat model of metabolic syndrome. *Endocrinol Diabetes Metab*. juill 2020;3(3):e00128.
179. Barnett-Vanes A, Sharrock A, Birrell MA, Rankin S. A Single 9-Colour Flow Cytometric Method to Characterise Major Leukocyte Populations in the Rat: Validation in a Model of LPS-Induced Pulmonary Inflammation. Sanchez-Margalet V, éditeur. *PLOS ONE*. 14 janv 2016;11(1):e0142520.
180. Zucker TF, Zucker LM. Fat Accretion and Growth in the Rat. *Obes Res*. janv 1996;4(1):102-8.
181. Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Mostefai HA, Tesse A, Mulder P, Rouet P, et al. Red Wine Polyphenols Prevent Metabolic and Cardiovascular Alterations Associated with Obesity in Zucker Fatty Rats (Fa/Fa). Polidori C, éditeur. *PLoS ONE*. 18 mai 2009;4(5):e5557.
182. Favre J, Gao J, Henry JP, Remy-Jouet I, Fourquaux I, Billon-Gales A, et al. Endothelial Estrogen Receptor α Plays an Essential Role in the Coronary and Myocardial Protective Effects of Estradiol in Ischemia/Reperfusion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. déc 2010;30(12):2562-7.
183. Heron C, Dumesnil A, Houssari M, Renet S, Lebon A, Godefroy D, et al. Regulation and impact of cardiac lymphangiogenesis in pressure-overload-induced heart failure [Internet]. *Physiology*; 2021 avr [cité 30 sept 2021]. Disponible sur: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.04.27.441616>
184. Wu CH, Chi JC, Jerng JS, Lin SJ, Jan KM, Wang DL, et al. Transendothelial macromolecular transport in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. août 1990;16(2):154-61.
185. Chinnakkannu P, Reese C, Gaspar JA, Panneerselvam S, Pleasant-Jenkins D, Mukherjee R, et al. Suppression of angiotensin II-induced pathological changes in heart and kidney by the caveolin-1 scaffolding domain peptide. *PloS One*. 2018;13(12):e0207844.
186. Zucker LM. Hereditary obesity in the rat associated with hyperlipemia. *Ann N Y Acad Sci*. oct 1965;131(1 Adipose Tissu):447-58.
187. Vieira JM, Norman S, Villa Del Campo C, Cahill TJ, Barnette DN, Gunadasa-Rohling M, et al. The cardiac lymphatic system stimulates resolution of inflammation following myocardial infarction. *J Clin Invest*. 1 août 2018;128(8):3402-12.

188. Bizou M, Itier R, Majdoubi M, Abbadi D, Pichery E, Dutaur M, et al. Cardiac macrophage subsets differentially regulate lymphatic network remodeling during pressure overload. *Sci Rep.* 19 août 2021;11(1):16801.
189. López B, Ravassa S, Moreno MU, José GS, Beaumont J, González A, et al. Diffuse myocardial fibrosis: mechanisms, diagnosis and therapeutic approaches. *Nat Rev Cardiol.* 10 févr 2021;
190. Zhou X, Ma L, Habibi J, Whaley-Connell A, Hayden MR, Tilmon RD, et al. Nebivolol improves diastolic dysfunction and myocardial remodeling through reductions in oxidative stress in the Zucker obese rat. *Hypertens Dallas Tex 1979.* avr 2010;55(4):880-8.
191. Nguyen ITN, Brandt MM, van de Wouw J, van Drie RWA, Wesseling M, Cramer MJ, et al. Both male and female obese ZSF1 rats develop cardiac dysfunction in obesity-induced heart failure with preserved ejection fraction. *Lionetti V, éditeur. PLOS ONE.* 6 mai 2020;15(5):e0232399.
192. Sickinghe AA, Korporaal SJA, den Ruijter HM, Kessler EL. Estrogen Contributions to Microvascular Dysfunction Evolving to Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Front Endocrinol.* 3 juill 2019;10:442.
193. Eaton CB, Pettinger M, Rossouw J, Martin LW, Foraker R, Quddus A, et al. Risk Factors for Incident Hospitalized Heart Failure With Preserved Versus Reduced Ejection Fraction in a Multiracial Cohort of Postmenopausal Women. *Circ Heart Fail [Internet].* oct 2016 [cité 1 sept 2021];9(10). Disponible sur: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002883>
194. Zhao D, Guallar E, Ballantyne CM, Post WS, Ouyang P, Vaidya D, et al. Sex Hormones and Incident Heart Failure in Men and Postmenopausal Women: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 oct 2020;105(10):e3798-807.
195. Savji N, Meijers WC, Bartz TM, Bhambhani V, Cushman M, Naylor M, et al. The Association of Obesity and Cardiometabolic Traits With Incident HFpEF and HFrEF. *JACC Heart Fail.* août 2018;6(8):701-9.
196. Gale SK, Van Itallie TB. Genetic obesity: Estrogenic influences on the body weight and food intake of lean and obese adult Zucker (fa/fa) rats. *Physiol Behav.* juill 1979;23(1):111-20.
197. Olster DH, Auerbach ID. Deficits in Progesterone-Facilitated Sexual Behaviors and Forebrain Estrogen and Progestin Receptors in Obese Female Zucker Rats. *Neuroendocrinology.* 2000;72(6):350-9.
198. Gades MD, Stern JS, van Goor H, Nguyen D, Johnson PR, Kaysen GA. Estrogen accelerates the development of renal disease in female obese Zucker rats. *Kidney Int.* janv 1998;53(1):130-5.
199. Mohammed SF, Hussain S, Mirzoyev SA, Edwards WD, Maleszewski JJ, Redfield MM. Coronary Microvascular Rarefaction and Myocardial Fibrosis in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation.* 10 févr 2015;131(6):550-9.

200. Iorga A, Li J, Sharma S, Umar S, Bopassa JC, Nadadur RD, et al. Rescue of Pressure Overload-Induced Heart Failure by Estrogen Therapy. *J Am Heart Assoc.* 22 janv 2016;5(1):e002482.
201. Katz DH, Beussink L, Sauer AJ, Freed BH, Burke MA, Shah SJ. Prevalence, clinical characteristics, and outcomes associated with eccentric versus concentric left ventricular hypertrophy in heart failure with preserved ejection fraction. *Am J Cardiol.* 15 oct 2013;112(8):1158-64.
202. Chirinos JA, Orlenko A, Zhao L, Basso MD, Cvijic ME, Li Z, et al. Multiple Plasma Biomarkers for Risk Stratification in Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol.* mars 2020;75(11):1281-95.
203. Packer M, Lam CSP, Lund LH, Maurer MS, Borlaug BA. Characterization of the inflammatory-metabolic phenotype of heart failure with a preserved ejection fraction: a hypothesis to explain influence of sex on the evolution and potential treatment of the disease. *Eur J Heart Fail.* sept 2020;22(9):1551-67.
204. Lopez Gelston CA, Balasubramanian D, Abouelkheir GR, Lopez AH, Hudson KR, Johnson ER, et al. Enhancing Renal Lymphatic Expansion Prevents Hypertension in Mice. *Circ Res.* 13 avr 2018;122(8):1094-101.
205. Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Description of a new method of ovariectomy in female rats. *Rev Bras Reumatol.* juin 2012;52(3):462-70.
206. Banquet S, Gomez E, Nicol L, Edwards-Lévy F, Henry JP, Cao R, et al. Arteriogenic therapy by intramyocardial sustained delivery of a novel growth factor combination prevents chronic heart failure. *Circulation.* 30 août 2011;124(9):1059-69.

Annexes

Annexe 1 : Article en cours de soumission

Sexual dimorphism in cardiac lymphangiogenesis in a metabolic-syndrome rat model of HFpEF

Chiavelli H^{1*}, Tardif V^{1*}, Lachaux M¹, Nicol L¹, Valet M¹, Dumesnil A¹, Renet S¹, Godefroy D², Schapman D³, Riou G⁴, Brunel V⁵, Soulie M¹, Henry JP¹, Richard V¹, Fraineau S¹, Mulder P¹ & Brakenhielm E¹

¹Normandy University, UniRouen, Inserm (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) UMR1096 (EnVI Laboratory), FHU CARNAVAL, Rouen, France

²Normandy University, UniRouen, Inserm UMR1239 (DC2N Laboratory), Mont Saint Aignan, France

³Normandy University, UniRouen, PRIMACEN, Mont Saint Aignan, France

⁴Normandy University, UniRouen, Inserm (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) UMR1234 (PANTHER Laboratory), Rouen, France

⁵Biochemistry Department, Rouen University Hospital, Rouen, France

Keywords: Hypertrophy, inflammation, diastolic dysfunction, fibrosis

Running title: Gender-dependent mechanisms of diastolic dysfunction

Corresponding author: Dr. Ebba Brakenhielm, Inserm UMR1096, Normandy University, UniRouen, Faculty of Pharmacy and Medicine, 22 Boulevard Gambetta, 76183 Rouen, France Tel. +33-235-148370; Fax +33-235-148365; email: ebba.brakenhielm@inserm.fr
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3378-8300>

The authors declare that no conflict of interest exists

Abstract

Background: Metabolic Syndrome (MetS), together with female sex and advanced age, are major risk factors for heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF). The paucity of therapeutic strategies to reduce HFpEF morbi-mortality underscores the need for improved mechanistic understanding of diastolic dysfunction. Recent studies have revealed that MetS leads to systemic lymphatic dysfunction in mice and men. However, the potential impact of MetS on cardiac lymphatics has never been investigated. In this study, we examined cardiac microvascular and lymphatic remodeling in rats with MetS-induced diastolic dysfunction to unravel potential gender differences.

Methods: 75 male and female (ovariectomized (ovx) or not) Zucker fatty (ZF) rats and 56 gender-matched controls (Zucker Lean) were investigated. Cardiovascular function was assessed by echocardiography, MRI, hemodynamics, and *ex vivo* arteriography. Left ventricular (LV) hypertrophy, blood microvascular and lymphatic remodeling, and fibrosis were evaluated by histology. Myocardial inflammation was evaluated by flow cytometry, and gene expression by RTqPCR.

Results: At 24-weeks, ZF, but not Lean rats, displayed MetS including obesity, dyslipidemia, moderate arterial hypertension, and slight hyperglycemia, notably in males. MetS was associated with moderate cardiac hypertrophy and pronounced diastolic dysfunction, including increased LV pressure and impaired relaxation. All these parameters were comparable in male and female ZF rats, with no further aggravation by ovx. In contrast, basal myocardial perfusion and coronary reactivity were reduced only in ZF males, while rarefaction of myocardial blood microvessels and lymphatics only occurred in ZF females, notably in ovx ZF. Cardiac immune cell levels were increased only in ovx ZF rats. Diffuse interstitial and perivascular cardiac fibrosis occurred in all ZF rats.

Conclusion: In this new model of MetS-induced diastolic dysfunction in "menopausal" female rats, we demonstrate, for the first-time, sexual dimorphism in the vascular response to MetS: whereas cardiac remodeling and dysfunction were comparable, only ZF males displayed myocardial macrovascular endothelial dysfunction, while rarefaction of blood microvasculature and lymphatics only occurred in ovx. ZF females concomitant with disrupted cardiac immune cell homeostasis.

Introduction

Metabolic syndrome (MetS), including central obesity, dyslipidemia, hyperglycemia and insulin resistance, and arterial hypertension, increases cardiovascular morbidity and mortality(155–157). The alarming surge in the prevalence of MetS in many countries(158), together with the general ageing of the population, are expected to increase the prevalence of heart disease, notably Heart Failure with preserved Ejection Fraction (HFpEF). HFpEF is twice as common in postmenopausal women, as compared to age-matched men(159). Beyond gender and age, major HFpEF risk factors include atrial fibrillation and MetS, especially chronic arterial hypertension and central obesity(160–162). Current treatment strategies for HFpEF remain insufficient, linked to incomplete understanding of the disease-specific mechanisms. One current hypothesis is that blood microvascular dysfunction and/or rarefaction in the heart, induced by low-grade systemic inflammation, may contribute to HFpEF development(163,164). We and others recently demonstrated that cardiac lymphatic dysfunction aggravates chronic edema and inflammation in the heart after myocardial infarction (MI) in rodents(165,166). Similarly, systemic lymphatic dysfunction has been described in animals with components of MetS(164,167,168). For example, hypercholesterolemia leads to lymphatic capillary hyperplasia and dermal backflow of lymph, resulting in poor lymphatic transport of immune cells in ApoE-deficient mice(169). In addition, recent studies point to potential sex-differences in lymphatics(170–172). In contrast, there is little clinical data on lymphatic function in patients with heart failure(173–175). This is surprising given the preponderant place congestion has in clinical diagnosis and the key role of inflammation in heart failure pathogenesis. Interestingly, dermal lymphatic remodeling and transport dysfunction were recently reported in HFpEF patients(176). However, it remains unknown whether cardiac lymphatics are altered in MetS, and further whether insufficient lymphatic drainage of the heart may contribute to HFpEF pathophysiology in patients with MetS. We hypothesized that cardiac lymphatic remodeling in the setting of MetS-induced cardiac hypertrophy may slow resolution of edema and inflammation in the heart and thus contribute to HFpEF development. In the current study, male and female Zucker Lean (*Fa/fa*) and genetically obese Zucker fatty (*fa/fa*, ZF) rats were used to investigate the mechanisms underlying MetS-induced diastolic dysfunction to uncover the early steps in HFpEF pathogenesis. Our main focus was to investigate sex-dependent

remodeling of myocardial blood vessels and lymphatics. Further, to specifically address the potential aggravating effects of menopause, ovariectomy was performed at 6-7 weeks-of-age in Zucker Lean and ZF female rats.

Materials & Methods

Adult male and female Zucker Lean and Fatty (ZF) rats (Charles River Laboratories, France) were used in this study. To modelize menopause(177), females underwent ovariectomy through a minimally invasive procedure. For details see *Suppl. Methods*.

Study approval

Animal experiments performed in this study were submitted to the regional Normandy ethics review board in line with E.U and French legislation (CENOMEXA n°54 #05 231.01 and APAFIS #21430-2019071015049227 v2). A total of 131 rats were included in the study.

Cardiovascular functional, cellular and molecular analyses

Cardiac function was evaluated by echocardiography, MRI, and hemodynamic analyses(165,178). Septal coronary arteries were assessed by *ex vivo* arteriography(178). Cardiac sections were analyzed by histology and immunohistochemistry to determine lymphatic and blood vessel densities and sizes, immune cell infiltration, cardiomyocyte hypertrophy, and fibrosis(165). Whole mount-staining of cardiac lymphatics was performed, followed by a modified iDISCO+ clearing protocol for imaging by lightsheet (ultramicroscope II, LaVision BioTec) and confocal laser scanning (Leica SP8) microscopy(166). Cardiac gene expression was analyzed by RTqPCR(166). Sources of antibodies and other reagents are listed in Supplementary methods (supplementary tables 1-5). For details see *Suppl. Methods*.

Flow-cytometry

Cardiac immune cells were analyzed by flow cytometry using a **LSRFortessa** (BD Biosciences) cytometer using an 9-color panel as described(179). Results are expressed as *cells per mg* cardiac tissue. For details see *Suppl. Methods*.

Plasma biochemistry

Blood samples, obtained after overnight fasting, were prepared with either EDTA or heparin for generation of plasma samples, which were processed by standardized

biochemical assays to determine plasma glucose, triglyceride, cholesterol, insulin, and creatinine levels. To evaluate insulin sensitivity, glucose tolerance test (GTT) was performed as described(178). For details see *Suppl. Methods*.

Statistics

Data are presented as mean \pm s.e.m. Comparisons were selected to determine: 1) impact of pathology (healthy Lean vs. ZF male or female); 2) effect of intervention (ovx vs. non-ovx in female Lean controls or ZF rats). Statistical analyses for comparisons of two independent groups were performed using either Student's two-tailed t-test for groups with normal distribution, or alternatively by Mann Whitney U test for samples where normality could not be ascertained based on D'Agostino & Pearson omnibus normality test. For comparisons of three groups or more either One-way ANOVA followed by Sidak's posthoc for pair-wise comparisons (for parameters with $n > 7$ with normal distribution), or alternatively Kruskal-Wallis nonparametric analysis followed by Dunn's posthoc multiple comparison (for parameters with non-Gaussian distribution) were performed. Gene expression data were analyzed by Two-way ANOVA followed by Sidak's posthoc for pair-wise comparisons or Dunnett's posthoc to compare 3 groups. Non-parametric Spearman rank order tests were used for evaluating correlations. All analyses were performed using GraphPad Prism software.

Results

Metabolic syndrome in male and female ZF rats

At the onset of the study, at 8 weeks of age, male Lean rats weighed more than female Lean animals, while the body weights of obese ZF rats were comparable between genders (**Suppl. Fig 1a**). Ovariectomy (ovx.) significantly accelerated body weight gain in Lean females and, starting from 14 weeks, ovx Lean rats weighed on average 25% more than non-ovx Lean females (**Suppl. Fig 1b**). In contrast, the weight gain in female ZF rats was unaffected by ovx throughout the study (**Suppl. Fig 1c**). By 24 weeks, male ZF weighed 40% more than their Lean controls, whereas female ZF rats had almost doubled their body weight as compared to their respective Lean controls (**Fig. 1a**). This major increase in body weight in ZF rats was due to a ~5-fold increase in body fat content (**Suppl. Fig 1d**), as described(180). In contrast, while tibia lengths were not different between Lean and ZF groups in males and non-ovx. females, ovx. Lean females displayed more rapid growth than ovx ZF (**Suppl. Fig 1e**). OvX was equally effective in both Lean and ZF rats to reduce uterine mass (**Suppl. Fig 1f**). Further, while ZF rats of both genders were hypertriglyceridemic and hypercholesterolemic, fasting blood glucose was unaltered as compared to Lean controls (**table 1**), as described(181). However, glucose tolerance test (GTT) uncovered glucose intolerance with delayed glucose plasma clearance in ZF (**Suppl. Fig. 2**). Indeed, area under the curve (AUC) analyses revealed elevated plasma glucose in male and ovx. female ZF rats, but not in non-ovx ZF females (**Fig. 1b**). Similarly, ovariectomy in Lean females slightly increased plasma glucose levels during GTT, as compared to non-ovx Lean. Analyses of systemic arterial blood pressure demonstrated moderate hypertension in all ZF rats, with no aggravating effect of ovx (**Suppl. Fig. 3a-c**). Notably, systolic blood pressure increased in ZF rats by 24 ± 3 mmHg as compared to their respective Lean controls (**Fig. 1c**). Taken together, both male and female ZF rat displayed comparable severity of MetS, with no major effect on these parameters by the lack of gonadal hormones in obese ZF females.

Comparable cardiac hypertrophy and diastolic dysfunction in male and female rats with metabolic syndrome

Echocardiography at 24 weeks revealed no signs of left ventricular (LV) systolic cardiac dysfunction. Indeed, cardiac output and ejection fraction in all ZF rats were comparable

to Lean controls (**table 2**), although ovx. ZF female rats displayed significant thickening of the anterior cardiac wall (AWT ES), indicative of cardiac hypertrophy. Morphometry, performed at 24 weeks, demonstrated moderate cardiac hypertrophy in all ZF rats, with no aggravating effect of ovx. (**Fig. 1d**). However, in Lean females, ovx. increased cardiac weight by about 10% as compared to intact Lean females. The LV weights, normalized to tibia length, were increased by $20 \pm 6\%$, $44 \pm 11\%$, and $32 \pm 11\%$ in male, non-ovx, and ovx ZF females respectively, as compared to their respective Lean controls (**Fig. 1e**). Similarly, right ventricular (RV) weight was increased in all ZF rats, whereas pulmonary weight was not altered, indicating absence of pulmonary edema (**Fig. 1f, g**). Histological analyses confirmed cardiac hypertrophy in all ZF rats, and cardiomyocyte sizes were increased by $14 \pm 7\%$, $25 \pm 9\%$, and $17 \pm 11\%$ in male, non-ovx, and ovx ZF females respectively, as compared to their Lean controls (**Fig. 1h, i, Suppl. Fig. 3d**). Ovx. did not increase cardiomyocyte sizes in either Lean or ZF rats. Hemodynamic analyses revealed increased LV pressures, notably systolic, in all ZF rats, as compared to their respective Lean controls (**Fig. 2a, b**). The **time constant for isovolumetric relaxation**, tau, was increased in all ZF as compared to their Lean controls (**Fig. 2c**), indicating diastolic dysfunction. Similarly, analyses of LV pressure-volume relations (PVR) also demonstrated diastolic dysfunction, with elevated LV EDPVR in both male and female ZF rats (**Fig. 2d**). In contrast, systolic function, indicated by LV ESPVR, was unaltered (**Fig. 2e**). Further, in agreement with pronounced diastolic cardiac dysfunction, and potential sarcopenia, exercise capacity was severely reduced in both male and female ZF rats, as evaluated by treadmill (**Fig. 2f**). Taken together, while cardiac hypertrophy was most marked in female ZF rats, with no further aggravation by ovx., diastolic dysfunction was similar in ZF rats of both genders.

Reduction of cardiac perfusion and coronary endothelial reactivity, and development of myocardial capillary rarefaction in ZF rats

Next, to determine the mechanisms underlying diastolic dysfunction in ZF rats, cardiac perfusion was analyzed by MRI. Baseline myocardial perfusion was slightly reduced ($-15 \pm 4\%$, $p=0.01$) in male ZF rats versus Lean controls, as previously described(178). In contrast, female ZF rats, whether ovx or not, had unaltered basal cardiac perfusion (**Fig. 3a**). However, the coronary reserve (*i.e.* difference between basal and stimulated myocardial perfusion induced by adenosine stimulation (achieved by dipyridole

treatment)) was reduced by ovx. in both Lean and ZF females, as compared to non-ovx Lean controls (Fig. 3b, c). In accord with reduced myocardial perfusion, ZF males displayed severe coronary dysfunction, as assessed *ex vivo* by arteriography with Acetylcholine (ACh)-induced endothelial relaxation (Fig. 3d). While cardiac perfusion was not significantly altered in non-ovx. ZF females, arteriography revealed mild coronary endothelial dysfunction (Fig. 3e). Interestingly, in line with our findings of altered coronary perfusion reserve following ovx, and with the noted protective effects of estrogen on endothelial function(177,182), the coronary reactivity to ACh in ovx. Lean controls was reduced as compared to non-ovx. Lean females (Suppl. Fig. 4). Hence, following ovariectomy, there was no difference in vasoreactivity between Lean and ZF female ovx. rats (Fig. 3f).

The reduction in coronary reserve in patients with HFpEF has been suggested to reflect microvascular rarefaction(163,164). Thus, we next evaluated myocardial blood vessel density in 24 weeks-old Lean and ZF rats. Whereas vessel density was unaltered in male ZF rats, there was capillary rarefaction in non-ovx. female ZF rats as compared to their Lean controls (Fig. 3g, h). In agreement, vessel to cardiomyocyte (V/CM) ratios tended to be reduced (Fig. 3i). Ovariectomy strikingly reduced capillary density ($-22\pm 7\%$), as well as V/CM ratios, in both Lean and ZF ovx. females, as compared to non-ovx Lean female rats. Notably, there was no further aggravation of vascular rarefaction in ovx. ZF rats as compared to ovx Lean females. In contrast, myocardial arteriolar size profiles remained unaltered (*data not shown*). Taken together, while male rats with MetS suffered from macrovascular coronary endothelial dysfunction and reduced baseline perfusion, female ovx. ZF rats displayed myocardial microvascular rarefaction and reduced coronary reserve capacity. Strikingly, ovariectomy had similar effects in Lean females, suggesting that hormonal, rather than metabolic (hyperglycemia, hyperlipidemia) factors may underlie these vascular alterations in the heart.

Reduced cardiac lymphatic density in female ZF rats but absence of myocardial edema

Recently, we and others reported that cardiac lymphatic remodeling occurs not only post-MI but also during cardiac hypertrophy in response to pressure-overload in mice (183). To investigate whether remodeling of cardiac lymphatics similarly occurred during MetS-induced cardiac hypertrophy in ZF rats, immunohistochemistry was

performed at 24 weeks in both tissue sections and cardiac whole mounts, as described(165). Lightsheet imaging revealed lymphatic capillary remodeling only in female, but not male, ZF rats, as compared to Lean controls (Fig. 4a). In agreement, histological analyses uncovered reduced cardiac lymphatic density in both non-ovx. and ovx. female ZF (Fig. 4b). The suppressive effects seemed additive between MetS and ovariectomy, as the phenotype was most pronounced in ovx. ZF females. Quantification of lymphatic vessel diameters revealed a tendency for lymphatic hyperplasia only in non-ovx. ZF females (Fig. 4c). Analyses of cardiac gene expression of key lymphangiogenic regulators, *Vegfc* and *Vegfd*, revealed a striking increase in ZF males, but not in ovx. ZF females (Fig. 4d, e), despite their similar degree of LV hypertrophy.

One main function of cardiac lymphatics is to regulate myocardial fluid balance. As edema reflects an imbalance between blood vascular leakage and lymphatic returns, we expected that the reduction in cardiac lymphatic density, notably in ovx. ZF females, may lead to myocardial edema. In addition, given that ZF rats were moderately hypertensive, we postulated that vascular leakage may be increased, as described in other MetS or hypertensive rodent models (184,185). Thus, we next investigated *vascular permeability*, using a modified Miles assay, and *tissue water content*, using microgravimetry as described(165). We found that increased vascular leakage only occurred in the kidneys in ZF ovx females, but not in the heart or lungs (Fig. 4f). Concordantly, despite the reduced cardiac lymphatic density in ZF ovx females, there was no increase in myocardial water content (Fig. 4g). Indeed, water content was reduced rather than increased in the heart. Similarly, liver water content was reduced in ZF rats, likely reflecting altered tissue composition with steatosis. In contrast, renal water content was increased in ovx ZF rats, in line with increased kidney vascular endothelial permeability. These data are in accordance with the diffuse nephropathy and albuminuria previously described in ZF rats (178,186), confirmed in our study by morphometric evaluations revealing slight renal hypertrophy at 24 weeks (Suppl. Fig. 5a). Notably, renal histological changes, indicative of nephropathy with vascular and tubulointerstitial pathology, were similar in male and female ZF rats, with no aggravating effect of ovx (Suppl. Fig. 5b-d).

Cardiac inflammation only in female ZF rats

To investigate whether the rarefaction of myocardial microvessels and lymphatics, notably in ovx. females, was accompanied by cardiac inflammation, multiparametric

flow cytometry (Suppl Fig. 6a) of digested rat hearts was performed at 24 weeks, as described (179). While cardiac immune cell levels were unaltered in male ZF as compared to their Lean controls, female ovx ZF rats displayed markedly increased cardiac immune cell levels (+86% \pm 16 CD45⁺ cells/mg) as compared to ovx Lean (Fig. 5a). This was largely due to an increase in cardiac myeloid cell populations, including monocytes (Fig. 5b). Indeed, there was more than a doubling of the cardiac levels of most myeloid cell subpopulations, including His48⁺ classical monocytes, granulocytes, and dendritic cells, as compared to ovx. Lean controls (Fig. 5c, Suppl. Fig 6b). Further, there was a slight increase in cardiac-infiltrating CD4⁺ T cells in female ovx ZF rats, while total B and T lymphocyte levels remained unaltered (Fig. 5c). Surprisingly, cardiac macrophage densities, evaluated by immunohistochemistry, were not increased in either male or female ZF, as compared to their respective Lean controls (Fig. 5d, e). However, cardiac expression of pro-inflammatory cytokine *Il6* and pro-attractant chemokine *Ccl2* were both increased in female ovx. ZF, but not in male ZF rats, while expression of *Il1b* and *Tnfa* were unaltered in ZF of both genders (Fig. 5f, table 3). In contrast, *Icam1* cardiac expression levels were increased in both male and female ZF, indicating activation of the coronary vasculature (Fig. 5f).

Beyond lymphatic density, lymphatic expression of molecules specialized in cell-cell interaction may modulate the recruitment and uptake of immune cells from the myocardium for clearance to draining lymph nodes. For example, LYVE1 in cardiac lymphatic was demonstrated to be essential for uptake of CD44⁺ immune cells post-MI in mice (187). Recently, we and others demonstrated that cardiac lymphatic *Lyve1* levels are reduced during pressure-overload-induced cardiac hypertrophy in mice (183,188). Investigating cardiac lymphatic expression in inflamed female ovx. ZF rat hearts, we similarly found reduced capillary levels of LYVE1 (Suppl. Fig. 7). We speculate that this molecular alteration, together with reduced lymphatic density, may have slowed the clearance of myeloid immune cells from the hypertrophic heart, thus contributing to unresolved cardiac inflammation in ovx. ZF females. In contrast, cardiac expression of the lymphatic chemokine *Ccl21* was not significantly altered in ZF rats (table 3).

Myocardial fibrosis

A key characteristic of diastolic dysfunction is myocardial fibrosis, which together with increased LV passive stiffness linked to alterations in titin, reduces cardiac compliance. Both interstitial and perivascular fibrosis occurs in HFpEF patients (189). Previously,

we and other have reported diffuse myocardial interstitial fibrosis, as well as perivascular fibrosis, in male ZF rats (178,190). Biological sex influences pro-fibrotic pathways. However, a recent study in ZSF1 male and female (*non-ovx*) obese rats reported similar increases of myocardial fibrosis in both genders, while collagen I levels were increased only in male ZSF1 hearts (191). Indeed, while oestrogen may reduce collagen production in fibroblasts in females, androgens increase expression of TGF- β , a potent pro-fibrotic mediator known to induce extracellular matrix (ECM) deposition (192). Beyond neuro-humoral signaling, cardiac fibrosis may also be triggered by inflammation and edema (174). In agreement, reduction of both inflammation and edema, by lymphangiogenic therapy, was sufficient to reduce interstitial fibrosis post-MI in rats (165). In contrast, we recently demonstrated in a mouse pressure-overload model that reduced lymphatic density during cardiac hypertrophy aggravates perivascular, but not interstitial fibrosis (183). Thus, based on our findings in female *ovx*. ZF rats of cardiac lymphatic rarefaction and myocardial inflammation, including augmented *Irf6* expression, we expected to discover aggravation of perivascular fibrosis as compared to non-*ovx*. Lean female rats. (Fig. 6a)

Discussion

In this study, our main objective was to determine whether biological sex-specific mechanisms relating to vascular remodeling in the heart may underlie development of diastolic dysfunction in the setting of MetS, with the aim to identify new treatment targets for HFpEF.

In patients, age >70 years is the strongest risk factor to develop HFpEF. This may partly reflect the effects of advancing age on the prevalence and severity of major comorbidities, including obesity, insulin resistance / diabetes, renal dysfunction, and hypertension. Indeed, obesity and hypertension together was reported to account for 65% of the population-attributable risk for HFpEF in postmenopausal women(193). Age-related hormonal effects may also play a part in men, because while their overall prevalence of HFrEF is higher than for HFpEF, lower testosterone has been associated with increased risk in men for both HFrEF and HFpEF(194). In contrast, elevated insulin resistance, as indicated by the homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index, specifically increased the risk of HFpEF, but not HFrEF, in men (195).

In our study, to address the mechanisms underlying diastolic dysfunction in the setting of menopause, we included ovx. female rats (177). We expected that ovx. would increase body weight gain, as previously reported in ZF females (196). However, we found no aggravating effects of ovx. on the genetic-induced obesity in ZF rats. Indeed, obesity, hypertension, and dyslipidemia were all comparable between ovx and non-ovx ZF females in our study. This may reflect reduced hypothalamic sensitivity to gonadal hormones due to the resistance to leptin signaling in ZF rats (197). Further, while previous studies have shown that ovx. in ZF reduces renal glomerulopathy, in part by lowering hypertriglyceridemia(198), we did not observe any significant alteration of plasma triglyceride levels or renal histopathology in ovx vs non-ovx ZF females. In contrast, plasma cholesterol levels were increased by ovx. in ZF (table 1). In Lean controls, ovx. led to deleterious effects on several parameters, most notably body weight gain and myocardial vessel density. This is in line with the well-known protective effects of gonadal hormones, especially estrogen, on appetite, metabolism, and vascular endothelium (182,196). Importantly, ovx. in Leans did not alter cardiac function, nor was it associated with cardiac inflammation, demonstrating that “menopause”, in the absence of MetS, was not sufficient to induce diastolic dysfunction

in rats. However, we noted that differences in some metabolic parameters were more pronounced when comparing ovx. ZF with healthy non-ovx Leans rather than with ovx Lean females. Notably, glucose tolerance was reduced in ovx. ZF, but not in non-ovx. ZF, as compared to non-ovx. Lean rats. Taken together, we found that MetS components, cardiac hypertrophy, and diastolic dysfunction were comparable in male and ovx. female ZF rats. This agrees with a recent study in ZSF1 male and non-ovx. female rats that reported similar diastolic dysfunction between genders, despite obese females displaying less hyperglycemia as compared to males (191).

To evaluate whether different mechanisms may be involved in the development of diastolic dysfunction in male vs female ZF rats, we examined myocardial blood vessel function and density. In our study only ZF males displayed pronounced coronary macrovascular endothelial dysfunction, including reduced baseline myocardial perfusion and severe coronary endothelial dysfunction, expected to impact cardiac metabolism. In contrast, vascular rarefaction and coronary reserve capacity were most strikingly reduced in ovx. ZF as compared with healthy non-ovx Lean females. Our findings that male ZF rats suffered more from macrovascular, rather than microvascular alterations, was surprising, given the current hypothesis that HFpEF is driven by microvascular pathology, whereas HFrEF is characterized by macrovascular alterations (163,164). Indeed, in the few clinical studies that have addressed gender-dependent differences in HFpEF histopathology, advancing age, but not female sex, was found to be associated with myocardial microvascular rarefaction (199). The molecular mechanisms underlying vascular rarefaction in the hearts of female, but not male, ZF rats in our study may include reduced cardiac expression of angiogenic factors due to lack of estrogen signaling in ovx. Females, in both Lean and ZF rats (200).

Concerning lymphatics, we observed a reduction of myocardial lymphatic density during MetS-induced hypertrophy only in female, but not male, ZF rats, with ovx. and MetS leading to seemingly additive suppressive effects on lymphangiogenesis. Female sex may influence lymphangiogenesis, and oestradiol has been reported to stimulate *Vegfd* expression in other tissues (170). Indeed, we detected $36\% \pm 11$ higher cardiac expression in non-ovx Lean females as compared to Lean males (Suppl. Fig. 8). However, while ovx. in Lean females did not alter *Vegf-d* levels, they were strikingly lower in ovx. ZF females as compared to ZF males, indicating that other factors, beyond sex hormones, may influence cardiac lymphatic growth factor expression

during MetS-induced cardiac hypertrophy. Recently, we reported that LV dilation, rather than LV wall thickening, may drive lymphangiogenesis during pressure-overload-induced cardiac hypertrophy in mice (183). Given that LV end-systolic dimensions (*LV ESD*) tended to increase in male, but not in female, ZF rats (table 2), we speculate that increased LV wall stress in males may have triggered cardiac *Vegfc* and *Vegfd* expression to maintain lymphatic density during MetS-induced cardiac hypertrophy. Thus, the difference observed in cardiac lymphangiogenesis in our study may reflect gender-dependent differences in cardiac remodeling, with more wall thickening and less LV dilation in ovx. females. Similarly, cardiac angiogenesis has been linked to increased LV wall stress by regulating *Vegf-a* expression. In the clinics, the majority of HFpEF patients display concentric hypertrophy (*CH*: increased LV mass and wall thickening), although the cardiac phenotype in HFpEF may range from concentric remodeling (wall thickening) to eccentric hypertrophy (*EH*: increased LV mass and wall thinning). Interestingly, while cardiac filling pressures were similarly increased in HFpEF patients of either CH or EH phenotype, LV contractility and diastolic stiffness were lower in the latter group, who were slightly younger and less hypertensive, but more obese, as compared to the CH group(201). We speculate, based on our experimental data, that cardiac microvascular and lymphatic rarefaction may predominately occur in HFpEF patients with the CH phenotype, and contribute to cardiac inflammation, fibrosis, and LV stiffening driving diastolic dysfunction in these patients.

Our observation that cardiac immune cell levels were increased only in ovx. ZF females, but not males, was unexpected. In contrast, in the clinic, increased circulating levels of immune cells and pro-inflammatory cytokines, notably TNF α and IL6, have been found in both male and female HFpEF patients (202). Nevertheless, women may have increased systemic inflammatory reaction to obesity as compared to men (203). One adipokine that transmits pro-inflammatory signals from expanding adipose tissue is leptin, and women generally have elevated leptin levels as compared to men. Thus, while our use in this study of leptin-resistant animals may have limited obesity-induced inflammatory signals, we postulate that remodeling of both the cardiac microvasculature and lymphatics in ovx. ZF females may have contributed to accentuate low-grade myocardial inflammation only in females. We speculate that while insufficient perfusion altered cardiac metabolism in ZF males, myocardial

inflammation may similarly have shifted the cardiomyocyte metabolic milieu in females, resulting in comparable diastolic dysfunction but distinct underlying mechanisms. Concerning novel targets to reduce HFpEF, we previously demonstrated that lymphangiogenic therapy with Vegfc reduced cardiac inflammation, edema, fibrosis, and cardiac dysfunction post-MI in rodents (165,166). Similarly, therapeutic lymphangiogenesis in a mouse model of L-name-induced hypertension promisingly reduced renal inflammation and dysfunction (204). While future studies should address whether therapeutic cardiac lymphangiogenesis will suffice to improve diastolic function in ovx. ZF females, our data suggest that combined angiogenic and lymphangiogenic therapies may be necessary to reduce cardiac inflammation and diastolic dysfunction in HFpEF patients.

Author contributions

H.C, V.T, M.L and M.V performed *in vivo* monitoring including morphometry, echocardiography, GTT and ITT; L.N performed and analyzed fMRI under guidance of P.M; P.M performed hemodynamic analyses; ***ex vivo* arteriography was performed by M.L and M.V under guidance of P.M;** H.C, V.T, and A.D performed and analyzed flow cytometry with assistance of G.R; **A.D and H.C** performed and analyzed immunohistochemistry and histology; E.B, D.G and D.S. carried-out, post-processed and analyzed light sheet and confocal imaging; JP.H. performed ovariectomy in rats; H.C and S.R carried-out cardiac gene expression analyses with guidance of S.F; V.B analyzed biochemical data; E.B and P.M designed the study, analyzed results, and prepared the manuscript draft together with H.C. All authors approved of the final version of the manuscript.

Acknowledgments

We thank Melanie Fargues, Marine Larcheveque, and Théo Lemarcis at Normandy University, France for assistance with immunohistochemistry and RTqPCR, and Pr. Anna Ratajska at the Department of Pathology, Medical University of Warsaw, Center for Biostructure, Poland, for helpful discussions.

Funding

H.C was funded by the CHU Charles Nicol foundation (ASSR fellowship). M.L and M.S were funded by fellowships from the Normandie Doctoral School (EdNBISE). The research leading to these results benefitted from funding from the ERA-CVD Research Programme, which is a transnational R&D programme jointly funded by national funding organisations (*ANR-16-ECVD-0004*) within the framework of the ERA-NET ERA-CVD. This work was supported by a grant from the GCS G4 and the Normandy region (FHU CARNAVAL). The project also benefitted from funds from the FHU REMOD-VHF and the RHU STOP-AS programmes, as well as generalized institutional funds (Inserm U1096 laboratory) from French Inserm and the Normandy Region together with the European Union: “*Europe gets involved in Normandie*” with European Regional Development Fund (ERDF): CPER/FEDER 2015 (DO-IT) and CPER/FEDER 2016 (PACT-CBS).

References

1. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 3 mars 2020;141(9):e139-596.
2. Roth GA, Forouzanfar MH, Moran AE, Barber R, Nguyen G, Feigin VL, et al. Demographic and epidemiologic drivers of global cardiovascular mortality. *N Engl J Med*. 2 avr 2015;372(14):1333-41.
3. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Lond Engl*. 10 janv 2015;385(9963):117-71.
4. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 7 mars 2017;135(10):e146-603.
5. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail*. août 2016;18(8):891-975.
6. Fox KF, Cowie MR, Wood DA, Coats AJ, Gibbs JS, Underwood SR, et al. Coronary artery disease as the cause of incident heart failure in the population. *Eur Heart J*. févr 2001;22(3):228-36.
7. Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KK. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA*. 22 mai 1996;275(20):1557-62.
8. Cowie MR, Wood DA, Coats AJ, Thompson SG, Poole-Wilson PA, Suresh V, et al. Incidence and aetiology of heart failure; a population-based study. *Eur Heart J*. mars 1999;20(6):421-8.
9. Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*. 20 juill 2006;355(3):251-9.
10. Bursi F, Weston SA, Redfield MM, Jacobsen SJ, Pakhomov S, Nkomo VT, et al. Systolic and diastolic heart failure in the community. *JAMA*. 8 nov 2006;296(18):2209-16.
11. Pfeffer MA, Shah AM, Borlaug BA. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction In Perspective. *Circ Res*. 24 mai 2019;124(11):1598-617.
12. Gerber Y, Weston SA, Redfield MM, Chamberlain AM, Manemann SM, Jiang R, et al. A contemporary appraisal of the heart failure epidemic in Olmsted County, Minnesota, 2000 to 2010. *JAMA Intern Med*. juin 2015;175(6):996-1004.
13. Chang PP, Wruck LM, Shahar E, Rossi JS, Loehr LR, Russell SD, et al. Trends in Hospitalizations and Survival of Acute Decompensated Heart Failure in Four US

- Communities (2005-2014): ARIC Study Community Surveillance. *Circulation*. 3 juill 2018;138(1):12-24.
14. Zile MR, Gottdiener JS, Hetzel SJ, McMurray JJ, Komajda M, McKelvie R, et al. Prevalence and significance of alterations in cardiac structure and function in patients with heart failure and a preserved ejection fraction. *Circulation*. 6 déc 2011;124(23):2491-501.
 15. Redfield MM, Chen HH, Borlaug BA, Semigran MJ, Lee KL, Lewis G, et al. Effect of phosphodiesterase-5 inhibition on exercise capacity and clinical status in heart failure with preserved ejection fraction: a randomized clinical trial. *JAMA*. 27 mars 2013;309(12):1268-77.
 16. Mahmood SS, Levy D, Vasan RS, Wang TJ. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. *Lancet Lond Engl*. 15 mars 2014;383(9921):999-1008.
 17. Kannel WB, LeBauer EJ, Dawber TR, McNamara PM. Relation of body weight to development of coronary heart disease. The Framingham study. *Circulation*. avr 1967;35(4):734-44.
 18. Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol*. juill 1974;34(1):29-34.
 19. Kannel WB, Castelli WP, Gordon T, McNamara PM. Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham study. *Ann Intern Med*. janv 1971;74(1):1-12.
 20. Kannel WB, Castelli WP, McNamara PM. Serum lipid fractions and risk of coronary heart disease. The Framingham study. *Minn Med*. août 1969;52(8):1225-30.
 21. Kannel WB, Schwartz MJ, McNamara PM. Blood pressure and risk of coronary heart disease: the Framingham study. *Dis Chest*. juill 1969;56(1):43-52.
 22. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA*. 11 mai 1979;241(19):2035-8.
 23. Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PWF, Benjamin EJ, Larson MG, et al. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med*. 1 août 2002;347(5):305-13.
 24. Wang J, Sarnola K, Ruotsalainen S, Moilanen L, Lepistö P, Laakso M, et al. The metabolic syndrome predicts incident congestive heart failure: a 20-year follow-up study of elderly Finns. *Atherosclerosis*. mai 2010;210(1):237-42.
 25. Ingelsson E, Arnlöv J, Lind L, Sundström J. Metabolic syndrome and risk for heart failure in middle-aged men. *Heart Br Card Soc*. oct 2006;92(10):1409-13.
 26. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Drazner MH, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 15 oct 2013;62(16):e147-239.

27. Brouwers FP, de Boer RA, van der Harst P, Voors AA, Gansevoort RT, Bakker SJ, et al. Incidence and epidemiology of new onset heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction in a community-based cohort: 11-year follow-up of PREVEND. *Eur Heart J*. mai 2013;34(19):1424-31.
28. Dhingra A, Garg A, Kaur S, Chopra S, Batra JS, Pandey A, et al. Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Curr Heart Fail Rep*. déc 2014;11(4):354-65.
29. Lam CSP, Donal E, Kraigher-Krainer E, Vasan RS. Epidemiology and clinical course of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur J Heart Fail*. janv 2011;13(1):18-28.
30. Dunlay SM, Roger VL, Redfield MM. Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol*. 11 mai 2017;
31. Vinluan CM, Zreikat HH, Levy JR, Cheang KI. Comparison of different metabolic syndrome definitions and risks of incident cardiovascular events in the elderly. *Metabolism*. mars 2012;61(3):302-9.
32. Brede S, Serfling G, Klement J, Schmid SM, Lehnert H. Clinical Scenario of the Metabolic Syndrome. *Visc Med*. oct 2016;32(5):336-41.
33. Taube A, Schlich R, Sell H, Eckardt K, Eckel J. Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1 juin 2012;302(11):H2148-2165.
34. Cheng JM, Akkerhuis KM, Battes LC, van Vark LC, Hillege HL, Paulus WJ, et al. Biomarkers of heart failure with normal ejection fraction: a systematic review. *Eur J Heart Fail*. déc 2013;15(12):1350-62.
35. DuBrock HM, AbouEzzeddine OF, Redfield MM. High-sensitivity C-reactive protein in heart failure with preserved ejection fraction. *PloS One*. 2018;13(8):e0201836.
36. Chirinos JA, Orlenko A, Zhao L, Basso MD, Cvijic ME, Li Z, et al. Multiple Plasma Biomarkers for Risk Stratification in Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol*. 24 mars 2020;75(11):1281-95.
37. Shah SJ, Marcus GM, Gerber IL, McKeown BH, Vessey JC, Jordan MV, et al. High-sensitivity C-reactive protein and parameters of left ventricular dysfunction. *J Card Fail*. févr 2006;12(1):61-5.
38. Westermann D, Lindner D, Kasner M, Zietsch C, Savvatis K, Escher F, et al. Cardiac inflammation contributes to changes in the extracellular matrix in patients with heart failure and normal ejection fraction. *Circ Heart Fail*. janv 2011;4(1):44-52.
39. Hahn VS, Yanek LR, Vaishnav J, Ying W, Vaidya D, Lee YZJ, et al. Endomyocardial Biopsy Characterization of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction and Prevalence of Cardiac Amyloidosis. *JACC Heart Fail*. sept 2020;8(9):712-24.
40. Mishra S, Kass DA. Cellular and molecular pathobiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol*. 11 janv 2021;

41. Mohammed SF, Hussain S, Mirzoyev SA, Edwards WD, Maleszewski JJ, Redfield MM. Coronary microvascular rarefaction and myocardial fibrosis in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation*. 10 févr 2015;131(6):550-9.
42. Kato S, Saito N, Kirigaya H, Gyotoku D, Inuma N, Kusakawa Y, et al. Impairment of Coronary Flow Reserve Evaluated by Phase Contrast Cine-Magnetic Resonance Imaging in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Heart Assoc*. 23 févr 2016;5(2).
43. Borlaug BA. The pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol*. sept 2014;11(9):507-15.
44. Weber KT, Brilla CG, Janicki JS. Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc Res*. mars 1993;27(3):341-8.
45. Levick SP, Widiapradja A. The Diabetic Cardiac Fibroblast: Mechanisms Underlying Phenotype and Function. *Int J Mol Sci*. 1 févr 2020;21(3).
46. Paulus WJ, Tschöpe C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol*. 23 juill 2013;62(4):263-71.
47. Ahmed SH, Clark LL, Pennington WR, Webb CS, Bonnema DD, Leonardi AH, et al. 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*. 2 mai 2006;113(17):2089-96.
48. Borbély A, van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer JGF, Edes I, Stienen GJM, et al. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation*. 15 févr 2005;111(6):774-81.
49. Zile MR, Baicu CF, Ikonomidis JS, Stroud RE, Nietert PJ, Bradshaw AD, et al. Myocardial stiffness in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: contributions of collagen and titin. *Circulation*. 7 avr 2015;131(14):1247-59.
50. Borbély A, Papp Z, Edes I, Paulus WJ. Molecular determinants of heart failure with normal left ventricular ejection fraction. *Pharmacol Rep PR*. févr 2009;61(1):139-45.
51. van Heerebeek L, Hamdani N, Falcão-Pires I, Leite-Moreira AF, Begieneman MPV, Bronzwaer JGF, et al. Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation*. 14 août 2012;126(7):830-9.
52. Franssen C, Chen S, Unger A, Korkmaz HI, De Keulenaer GW, Tschöpe C, et al. Myocardial Microvascular Inflammatory Endothelial Activation in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *JACC Heart Fail*. avr 2016;4(4):312-24.
53. van Heerebeek L, Borbély A, Niessen HWM, Bronzwaer JGF, van der Velden J, Stienen GJM, et al. Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation*. 25 avr 2006;113(16):1966-73.
54. Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol*. juill 2018;15(7):387-407.

55. Borlaug BA, Paulus WJ. Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Eur Heart J.* mars 2011;32(6):670-9.
56. Phan TT, Abozguia K, Nallur Shivu G, Mahadevan G, Ahmed I, Williams L, et al. Heart failure with preserved ejection fraction is characterized by dynamic impairment of active relaxation and contraction of the left ventricle on exercise and associated with myocardial energy deficiency. *J Am Coll Cardiol.* 28 juill 2009;54(5):402-9.
57. Smith CS, Bottomley PA, Schulman SP, Gerstenblith G, Weiss RG. Altered creatine kinase adenosine triphosphate kinetics in failing hypertrophied human myocardium. *Circulation.* 12 sept 2006;114(11):1151-8.
58. Jia G, DeMarco VG, Sowers JR. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol.* mars 2016;12(3):144-53.
59. Jia G, Hill MA, Sowers JR. Diabetic Cardiomyopathy: An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity. *Circ Res.* 16 févr 2018;122(4):624-38.
60. Meagher P, Adam M, Civitarese R, Bugyei-Twum A, Connelly KA. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction in Diabetes: Mechanisms and Management. *Can J Cardiol.* mai 2018;34(5):632-43.
61. Drosatos K, Schulze PC. Cardiac lipotoxicity: molecular pathways and therapeutic implications. *Curr Heart Fail Rep.* juin 2013;10(2):109-21.
62. Schiattarella GG, Altamirano F, Kim SY, Tong D, Ferdous A, Pirstine H, et al. Xbp1s-FoxO1 axis governs lipid accumulation and contractile performance in heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Commun.* 16 mars 2021;12(1):1684.
63. Cook SA, Varela-Carver A, Mongillo M, Kleinert C, Khan MT, Leccisotti L, et al. Abnormal myocardial insulin signalling in type 2 diabetes and left-ventricular dysfunction. *Eur Heart J.* janv 2010;31(1):100-11.
64. Srivaratharajah K, Coutinho T, deKemp R, Liu P, Haddad H, Stadnick E, et al. Reduced Myocardial Flow in Heart Failure Patients With Preserved Ejection Fraction. *Circ Heart Fail.* juill 2016;9(7).
65. Shah SJ, Lam CSP, Svedlund S, Saraste A, Hage C, Tan RS, et al. Prevalence and correlates of coronary microvascular dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction: PROMIS-HFpEF. *Eur Heart J.* 1 oct 2018;39(37):3439-50.
66. Dryer K, Gajjar M, Narang N, Lee M, Paul J, Shah AP, et al. Coronary microvascular dysfunction in patients with heart failure with preserved ejection fraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1 mai 2018;314(5):H1033-42.
67. Shome JS, Perera D, Plein S, Chiribiri A. Current perspectives in coronary microvascular dysfunction. *Microcirc N Y N* 1994. janv 2017;24(1).
68. Bhuiyan T, Maurer MS. Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: Persistent Diagnosis, Therapeutic Enigma. *Curr Cardiovasc Risk Rep.* oct 2011;5(5):440-9.

69. Lam CSP, Gamble GD, Ling LH, Sim D, Leong KTG, Yeo PSD, et al. Mortality associated with heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction in a prospective international multi-ethnic cohort study. *Eur Heart J.* 21 mai 2018;39(20):1770-80.
70. Yusuf S, Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJV, et al. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial. *Lancet Lond Engl.* 6 sept 2003;362(9386):777-81.
71. Massie BM, Carson PE, McMurray JJ, Komajda M, McKelvie R, Zile MR, et al. Irbesartan in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *N Engl J Med.* 4 déc 2008;359(23):2456-67.
72. Vaduganathan M, Patel RB, Michel A, Shah SJ, Senni M, Gheorghide M, et al. Mode of Death in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol.* 7 févr 2017;69(5):556-69.
73. Lam CSP, Voors AA, de Boer RA, Solomon SD, van Veldhuisen DJ. Heart failure with preserved ejection fraction: from mechanisms to therapies. *Eur Heart J.* 7 août 2018;39(30):2780-92.
74. Ter Maaten JM, Damman K, Verhaar MC, Paulus WJ, Duncker DJ, Cheng C, et al. Connecting heart failure with preserved ejection fraction and renal dysfunction: the role of endothelial dysfunction and inflammation. *Eur J Heart Fail.* juin 2016;18(6):588-98.
75. Damman K, Testani JM. The kidney in heart failure: an update. *Eur Heart J.* 14 juin 2015;36(23):1437-44.
76. Lam CSP, Carson PE, Anand IS, Rector TS, Kuskowski M, Komajda M, et al. Sex differences in clinical characteristics and outcomes in elderly patients with heart failure and preserved ejection fraction: the Irbesartan in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction (I-PRESERVE) trial. *Circ Heart Fail.* 1 sept 2012;5(5):571-8.
77. Beale AL, Nanayakkara S, Kaye DM. Impact of Sex on Ventricular-Vascular Stiffness and Long-Term Outcomes in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: TOPCAT Trial Substudy. *J Am Heart Assoc.* 2 juill 2019;8(13):e012190.
78. Anker SD, Butler J, Filippatos G, Ferreira JP, Bocchi E, Böhm M, et al. Empagliflozin in Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction. *N Engl J Med.* 14 oct 2021;385(16):1451-61.
79. Loffredo FS, Nikolova AP, Pancoast JR, Lee RT. Heart failure with preserved ejection fraction: molecular pathways of the aging myocardium. *Circ Res.* 20 juin 2014;115(1):97-107.
80. Valero-Muñoz M, Backman W, Sam F. Murine Models of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: a « Fishing Expedition ». *JACC Basic Transl Sci.* déc 2017;2(6):770-89.
81. Doi R, Masuyama T, Yamamoto K, Doi Y, Mano T, Sakata Y, et al. Development of different phenotypes of hypertensive heart failure: systolic versus diastolic failure in Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens.* janv 2000;18(1):111-20.

82. Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas PS. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation*. 15 mai 1995;91(10):2642-54.
83. Carbone S, Mauro AG, Toldo S, Abbate A. Diet-Induced Obesity HFpEF Murine Models. *JACC Basic Transl Sci*. févr 2018;3(1):157.
84. Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Fairus A, Ima-Nirwana S. Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr Metab*. 2016;13:65.
85. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*. 15 déc 2005;438(7070):946-53.
86. Tammela T, Alitalo K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell*. 19 févr 2010;140(4):460-76.
87. Aspelund A, Robciuc MR, Karaman S, Makinen T, Alitalo K. Lymphatic System in Cardiovascular Medicine. *Circ Res*. 5 févr 2016;118(3):515-30.
88. Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G, Gunn MD, et al. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J*. 2 avr 2002;21(7):1505-13.
89. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol*. janv 2004;5(1):74-80.
90. Karkkainen MJ, Ferrell RE, Lawrence EC, Kimak MA, Levinson KL, McTigue MA, et al. Missense mutations interfere with VEGFR-3 signalling in primary lymphoedema. *Nat Genet*. juin 2000;25(2):153-9.
91. Alitalo K. The lymphatic vasculature in disease. *Nat Med*. 7 nov 2011;17(11):1371-80.
92. Schwager S, Detmar M. Inflammation and Lymphatic Function. *Front Immunol*. 2019;10:308.
93. Yin N, Zhang N, Xu J, Shi Q, Ding Y, Bromberg JS. Targeting Lymphangiogenesis After Islet Transplantation Prolongs Islet Allograft Survival. *Transplantation*. 15 juill 2011;92(1):25-30.
94. Nykänen AI, Sandelin H, Krebs R, Keränen MAI, Tuuminen R, Kärpänen T, et al. Targeting lymphatic vessel activation and CCL21 production by vascular endothelial growth factor receptor-3 inhibition has novel immunomodulatory and antiarteriosclerotic effects in cardiac allografts. *Circulation*. 30 mars 2010;121(12):1413-22.
95. Mertlitz S, Shi Y, Kalupa M, Grötzinger C, Mengwasser J, Riesner K, et al. Lymphangiogenesis is a feature of acute GVHD, and VEGFR-3 inhibition protects against experimental GVHD. *Blood*. 30 mars 2017;129(13):1865-75.
96. Loukas M, Abel N, Tubbs RS, Grabska J, Birungi J, Anderson RH. The cardiac lymphatic system. *Clin Anat N Y N*. sept 2011;24(6):684-91.

97. Lupinski RW. Aortic fat pad and atrial fibrillation: cardiac lymphatics revisited. *ANZ J Surg.* févr 2009;79(1-2):70-4.
98. Brakenhielm E, Alitalo K. Cardiac lymphatics in health and disease. *Nat Rev Cardiol.* janv 2019;16(1):56-68.
99. Kholová I, Dragneva G, Cermáková P, Laidinen S, Kaskenpää N, Hazes T, et al. Lymphatic vasculature is increased in heart valves, ischaemic and inflamed hearts and in cholesterol-rich and calcified atherosclerotic lesions. *Eur J Clin Invest.* mai 2011;41(5):487-97.
100. Niinimäki E, Mennander AA, Paavonen T, Kholová I. Lymphangiogenesis is increased in heart valve endocarditis. *Int J Cardiol.* 15 sept 2016;219:317-21.
101. Dashkevich A, Bloch W, Antonyan A, Fries JUW, Geissler HJ. Morphological and quantitative changes of the initial myocardial lymphatics in terminal heart failure. *Lymphat Res Biol.* 2009;7(1):21-7.
102. Ebata R, Abe J, Yasukawa K, Hamada H, Higashi K, Suwazono Y, et al. Increased production of vascular endothelial growth factor-d and lymphangiogenesis in acute Kawasaki disease. *Circ J Off J Jpn Circ Soc.* 2011;75(6):1455-62.
103. Ishikawa Y, Akishima-Fukasawa Y, Ito K, Akasaka Y, Tanaka M, Shimokawa R, et al. Lymphangiogenesis in myocardial remodelling after infarction. *Histopathology.* sept 2007;51(3):345-53.
104. Klotz L, Norman S, Vieira JM, Masters M, Rohling M, Dubé KN, et al. Cardiac lymphatics are heterogeneous in origin and respond to injury. *Nature.* 4 juin 2015;522(7554):62-7.
105. Henri O, Pouehe C, Houssari M, Galas L, Nicol L, Edwards-Lévy F, et al. Selective Stimulation of Cardiac Lymphangiogenesis Reduces Myocardial Edema and Fibrosis Leading to Improved Cardiac Function Following Myocardial Infarction. *Circulation.* 12 avr 2016;133(15):1484-97; discussion 1497.
106. Houssari M, Dumesnil A, Tardif V, Kivelä R, Pizzinat N, Boukhalfa I, et al. Lymphatic and Immune Cell Cross-Talk Regulates Cardiac Recovery After Experimental Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* juill 2020;40(7):1722-37.
107. Bizou M, Itier R, Majdoubi M, Abbadi D, Pichery E, Dutaur M, et al. Cardiac macrophage subsets differentially regulate lymphatic network remodeling during pressure overload. *Sci Rep.* 19 août 2021;11(1):16801.
108. Rademakers T, van der Vorst EPC, Daissormont ITMN, Otten JJT, Theodorou K, Theelen TL, et al. Adventitial lymphatic capillary expansion impacts on plaque T cell accumulation in atherosclerosis. *Sci Rep.* 28 mars 2017;7:45263.
109. Nakano T, Nakashima Y, Yonemitsu Y, Sumiyoshi S, Chen YX, Akishima Y, et al. Angiogenesis and lymphangiogenesis and expression of lymphangiogenic factors in the atherosclerotic intima of human coronary arteries. *Hum Pathol.* avr 2005;36(4):330-40.

110. Vieira JM, Norman S, Villa Del Campo C, Cahill TJ, Barnette DN, Gunadasa-Rohling M, et al. The cardiac lymphatic system stimulates resolution of inflammation following myocardial infarction. *J Clin Invest.* 1 août 2018;128(8):3402-12.
111. Vuorio T, Ylä-Herttua E, Laakkonen JP, Laidinen S, Liimatainen T, Ylä-Herttua S. Downregulation of VEGFR3 signaling alters cardiac lymphatic vessel organization and leads to a higher mortality after acute myocardial infarction. *Sci Rep.* 12 nov 2018;8(1):16709.
112. Harvey NL, Srinivasan RS, Dillard ME, Johnson NC, Witte MH, Boyd K, et al. Lymphatic vascular defects promoted by Prox1 haploinsufficiency cause adult-onset obesity. *Nat Genet.* oct 2005;37(10):1072-81.
113. Lim HY, Rutkowski JM, Helft J, Reddy ST, Swartz MA, Randolph GJ, et al. Hypercholesterolemic mice exhibit lymphatic vessel dysfunction and degeneration. *Am J Pathol.* sept 2009;175(3):1328-37.
114. García Nores GD, Cuzzone DA, Albano NJ, Hespe GE, Kataru RP, Torrisi JS, et al. Obesity but not high-fat diet impairs lymphatic function. *Int J Obes* 2005. oct 2016;40(10):1582-90.
115. Kataru RP, Park HJ, Baik JE, Li C, Shin J, Mehrara BJ. Regulation of Lymphatic Function in Obesity. *Front Physiol.* 2020;11:459.
116. Blum KS, Karaman S, Proulx ST, Ochsenbein AM, Luciani P, Leroux JC, et al. Chronic high-fat diet impairs collecting lymphatic vessel function in mice. *PLoS One.* 2014;9(4):e94713.
117. Weitman ES, Aschen SZ, Farias-Eisner G, Albano N, Cuzzone DA, Ghanta S, et al. Obesity impairs lymphatic fluid transport and dendritic cell migration to lymph nodes. *PLoS One.* 2013;8(8):e70703.
118. Torrisi JS, Hespe GE, Cuzzone DA, Savetsky IL, Nitti MD, Gardenier JC, et al. Inhibition of Inflammation and iNOS Improves Lymphatic Function in Obesity. *Sci Rep.* 22 janv 2016;6:19817.
119. Savetsky IL, Torrisi JS, Cuzzone DA, Ghanta S, Albano NJ, Gardenier JC, et al. Obesity increases inflammation and impairs lymphatic function in a mouse model of lymphedema. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 15 juill 2014;307(2):H165-172.
120. Clavin NW, Avraham T, Fernandez J, Daluvoy SV, Soares MA, Chaudhry A, et al. TGF-beta1 is a negative regulator of lymphatic regeneration during wound repair. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* nov 2008;295(5):H2113-2127.
121. Savetsky IL, Ghanta S, Gardenier JC, Torrisi JS, García Nores GD, Hespe GE, et al. Th2 cytokines inhibit lymphangiogenesis. *PLoS One.* 2015;10(6):e0126908.
122. Shin K, Kataru RP, Park HJ, Kwon BI, Kim TW, Hong YK, et al. TH2 cells and their cytokines regulate formation and function of lymphatic vessels. *Nat Commun.* 4 févr 2015;6:6196.

123. Liao S, von der Weid PY. Inflammation-induced lymphangiogenesis and lymphatic dysfunction. *Angiogenesis*. avr 2014;17(2):325-34.
124. Zawieja SD, Gasheva O, Zawieja DC, Muthuchamy M. Blunted flow-mediated responses and diminished nitric oxide synthase expression in lymphatic thoracic ducts of a rat model of metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1 févr 2016;310(3):H385-393.
125. Zawieja SD, Wang W, Chakraborty S, Zawieja DC, Muthuchamy M. Macrophage alterations within the mesenteric lymphatic tissue are associated with impairment of lymphatic pump in metabolic syndrome. *Microcirc N Y N* 1994. oct 2016;23(7):558-70.
126. Zawieja SD, Wang W, Wu X, Nepiyushchikh ZV, Zawieja DC, Muthuchamy M. Impairments in the intrinsic contractility of mesenteric collecting lymphatics in a rat model of metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1 févr 2012;302(3):H643-653.
127. Zafar MI, Mills K, Ye X, Blakely B, Min J, Kong W, et al. Association between the expression of vascular endothelial growth factors and metabolic syndrome or its components: a systematic review and meta-analysis. *Diabetol Metab Syndr*. 2018;10:62.
128. Karaman S, Hollmén M, Robciuc MR, Alitalo A, Nurmi H, Morf B, et al. Blockade of VEGF-C and VEGF-D modulates adipose tissue inflammation and improves metabolic parameters under high-fat diet. *Mol Metab*. févr 2015;4(2):93-105.
129. Lachaux M, Soulié M, Hamzaoui M, Bailly A, Nicol L, Rémy-Jouet I, et al. Short-and long-term administration of imeglimin counters cardiorenal dysfunction in a rat model of metabolic syndrome. *Endocrinol Diabetes Metab*. juill 2020;3(3):e00128.
130. Carr MC. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab*. juin 2003;88(6):2404-11.
131. Gale SK, Van Itallie TB. Genetic obesity: estrogenic influences on the body weight and food intake of lean and obese adult Zucker (fa/fa) rats. *Physiol Behav*. juill 1979;23(1):111-20.
132. Shaw MA, Whitaker EM, Hervey E, Hervey GR. The effects of ovarian hormones on regulation of energy balance in Zucker rats. *J Endocrinol*. août 1983;98(2):165-71.
133. Mauvais-Jarvis F, Clegg DJ, Hevener AL. The Role of Estrogens in Control of Energy Balance and Glucose Homeostasis. *Endocr Rev*. juin 2013;34(3):309-38.
134. Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7 nov 2000;97(23):12729-34.
135. Rogers NH, Perfield JW, Strissel KJ, Obin MS, Greenberg AS. Reduced Energy Expenditure and Increased Inflammation Are Early Events in the Development of Ovariectomy-Induced Obesity. *Endocrinology*. mai 2009;150(5):2161-8.
136. Beale AL, Meyer P, Marwick TH, Lam CSP, Kaye DM. Sex Differences in Cardiovascular Pathophysiology: Why Women Are Overrepresented in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation*. 10 juill 2018;138(2):198-205.

137. Lam CSP, Arnott C, Beale AL, Chandramouli C, Hilfiker-Kleiner D, Kaye DM, et al. Sex differences in heart failure. *Eur Heart J*. 14 déc 2019;40(47):3859-3868c.
138. Redfield MM, Jacobsen SJ, Borlaug BA, Rodeheffer RJ, Kass DA. Age- and gender-related ventricular-vascular stiffening: a community-based study. *Circulation*. 11 oct 2005;112(15):2254-62.
139. Ho JE, Enserro D, Brouwers FP, Kizer JR, Shah SJ, Psaty BM, et al. Predicting Heart Failure With Preserved and Reduced Ejection Fraction: The International Collaboration on Heart Failure Subtypes. *Circ Heart Fail*. juin 2016;9(6):e003116.
140. Iorga A, Li J, Sharma S, Umar S, Bopassa JC, Nadadur RD, et al. Rescue of Pressure Overload-Induced Heart Failure by Estrogen Therapy. *J Am Heart Assoc*. 22 janv 2016;5(1):e002482.
141. Rossitto G, Mary S, McAllister C, Neves KB, Haddow L, Rocchiccioli JP, et al. Reduced Lymphatic Reserve in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol*. 15 déc 2020;76(24):2817-29.
142. Morfoisse F, Tatin F, Chaput B, Therville N, Vaysse C, Métivier R, et al. Lymphatic Vasculature Requires Estrogen Receptor- α Signaling to Protect From Lymphedema. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. juin 2018;38(6):1346-57.
143. Trincot CE, Xu W, Zhang H, Kulikauskas MR, Caranasos TG, Jensen BC, et al. Adrenomedullin Induces Cardiac Lymphangiogenesis After Myocardial Infarction and Regulates Cardiac Edema Via Connexin 43. *Circ Res*. 4 janv 2019;124(1):101-13.
144. Heron C, Dumesnil A, Houssari M, Renet S, Lebon A, Godefroy D, et al. Regulation and impact of cardiac lymphangiogenesis in pressure-overload-induced heart failure [Internet]. *BioRxiv*; 2021 avr [cité 30 sept 2021]. Disponible sur: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.04.27.441616>
145. Norden PR, Kume T. The Role of Lymphatic Vascular Function in Metabolic Disorders. *Front Physiol*. 2020;11:404.
146. Hespe GE, Kataru RP, Savetsky IL, García Nores GD, Torrisi JS, Nitti MD, et al. Exercise training improves obesity-related lymphatic dysfunction. *J Physiol*. 1 août 2016;594(15):4267-82.
147. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. août 2014;105(2):141-50.
148. Packer M, Lam CSP, Lund LH, Maurer MS, Borlaug BA. Characterization of the inflammatory-metabolic phenotype of heart failure with a preserved ejection fraction: a hypothesis to explain influence of sex on the evolution and potential treatment of the disease. *Eur J Heart Fail*. sept 2020;22(9):1551-67.
149. Guimbal S, Cornuault L, Rouault P, Hollier PL, Chapouly C, Bats ML, et al. Mast Cells Are the Trigger of Small Vessel Disease and Diastolic Dysfunction in Diabetic Obese Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. avr 2021;41(4):e193-207.

150. Ferrario CM, Jessup JA, Smith RD. Hemodynamic and hormonal patterns of untreated essential hypertension in men and women. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* déc 2013;7(6):293-305.
151. Zhao Z, Wang H, Jessup JA, Lindsey SH, Chappell MC, Groban L. Role of estrogen in diastolic dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1 mars 2014;306(5):H628-640.
152. Sickinghe AA, Korporaal SJA, den Ruijter HM, Kessler EL. Estrogen Contributions to Microvascular Dysfunction Evolving to Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Front Endocrinol.* 2019;10:442.
153. Nguyen ITN, Brandt MM, van de Wouw J, van Drie RWA, Wesseling M, Cramer MJ, et al. Both male and female obese ZSF1 rats develop cardiac dysfunction in obesity-induced heart failure with preserved ejection fraction. *PloS One.* 2020;15(5):e0232399.
154. Lopez Gelston CA, Balasubramanian D, Abouelkheir GR, Lopez AH, Hudson KR, Johnson ER, et al. Enhancing Renal Lymphatic Expansion Prevents Hypertension in Mice. *Circ Res.* 13 avr 2018;122(8):1094-101.
155. Sundström J, Risérus U, Byberg L, Zethelius B, Lithell H, Lind L. Clinical value of the metabolic syndrome for long term prediction of total and cardiovascular mortality: prospective, population based cohort study. *BMJ.* 15 avr 2006;332(7546):878-82.
156. Forti P, Pirazzoli GL, Maltoni B, Bianchi G, Magalotti D, Muscari A, et al. Metabolic syndrome and all-cause mortality in older men and women: Metabolic Syndrome And Mortality In Older Age. *Eur J Clin Invest.* sept 2012;42(9):1000-9.
157. He D, Zhang X, Chen S, Dai C, Wu Q, Zhou Y, et al. Dynamic Changes of Metabolic Syndrome Alter the Risks of Cardiovascular Diseases and All-Cause Mortality: Evidence From a Prospective Cohort Study. *Front Cardiovasc Med.* 4 août 2021;8:706999.
158. The GBD 2015 Obesity Collaborators. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med.* 6 juill 2017;377(1):13-27.
159. Lam CSP, Arnott C, Beale AL, Chandramouli C, Hilfiker-Kleiner D, Kaye DM, et al. Sex differences in heart failure. *Eur Heart J.* 14 déc 2019;40(47):3859-3868c.
160. Borlaug BA. The pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol.* sept 2014;11(9):507-15.
161. Obokata M, Reddy YNV, Pislaru SV, Melenovsky V, Borlaug BA. Evidence Supporting the Existence of a Distinct Obese Phenotype of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation.* 4 juill 2017;136(1):6-19.
162. Sorimachi H, Obokata M, Takahashi N, Reddy YNV, Jain CC, Verbrugge FH, et al. Pathophysiologic importance of visceral adipose tissue in women with heart failure and preserved ejection fraction. *Eur Heart J.* 21 avr 2021;42(16):1595-605.
163. Paulus WJ, Tschöpe C. A Novel Paradigm for Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol.* juill 2013;62(4):263-71.

164. Cuijpers I, Simmonds SJ, van Bilsen M, Czarnowska E, González Miqueo A, Heymans S, et al. Microvascular and lymphatic dysfunction in HFpEF and its associated comorbidities. *Basic Res Cardiol.* 25 2020;115(4):39.
165. Henri O, Poueche C, Houssari M, Galas L, Nicol L, Edwards-Lévy F, et al. Selective Stimulation of Cardiac Lymphangiogenesis Reduces Myocardial Edema and Fibrosis Leading to Improved Cardiac Function Following Myocardial Infarction. *Circulation.* 12 avr 2016;133(15):1484-97; discussion 1497.
166. Houssari M, Dumesnil A, Tardif V, Kivelä R, Pizzinat N, Boukhalfa I, et al. Lymphatic and Immune Cell Cross-Talk Regulates Cardiac Recovery After Experimental Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(7):1722-37.
167. Chakraborty S, Zawieja S, Wang W, Zawieja DC, Muthuchamy M. Lymphatic system: a vital link between metabolic syndrome and inflammation: Roles of lymphatics in metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* oct 2010;1207:E94-102.
168. Scallan JP, Zawieja SD, Castorena-Gonzalez JA, Davis MJ. Lymphatic pumping: mechanics, mechanisms and malfunction: Lymphatic pumping mechanisms. *J Physiol.* 15 oct 2016;594(20):5749-68.
169. Lim HY, Rutkowski JM, Helft J, Reddy ST, Swartz MA, Randolph GJ, et al. Hypercholesterolemic mice exhibit lymphatic vessel dysfunction and degeneration. *Am J Pathol.* sept 2009;175(3):1328-37.
170. Morfoisse F, Tatin F, Chaput B, Therville N, Vaysse C, Métivier R, et al. Lymphatic Vasculature Requires Estrogen Receptor- α Signaling to Protect From Lymphedema. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* juin 2018;38(6):1346-57.
171. Trincot CE, Xu W, Zhang H, Kulikauskas MR, Caranasos TG, Jensen BC, et al. Adrenomedullin Induces Cardiac Lymphangiogenesis After Myocardial Infarction and Regulates Cardiac Edema Via Connexin 43. *Circ Res.* 4 janv 2019;124(1):101-13.
172. Dubois C, Rocks N, Blacher S, Primac I, Gallez A, García-Caballero M, et al. Lymph/angiogenesis contributes to sex differences in lung cancer through oestrogen receptor alpha signalling. *Endocr Relat Cancer.* févr 2019;26(2):201-16.
173. Brakenhielm E, Alitalo K. Cardiac lymphatics in health and disease. *Nat Rev Cardiol.* janv 2019;16(1):56-68.
174. Brakenhielm E, González A, Díez J. Role of Cardiac Lymphatics in Myocardial Edema and Fibrosis: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol.* 11 août 2020;76(6):735-44.
175. Fudim M, Salah HM, Sathananthan J, Bernier M, Pabon-Ramos W, Schwartz RS, et al. Lymphatic Dysregulation in Patients With Heart Failure. *J Am Coll Cardiol.* juill 2021;78(1):66-76.
176. Rossitto G, Mary S, McAllister C, Neves KB, Haddow L, Rocchiccioli JP, et al. Reduced Lymphatic Reserve in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol.* déc 2020;76(24):2817-29.

177. Medina-Contreras J, Villalobos-Molina R, Zarain-Herzberg A, Balderas-Villalobos J. Ovariectomized rodents as a menopausal metabolic syndrome model. A minireview. *Mol Cell Biochem.* déc 2020;475(1-2):261-76.
178. Lachaux M, Soulié M, Hamzaoui M, Bailly A, Nicol L, Rémy-Jouet I, et al. Short-and long-term administration of imeglimin counters cardiorenal dysfunction in a rat model of metabolic syndrome. *Endocrinol Diabetes Metab.* juill 2020;3(3):e00128.
179. Barnett-Vanes A, Sharrock A, Birrell MA, Rankin S. A Single 9-Colour Flow Cytometric Method to Characterise Major Leukocyte Populations in the Rat: Validation in a Model of LPS-Induced Pulmonary Inflammation. Sanchez-Margalet V, éditeur. *PLOS ONE.* 14 janv 2016;11(1):e0142520.
180. Zucker TF, Zucker LM. Fat Accretion and Growth in the Rat. *Obes Res.* janv 1996;4(1):102-8.
181. Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Mostefai HA, Tesse A, Mulder P, Rouet P, et al. Red Wine Polyphenols Prevent Metabolic and Cardiovascular Alterations Associated with Obesity in Zucker Fatty Rats (Fa/Fa). Polidori C, éditeur. *PLoS ONE.* 18 mai 2009;4(5):e5557.
182. Favre J, Gao J, Henry JP, Remy-Jouet I, Fourquaux I, Billon-Gales A, et al. Endothelial Estrogen Receptor α Plays an Essential Role in the Coronary and Myocardial Protective Effects of Estradiol in Ischemia/Reperfusion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* déc 2010;30(12):2562-7.
183. Heron C, Dumesnil A, Houssari M, Renet S, Lebon A, Godefroy D, et al. Regulation and impact of cardiac lymphangiogenesis in pressure-overload-induced heart failure [Internet]. *Physiology*; 2021 avr [cité 30 sept 2021]. Disponible sur: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.04.27.441616>
184. Wu CH, Chi JC, Jerng JS, Lin SJ, Jan KM, Wang DL, et al. Transendothelial macromolecular transport in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* août 1990;16(2):154-61.
185. Chinnakkannu P, Reese C, Gaspar JA, Panneerselvam S, Pleasant-Jenkins D, Mukherjee R, et al. Suppression of angiotensin II-induced pathological changes in heart and kidney by the caveolin-1 scaffolding domain peptide. *PloS One.* 2018;13(12):e0207844.
186. Zucker LM. Hereditary obesity in the rat associated with hyperlipemia. *Ann N Y Acad Sci.* oct 1965;131(1 Adipose Tissu):447-58.
187. Vieira JM, Norman S, Villa Del Campo C, Cahill TJ, Barnette DN, Gunadasa-Rohling M, et al. The cardiac lymphatic system stimulates resolution of inflammation following myocardial infarction. *J Clin Invest.* 1 août 2018;128(8):3402-12.
188. Bizou M, Itier R, Majdoubi M, Abbadi D, Pichery E, Dutaur M, et al. Cardiac macrophage subsets differentially regulate lymphatic network remodeling during pressure overload. *Sci Rep.* 19 août 2021;11(1):16801.

189. López B, Ravassa S, Moreno MU, José GS, Beaumont J, González A, et al. Diffuse myocardial fibrosis: mechanisms, diagnosis and therapeutic approaches. *Nat Rev Cardiol*. 10 févr 2021;
190. Zhou X, Ma L, Habibi J, Whaley-Connell A, Hayden MR, Tilmon RD, et al. Nebivolol improves diastolic dysfunction and myocardial remodeling through reductions in oxidative stress in the Zucker obese rat. *Hypertens Dallas Tex* 1979. avr 2010;55(4):880-8.
191. Nguyen ITN, Brandt MM, van de Wouw J, van Drie RWA, Wesseling M, Cramer MJ, et al. Both male and female obese ZSF1 rats develop cardiac dysfunction in obesity-induced heart failure with preserved ejection fraction. *Lionetti V, éditeur. PLOS ONE*. 6 mai 2020;15(5):e0232399.
192. Sickinghe AA, Korporaal SJA, den Ruijter HM, Kessler EL. Estrogen Contributions to Microvascular Dysfunction Evolving to Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Front Endocrinol*. 3 juill 2019;10:442.
193. Eaton CB, Pettinger M, Rossouw J, Martin LW, Foraker R, Quddus A, et al. Risk Factors for Incident Hospitalized Heart Failure With Preserved Versus Reduced Ejection Fraction in a Multiracial Cohort of Postmenopausal Women. *Circ Heart Fail [Internet]*. oct 2016 [cité 1 sept 2021];9(10). Disponible sur: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002883>
194. Zhao D, Guallar E, Ballantyne CM, Post WS, Ouyang P, Vaidya D, et al. Sex Hormones and Incident Heart Failure in Men and Postmenopausal Women: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1 oct 2020;105(10):e3798-807.
195. Savji N, Meijers WC, Bartz TM, Bhambhani V, Cushman M, Naylor M, et al. The Association of Obesity and Cardiometabolic Traits With Incident HFpEF and HFrEF. *JACC Heart Fail*. août 2018;6(8):701-9.
196. Gale SK, Van Itallie TB. Genetic obesity: Estrogenic influences on the body weight and food intake of lean and obese adult Zucker (fa/fa) rats. *Physiol Behav*. juill 1979;23(1):111-20.
197. Olster DH, Auerbach ID. Deficits in Progesterone-Facilitated Sexual Behaviors and Forebrain Estrogen and Progestin Receptors in Obese Female Zucker Rats. *Neuroendocrinology*. 2000;72(6):350-9.
198. Gades MD, Stern JS, van Goor H, Nguyen D, Johnson PR, Kaysen GA. Estrogen accelerates the development of renal disease in female obese Zucker rats. *Kidney Int*. janv 1998;53(1):130-5.
199. Mohammed SF, Hussain S, Mirzoyev SA, Edwards WD, Maleszewski JJ, Redfield MM. Coronary Microvascular Rarefaction and Myocardial Fibrosis in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation*. 10 févr 2015;131(6):550-9.
200. Iorga A, Li J, Sharma S, Umar S, Bopassa JC, Nadadur RD, et al. Rescue of Pressure Overload-Induced Heart Failure by Estrogen Therapy. *J Am Heart Assoc*. 22 janv 2016;5(1):e002482.

201. Katz DH, Beussink L, Sauer AJ, Freed BH, Burke MA, Shah SJ. Prevalence, clinical characteristics, and outcomes associated with eccentric versus concentric left ventricular hypertrophy in heart failure with preserved ejection fraction. *Am J Cardiol.* 15 oct 2013;112(8):1158-64.
202. Chirinos JA, Orlenko A, Zhao L, Basso MD, Cvijic ME, Li Z, et al. Multiple Plasma Biomarkers for Risk Stratification in Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol.* mars 2020;75(11):1281-95.
203. Packer M, Lam CSP, Lund LH, Maurer MS, Borlaug BA. Characterization of the inflammatory-metabolic phenotype of heart failure with a preserved ejection fraction: a hypothesis to explain influence of sex on the evolution and potential treatment of the disease. *Eur J Heart Fail.* sept 2020;22(9):1551-67.
204. Lopez Gelston CA, Balasubramanian D, Abouelkheir GR, Lopez AH, Hudson KR, Johnson ER, et al. Enhancing Renal Lymphatic Expansion Prevents Hypertension in Mice. *Circ Res.* 13 avr 2018;122(8):1094-101.
205. Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Description of a new method of ovariectomy in female rats. *Rev Bras Reumatol.* juin 2012;52(3):462-70.
206. Banquet S, Gomez E, Nicol L, Edwards-Lévy F, Henry JP, Cao R, et al. Arteriogenic therapy by intramyocardial sustained delivery of a novel growth factor combination prevents chronic heart failure. *Circulation.* 30 août 2011;124(9):1059-69.

Figures

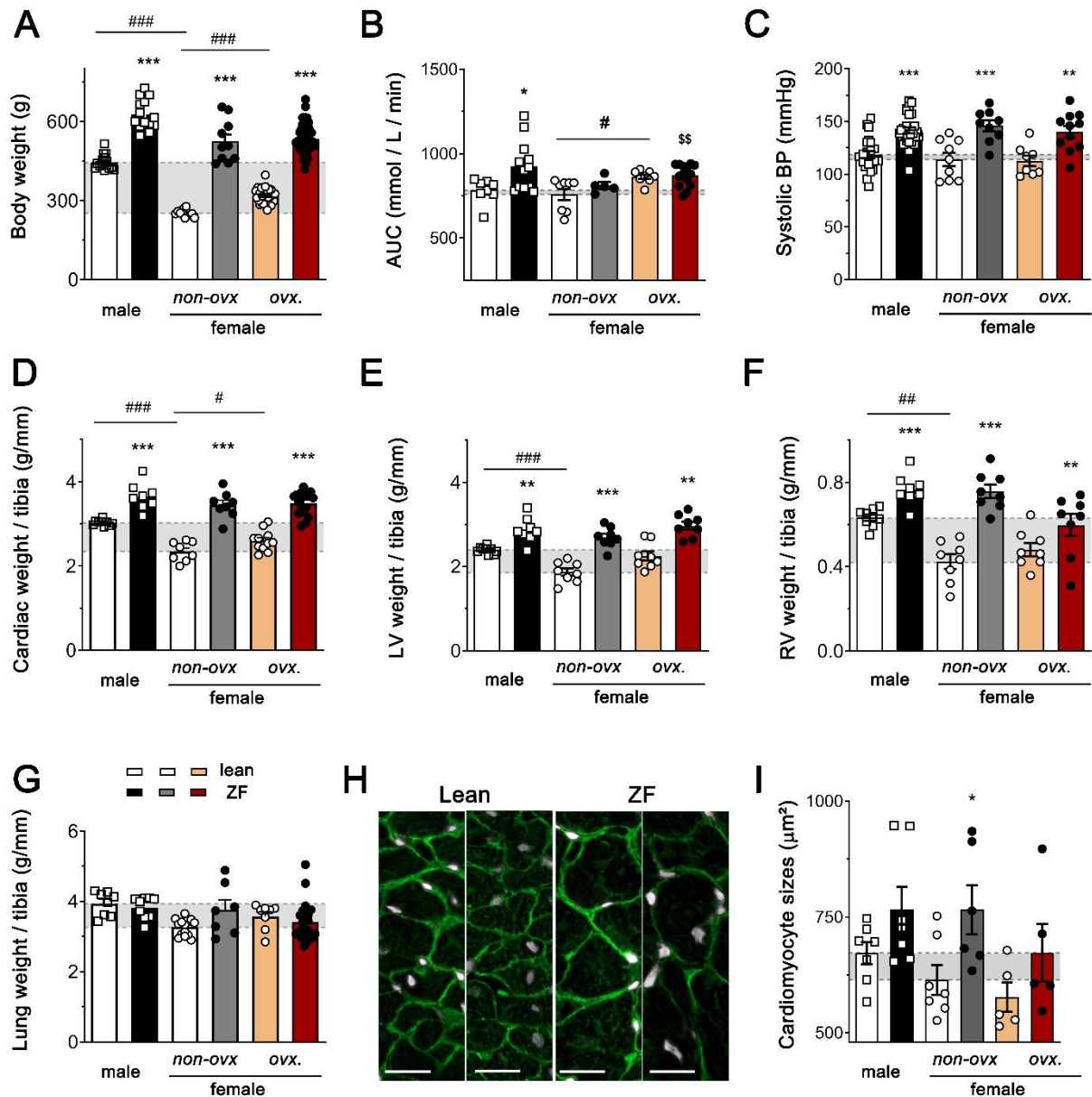


Fig. 1 –Similar spectrum of MetS components and cardiac hypertrophy in male and female ZF rats

Lean and ZF rats ($n=5-29$ rats / group) were examined at 24 weeks to determine the degree of obesity (a), glucose intolerance (b), and arterial hypertension (c). Males are indicated by open square symbols, ZF male group is shown in black bars. Females are indicated by circle symbols, Lean groups are shown in white (*non-ovx*) or yellow (*ovx*) bars, while ZF female groups are shown in dark grey (*non-ovx*) or red (*ovx*) bars. Cardiac (d), Left ventricular (LV, e), right ventricular (RV, f), and pulmonary (g) mass index were calculated by normalization to tibia lengths (g/mm). Examples (h) and quantification (i) of cardiomyocyte sizes. WGA, green, DAPI, grey, $\times 20$. Scale bar = 20 μ m. Data is presented as mean \pm sem. Groups were compared by one-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test or by non-parametric Kruskal Wallis followed by Dunn's posthoc test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus respective

lean controls; # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ Lean male and ovx females *versus* non-ovx Leans; \$\$ $p < 0.01$ ZF *versus* non-ovx Lean females.

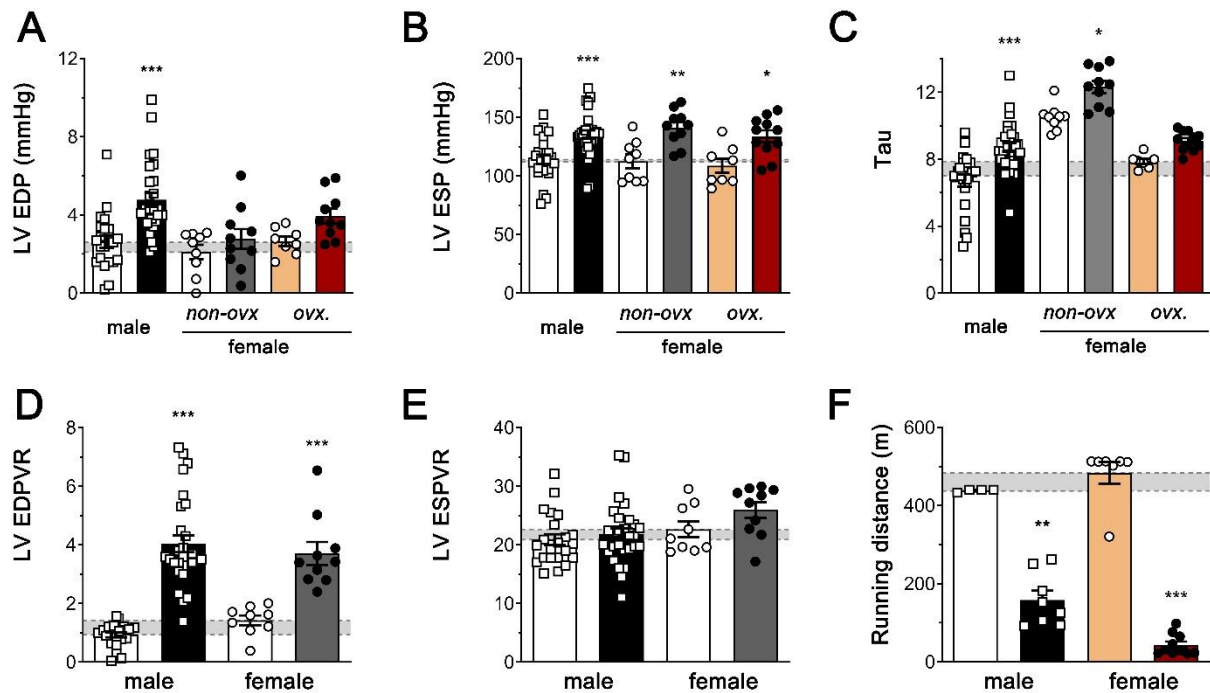


Fig. 2 – MetS induces diastolic dysfunction and exercise incapacity in ZF rats

Hemodynamic analyses ($n=8-29$ rats / group) were performed to determine the LV end-diastolic pressure (*LV EDP*, a), LV end-systolic pressure (*LV ESP*, b), and relaxation constant *tau* (c). Males are indicated by open square symbols, ZF males are shown as black bars. Females are indicated by circle symbols, Lean groups are shown in white (*non-ovx*) or yellow (*ovx*) bars, while ZF females are shown in dark grey (*non-ovx*) or red (*ovx*) bars. LV end-diastolic pressure volume relation (*LV EDPVR*, d) and LV end-systolic pressure volume relation (*LV ESPVR*, e) were calculated. Animals were examined for exercise capacity on a treadmill during 45 min (f). Data is presented as mean ± SEM. Groups were compared by one-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test or by non-parametric Kruskal Wallis followed by Dunn's posthoc test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ *versus* respective lean controls.

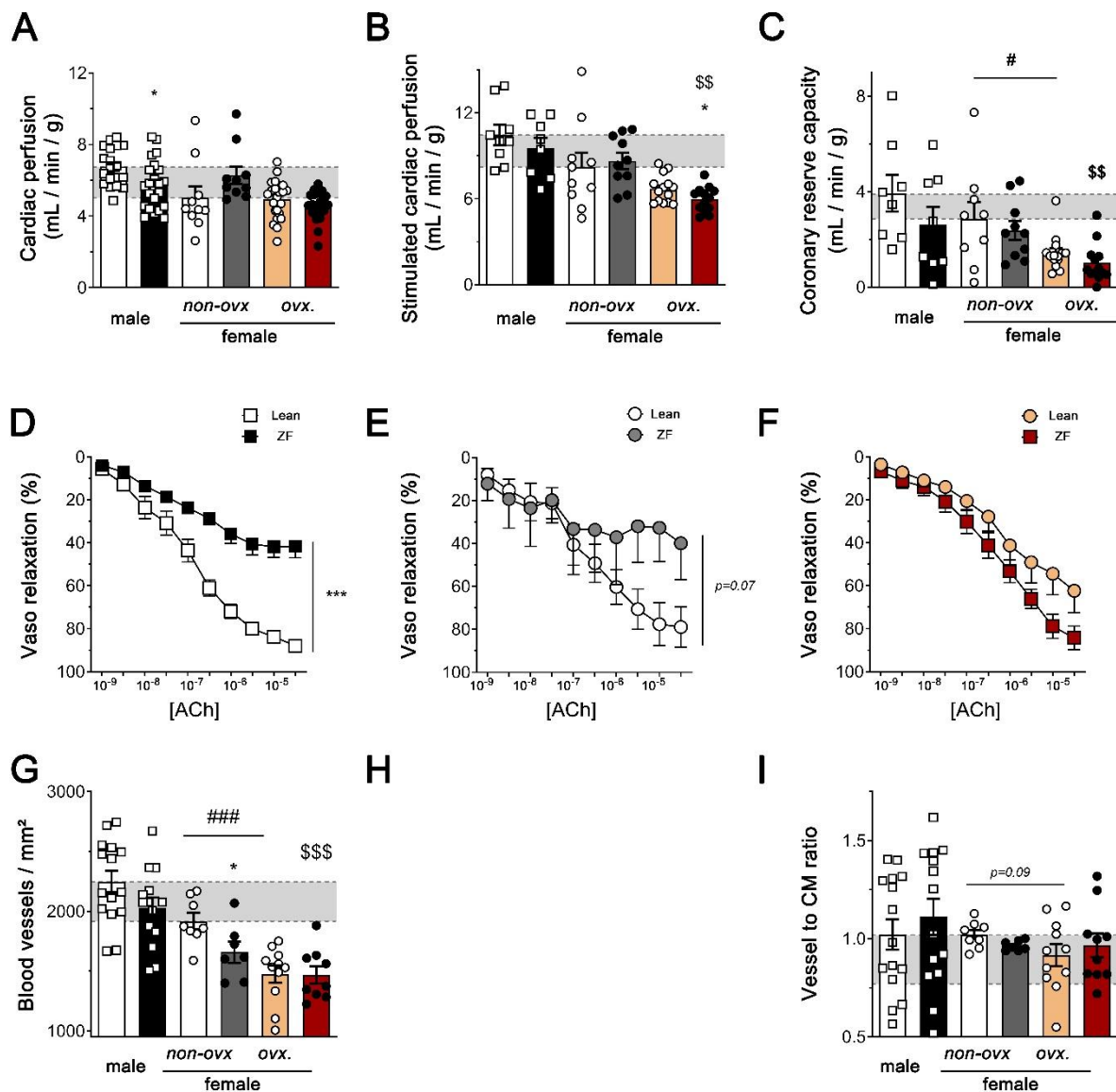


Fig. 3 – Reduction of cardiac perfusion, coronary endothelial reactivity, and myocardial blood vessel density in MetS

MRI analysis was applied ($n=5-23$ rats / group) to determine baseline myocardial perfusion (a) and stimulated myocardial perfusion after dipyridamole treatment (b) for calculation of the coronary flow reserve (c). Males are indicated by open square symbols, ZF male group is shown in black bars. Females are indicated by circle symbols, Lean groups are shown in white (*non-ovx*) or yellow (*ovx*) bars, while ZF female groups are shown in dark grey (*non-ovx*) or red (*ovx*) bars. Coronary vascular endothelial reactivity to Acetylcholine (ACh) was analyzed *ex vivo* in Lean and ZF males (d), non-ovx females (e), and ovx. females (f). Examples (g) and quantification (h) of myocardial blood vessel density. *CD31*, grey, *Ve-Cadherin*, red, *DAPI*, blue, $\times 20$. Scale bar, 20 μm . Data is presented as mean \pm sem. Groups were compared by one-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test or by non-parametric Kruskal Wallis followed by Dunn's posthoc test: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus respective lean controls; # $p < 0.05$ Lean ovx females versus non-ovx Leans; \$\$ $p < 0.01$ ZF versus non-ovx Lean females.

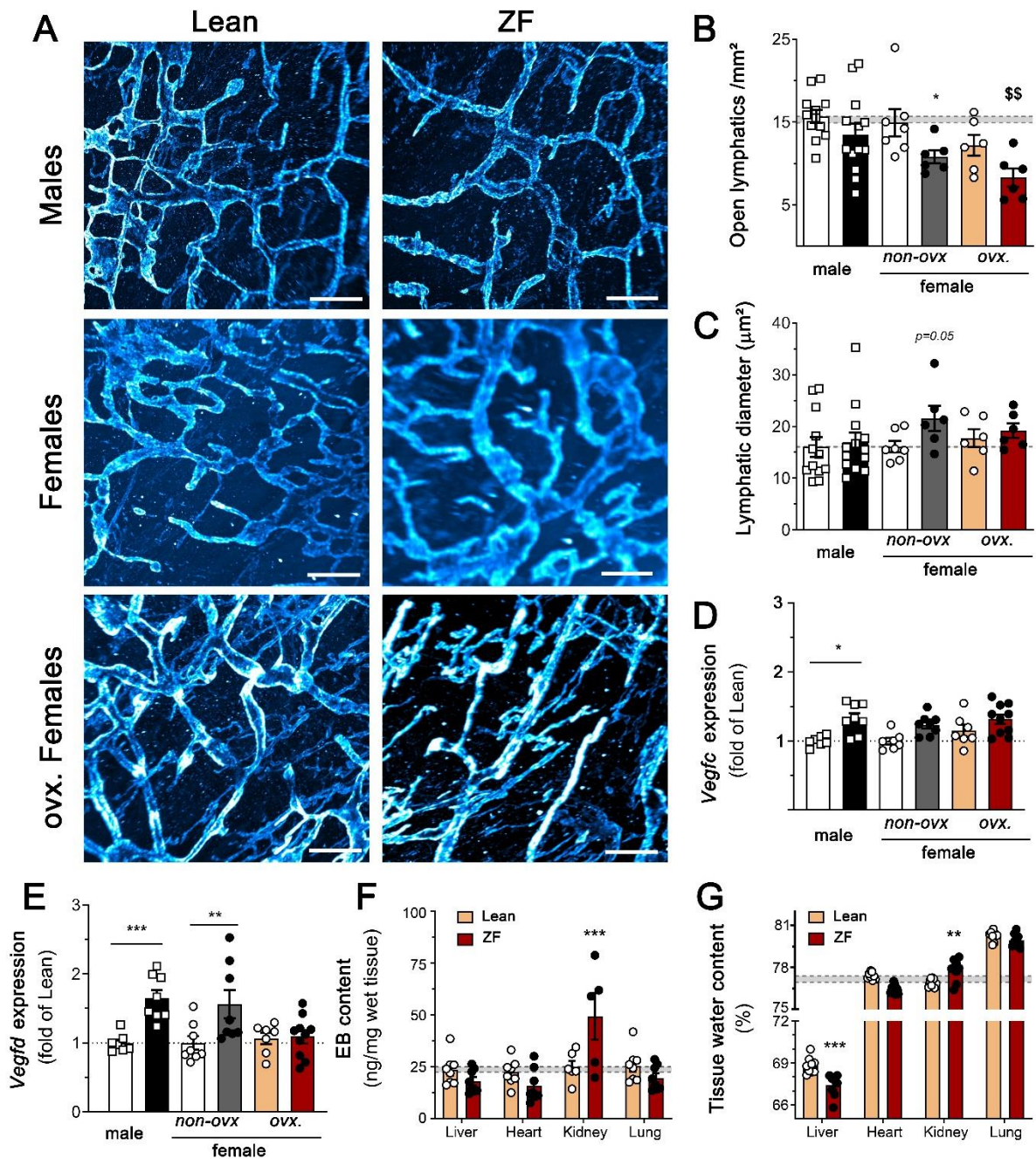


Fig. 4 – Lymphatic remodeling, vascular permeability and edema in MetS

Cardiac lymphatics were visualized by lightsheet microscopy (a, *LYVE1*, cyan, x20. Scale bar, 300 μm), and open lymphatic vessel density (b), and lymphatic diameters (c) were assessed in histological sections ($n=5-14$ rats/ group). Males are indicated by open square symbols, ZF male in black bars. Females are indicated by circle symbols, Lean groups in white (*non-ovx*) or yellow (*ovx*) bars, while ZF female groups in dark grey (*non-ovx*) or red (*ovx*) bars. Cardiac gene expression of lymphangiogenic growth factors *Vegfc* (d) and *Vegfd* (e). Blood vascular leakage was investigated in female Lean or ZF *ovx.* rats, and liver, heart, kidney and lung samples were used to determine extravasated Evans Blue dye content (*EB*, f), and tissue water content (g). Data is shown as mean \pm sem. Groups were compared by one-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test or by non-parametric Kruskal Wallis followed by Dunn's posthoc test: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ versus respective lean controls; \$\$ $p<0.01$ *ovx* ZF versus *non-ovx* Leans.

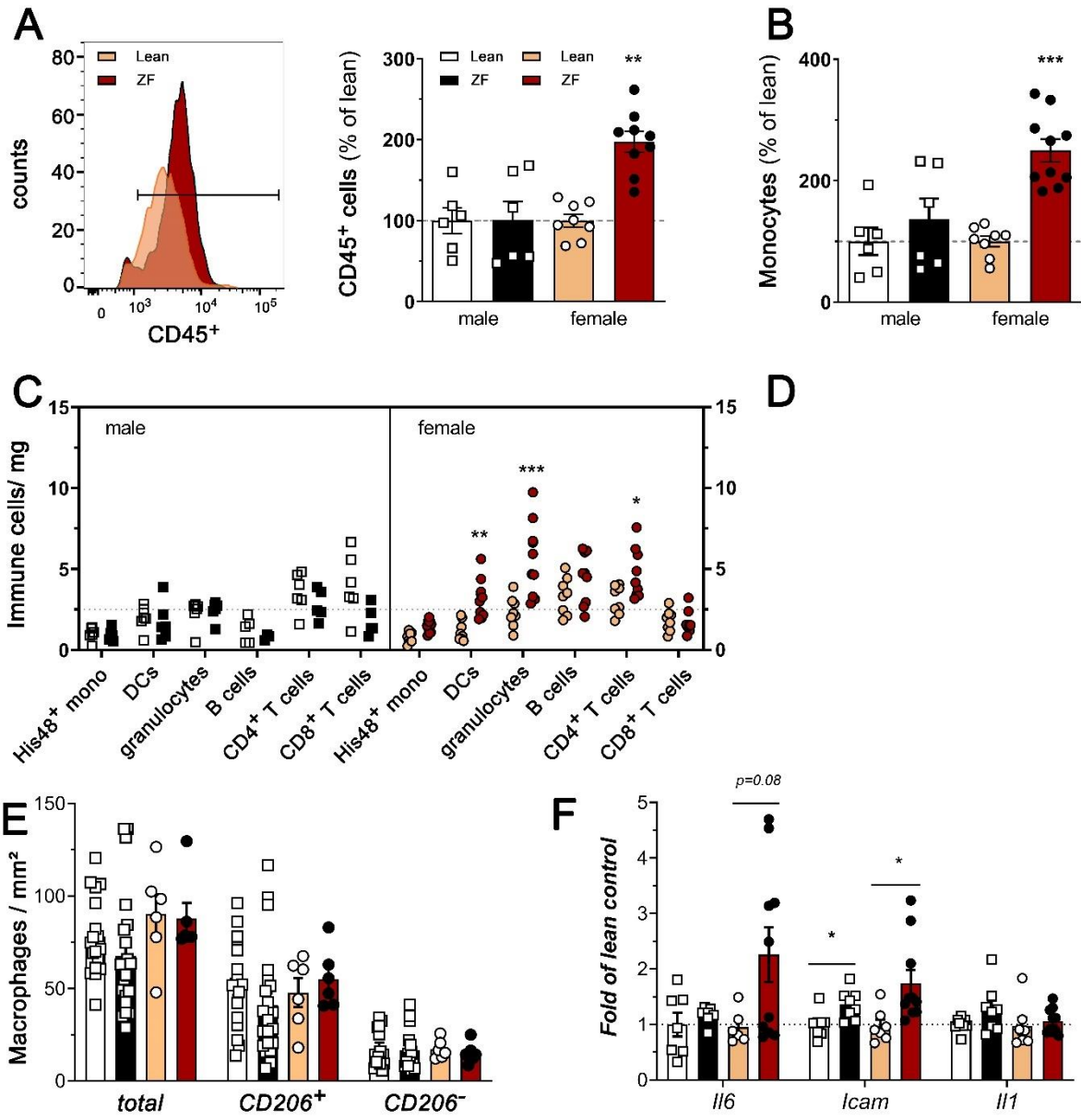


Fig. 5 – Cardiac inflammation in female but not male ZF rats

Cardiac samples ($n=6-9$ rats / group) were examined by flow cytometry to determine the degree of inflammation. Examples and quantification of cardiac CD45⁺ leucocyte levels (a). Males are indicated by square symbols, ZF male group is shown in black bars or closed black square symbols. Females are indicated by circle symbols, Lean groups are shown in yellow, while ZF female groups are shown in red. Quantification of relative cardiac CD11b⁺ SSC^{low} MHCII^{low} monocyte levels (b). Quantification of classical (His48⁺) monocytes, dendritic cells (DCs), granulocytes, B cells, and T cells (c). Immunohistochemical analyses (d, CD68⁺, grey; CD206⁺, red; x20 magnification, scalebar 20 μ m) for quantification of total CD68⁺ cardiac macrophages, CD206⁺ non-classical macrophages, and classical CD206^{neg} macrophage subpopulations (e). Cardiac gene expression analyses of *Il6*, *Il1b* and *Icam1* (f). Data is shown as mean \pm sem. Groups were compared by one-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test or by non-parametric Kruskal Wallis followed by Dunn's posthoc test: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ versus respective lean controls.

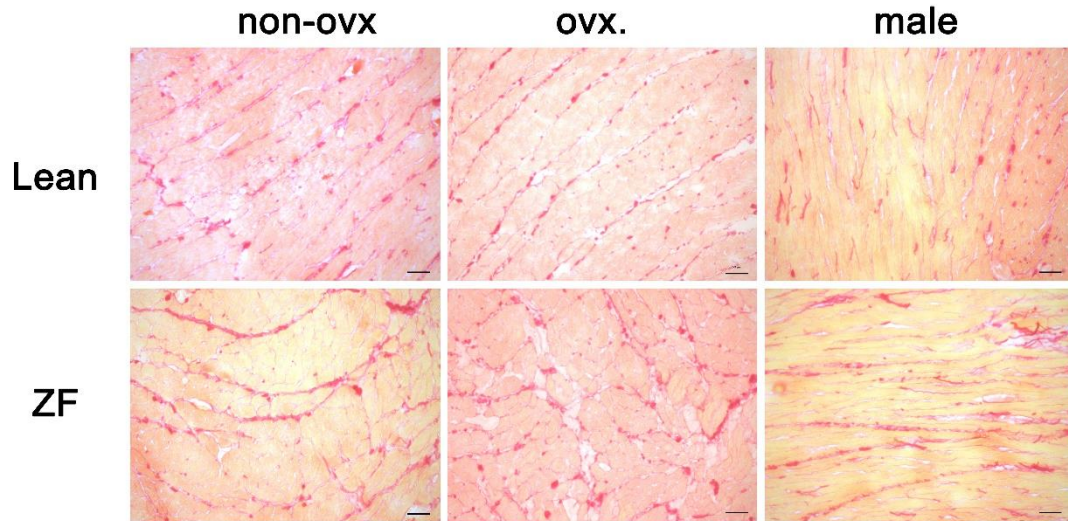


Fig. 6 – Diffuse cardiac fibrosis in male and female ZF rats

Cardiac samples ($n=6-9$ rats / group) were examined by histology to determine the degree of fibrosis. Examples (a) and quantification (b) of cardiac interstitial fibrosis. Males are indicated by square symbols, ZF male group is shown in black bars or closed black square symbols. Females are indicated by circle symbols, Lean groups are shown in yellow, while ZF female groups are shown in red. Cardiac expression analyses of collagen (c). Data is shown as mean \pm sem. Groups were compared by one-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test or by non-parametric Kruskal Wallis followed by Dunn's posthoc test: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ versus respective lean controls.

Table 1 Plasma analyses in Zucker rats at 24 weeks of age

		FEMALE						MALE		
parameter	unit	Lean <i>non-ovx</i>	Lean <i>ovx</i>	ZF <i>non-ovx</i>	ZF <i>ovx</i>	ZF <i>non-ovx</i> vs <i>Lean</i>	ZF <i>ovx.</i> vs <i>Lean</i>	Lean	ZF	ZF male vs <i>Lean</i>
N=		7	8-16	6-7	8-26			6-13	7-15	
BW	g	253 ± 4	315 ± 4	525 ± 26	535 ± 7	<i>p</i> <0,001	<i>p</i> <0,001	415 ± 23	566 ± 16	<i>p</i> <0,001
Triglyceride	mmol/L	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,0	5,0 ± 1,0	6,7 ± 1,1	<i>p</i> <0,05	<i>p</i> <0,001	1,3 ± 0,1	7,3 ± 0,9	<i>p</i> <0,001
Glycemia	mmol/L	4,6 ± 0,2	4,4 ± 0,2	4,8 ± 0,3	4,4 ± 0,2	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>	5,3 ± 0,2	5,6 ± 0,2	<i>n.s</i>
TyG index	A.U	8,7 ± 0,1	8,4 ± 0,1	10,5 ± 0,3	10,4 ± 0,1	<i>p</i> <0,01	<i>p</i> <0,001	8,8 ± 0,1	10,15 ± 0,1	<i>p</i> <0,001
Fructosamine	µmol/L	119 ± 2	141 ± 3	121 ± 5	141 ± 2	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>	121 ± 3	134 ± 2	<i>p</i> <0,05
Creatine	µmol/L	24 ± 2	27 ± 1	18 ± 1	24 ± 1	<i>n.s</i>	<i>n.s</i>	26 ± 1	25 ± 1	<i>n.s</i>
Protein	g/L	52 ± 0	56 ± 1	57 ± 1	61 ± 0	<i>p</i> <0,05	<i>p</i> <0,001	58 ± 1	59 ± 1	<i>n.s</i>
Cholesterol	mmol/L	2,2 ± 0,1	3,2 ± 0,1	5,2 ± 0,5	8,9 ± 0,4	<i>p</i> <0,05	<i>p</i> <0,001	3,2 ± 0,2	7,5 ± 0,6	<i>p</i> <0,001
LDL	mmol/L	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1	<i>n.s</i>	<i>p</i> <0,001	0,8 ± 0,1	1,9 ± 0,2	<i>p</i> <0,05
HDL	mmol/L	1,6 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,1 ± 0,1	3,2 ± 0,2	<i>n.s</i>	<i>p</i> <0,001	2,4 ± 0,1	3,6 ± 0,3	<i>p</i> <0,05
Insulin	U/mL	ND	ND	ND	ND	-	-	1,3 ± 0,5	4,9 ± 0,6	<i>p</i> <0,05

BW, body weight; TyG, Triglyceride-glucose index; ND, not determined; One-way ANOVA, Obese *versus* respective Lean controls * *p*<0.05, ** *p*<0.01, *** *p*<0.001

Table 2 : Echocardiography of Zucker rats at 24 weeks of age

parameter	unit	FEMALE			MALE		
		Lean ovx	ZF ovx	vs Lean	Lean	ZF	vs Lean
	N=	10-12	25-26		8-9	10-14	
BW	g	314 ± 5	530 ± 9	<i>p</i> <0,001	427 ± 12	561 ± 12	<i>p</i> <0,001
AWT ED	<i>mm</i>	1,9 ± 0,08	2,0 ± 0,05	<i>n.s</i>	1,9 ± 0,08	2,0 ± 0,06	<i>n.s</i>
AWT ES	<i>mm</i>	3,2 ± 0,06	3,5 ± 0,06	<i>p</i> <0,001	3,7 ± 0,1	3,5 ± 0,09	<i>n.s</i>
LVEDD	<i>mm</i>	6,7 ± 0,2	6,8 ± 0,1	<i>n.s</i>	7,5 ± 0,2	7,4 ± 0,2	<i>n.s</i>
LVESD	<i>mm</i>	3,5 ± 0,1	3,4 ± 0,1	<i>n.s</i>	3,6 ± 0,2	4,0 ± 0,1	<i>p</i> =0,10
FS	<i>%</i>	48 ± 1	50 ± 1	<i>n.s</i>	52 ± 2	47 ± 1	<i>p</i> <0,05
VTI	<i>cm</i>	5,5 ± 0,2	5,8 ± 0,1	<i>n.s</i>	5,3 ± 0,3	4,8 ± 0,1	<i>n.s</i>
SV	<i>μL</i>	365 ± 11	383 ± 5	<i>n.s</i>	348 ± 17	320 ± 10	<i>n.s</i>
CO	<i>mL/min</i>	150 ± 6	161 ± 3	<i>n.s</i>	127 ± 7	107 ± 5	<i>n.s</i>
HR	<i>bpm</i>	414 ± 8	421 ± 4	<i>n.s</i>	364 ± 6	334 ± 11	<i>n.s</i>
EF	<i>%</i>	78 ± 1	80 ± 1	<i>n.s</i>	81 ± 2	76 ± 1	<i>p</i> =0,06

BW, body weight; *AWT ED*, anterior wall thickness end diastole; *AWT ES*, anterior wall thickness end systole; *LVEDD*, left ventricular end diastolic diameter; *LVESD*, left ventricular end systolic diameter; *FS*, fractional shortening; *VTI*, velocity time integral; *SV*, stroke volume; *CO*, cardiac output; *HR*, heart rate; *EF*, ejection fraction. One-way ANOVA, Obese vs. Lean for each gender. * *p*<0.05, ** *p*<0.01, *** *p*<0.001 versus respective lean controls.

Table 3 : Cardiac gene expression analyses in Zucker rats at 24 weeks of age

<i>Fold of B2m</i>	<i>FEMALE</i>			<i>MALE</i>		
parameter	Lean OVX	ZF OVX	ZF OVX. vs Lean	Lean	ZF	ZF male vs Lean
N=	9	10		6	8	
<i>Nppa</i>						
<i>Col1a1</i>						
<i>Ccl2</i>	1,03 ± 0,09	1,68 ± 0,30	<i>p</i> <0,05	0,82 ± 0,10	0,98 ± 0,12	<i>n.s</i>
<i>Ccl6</i>	1,02 ± 0,09	1,30 ± 0,11	<i>n.s</i>	0,92 ± 0,09	1,02 ± 0,11	<i>n.s</i>
<i>Ccl21</i>	0,89 ± 0,06	0,99 ± 0,15	<i>n.s</i>	0,62 ± 0,03	0,62 ± 0,04	<i>n.s</i>
<i>Cx3cr1</i>	0,99 ± 0,06	1,29 ± 0,14	<i>n.s</i>	2,25 ± 0,27	2,69 ± 0,19	<i>n.s</i>
<i>Tnfa</i>	0,09 ± 0,02	0,11 ± 0,02	<i>n.s</i>	0,16 ± 0,03	0,18 ± 0,02	<i>n.s</i>

Cardiac gene expression normalized to house-keeping gene *B2m*. One-way ANOVA, Obese vs. Lean for each gender. * *p*<0.05, ** *p*<0.01, *** *p*<0.001 versus respective lean controls

Annexe 2 : Article en cours de soumission, *supplemental data*

Supplemental Materials & Methods

This study was performed in adult male and female Zucker Lean and Fatty rats (Charles River Laboratories, France) after review by the Normandy ethical review board and under authorization by the French Ministry of Education, Research and Innovation (APAFIS # 21430-2019071015049227-v2). To modelize menopause, females underwent ovariectomy through a minimally invasive procedure(205). Briefly, the two ovaries were retracted through a single minimal ventral transverse incision in deeply anaesthetized rats (Xylazine 8mg/kg i.p., 2% isoflurane, local application of Lidocain 2%). Pre- and post-analgesia was given as s.c. injection of Buprenorphin (0.05 mg/kg). The distal part of the uterine horn was ligated (6-0 non-resorbable suture) before dissection of the ovaries. The remaining uterine horn was replaced in the abdomen and the surgical wound was closed in layers using resorbable suture. After sacrifice of mice, the success of the ovariectomy was confirmed by the weighing of atrophied uteri.

Exercise capacity & Body composition

Rats were accustomed to running on treadmill (slope 5%) (3/6 Treadmill, Columbus Instruments, Ohio, USA) for 2 consecutive days during 10 min. Rats were submitted to running stress test (stepwise speed increment: 2.4 m.min⁻¹ every 1 min to a maximum speed of 14.4m.min⁻¹ at a 5° incline). Fatigue was considered to occur when a rat started to lower its hindquarters and raise its snout, resulting in a significantly altered gait and an inability to remain on the treadmill. When this degree of fatigue was noted, the animal was taken off the treadmill, and total running time was recorded.

Body composition, providing fat and lean mass, was assessed in vigil rats by echo-MRI (EMR-185, Echo-MRI, USA). Calibration was performed with canola oil; whose chemical composition is similar to rodents. Parameters were normalized to rat weight (%).

Cardiovascular functional analyses

Cardiac function was evaluated by echocardiography, MRI, and hemodynamic analyses (165,178). Briefly, for echocardiography animals were lightly anaesthetized (Nesdonal, 50 mg/kg i.p.). LV diastolic and systolic diameters, as well as LV fractional

shortening were measured or calculated from transthoracic Doppler echocardiographic tracings obtained using an echocardiographic system (Vivid 7 ultrasound echograph equipped with a M12L linear probe operating at 14MHz and outfitted with Echopac PC software (GE medical)). A two-dimensional short axis view of the LV was obtained at the level of the papillary muscle in order to record M-mode tracings. LV diameters were measured by the American Society of Echocardiology leading-edge method. To evaluate heart rate (HR) and velocity time integral (VTI), a pulsed-wave Doppler of the LV outflow tract was performed, allowing calculation of stroke volume ($SV = \pi \times LV \text{ outflow radius}^2 \times VTI$) and cardiac output ($CO = SV \times HR$).

Myocardial tissue perfusion of the LV was evaluated in anesthetized rats (sodium methohexital; 50 mg/kg, IP) using an MRI (Bruker Biospec 4.7 Tesla, France) by Arterial Spin Labeling acquisition sequence, as previously described (165,206). Briefly, after adiabatic double inversion pulses to cancel the blood signal in the cavities and the blood flow T2 contribution, a single slice 12 spin echo readout was acquired in short axis views located at the base of the papillary muscles. The acquisition was synchronized with cardiac rhythm to acquire the signal only during diastole. For assessment of coronary reserve, maximal perfusion was analyzed after administration of dipyridamole (0,1 mg kg⁻¹, IP), an inhibitor of adenosine uptake.

For hemodynamic analyses, in anesthetized (sodium methohexital, 60 mg.kg⁻¹, IP) animals at the end of protocol the carotid artery was cannulated with a conductance-micromanometer catheter (SPR-819, Millar Instruments, USA) to record arterial pressure and heart rate, after which the catheter was advanced retrogradely via the carotid artery into the LV as described (178). Pressure-volume loops were obtained at baseline and during loading by gently occluding the abdominal aorta with a cotton swab. Data were stored and analysed by using Millar conductance data acquisition/analysis LabChart software (AD-Instruments, New-Zealand) and the following parameters were measured/calculated from the pressure-volume curves: LV end-systolic and end-diastolic pressures, LV end-systolic pressure-volume and end-diastolic pressure-volume relations, and LV relaxation constant Tau. After assessment of LV hemodynamics, the heart was dissected, the right and left ventricle weighted separately, and sections of the LV were either immersed in fixative or snap frozen in liquid nitrogen for subsequent histology or immunohistochemistry analyses.

Arteriography

Coronary arteries were assessed *ex vivo* by arteriography as described (178). Briefly, a coronary artery segment was isolated from heart placed in cold oxygenated Krebs buffer. A 1.5-2 mm segment of inter-septal coronary artery (internal diameter >170µm to avoid mechanical endothelial injury) was mounted on a myograph (DMT, Aarhus, Denmark). Coronary endothelium-dependent vasorelaxation was assessed in serotonin-precontracted segments (10^{-5} mol/L) by obtaining concentration–relaxing response curves to Acetylcholine (ACh, 10^{-8} to 3×10^{-5} mol/L), before and after incubation of the coronary vessel for 20 min with the NO-synthase inhibitor L-NG-nitroarginine (L-NNA, 10^{-4} M). Endothelium-independent relaxation responses to increasing concentrations of sodium nitroprusside (SNP) were also examined in serotonin (10^{-5} mol/L) pre-contracted arteries.

Cardiac histology & Immunohistochemistry

LV samples were sectioned into a central slice, which was snap-frozen. Cardiac sections were cut on a cryostat (8 µm thickness) and collected on SuperFrost plus glass slides. Cardiac sections were analyzed by histology and immunohistochemistry to determine lymphatic and blood vessel densities and sizes, immune cell infiltration, cardiomyocyte hypertrophy and fibrosis as described(165). Briefly, cryosections of 10 µm were fixed in Bouin's fixative for histology or in acetone for immunohistochemistry. Sirius red staining was used to reveal collagen content, imaged by light microscopy at x40 objective. Immunohistochemical staining was performed, after blocking of non-specific binding (3% BSA) followed by Biotin-Avidin Blocking kit (Thermo Scientific) when streptavidin (SA)-conjugates were used to detect biotinylated secondary antibodies. Primary antibodies (see **table S1**) diluted in 1% BSA in PBS were incubated on the slides for 1h at r.t.. After repeated washing in PBS, fluorescent-conjugated secondary antibodies (see **table S2**) were applied for 30 min. Double or triple staining were performed sequentially, and negative controls included omission of primary antibodies. After washing, slides were mounted in Vectashield with DAPI and images were obtained at x20 or x40 objectives on a Zeiss epifluorescence microscope (Axiolmager J1) equipped with an apotome and Zen 2012 software (Zeiss). Images were analyzed by an operator blinded to the treatment groups using Fiji imaging software (NIH).

Table S1 – Primary antibodies & reagents

antigen	article	supplier	species reactivity	host	dilution	Conc (µg/mL)
alpha SMA-A488	<i>F3777</i>	Sigma Aldrich	mouse	mouse	1/200	
CD31/PECAM	<i>555026</i>	BD	rat	mouse	1/100	0.6
CD68	MCA341R	Biorad	rat	mouse	1/400	
LYVE-1	<i>103-PA50</i>	Reliatech	mouse	rabbit	1/1000	0.4
Biotinylated LYVE-1	<i>103-PA50Bi</i>	Reliatech	mouse	rabbit	1/500	0.4
CD206	<i>PA546994</i>	Invitrogen	rat	goat	1/1500	
Podoplanin	<i>104-m40</i>	Reliatech	rat	mouse	1/500	1
WGA	<i>FP-CE8070</i>	Interchim	-	-	1/100	1

Table S2 – Secondary antibodies & reagents

antigen	Fluorochrome	article	supplier	Conc (µg/ mL)
Donkey anti-Rabbit	Cy3	<i>711-165-152</i>	Jackson Immunoresearch	3
Donkey anti-Rabbit	AF647 (Cy5)	<i>711-605-152</i>	Jackson Immunoresearch	1.5
Donkey anti-Goat	DYLIGHT 488	<i>A50-201D2</i>	Interchim	1.3
Donkey anti-Goat	DYLIGHT 550	<i>A50-201D3</i>	Interchim	1.3
Biotinylated Donkey anti-Goat	-	<i>705-065-147</i>	Jackson Immunoresearch	
Donkey anti-Mouse	A488	<i>715-545-151</i>	Jackson Immunoresearch	1.5
Streptavidin	Fluoprobe 547 (Cy3)	<i>FP-CA5570</i>	Interchim fluoprobes	0.7
Streptavidin	Fluoprobe 647 (Cy5)	<i>FP-CA5640</i>	Interchim fluoprobes	0.7

Whole mount-staining of cardiac lymphatics was performed followed by a modified iDISCO+ clearing protocol for imaging by light sheet (ultramicroscope II, LaVision BioTec) and confocal laser scanning (Leica SP8) microscopy(166). Briefly, prior to sacrifice, deeply anesthetized rats were perfused with warm saline solution, followed by perfusion-fixation with warm 3% paraformaldehyde (PFA). Hearts were removed and post-fixed (3% PFA) for 6h. Following dehydration in graded methanol baths, and post-fixation in Dent's fixative, samples were bleached in graded H₂O₂ baths. After extensive blocking of non-specific binding sites and tissue permeation with Triton-X100, cardiac lymphatics were stained using antibodies reactive against Lyve1 (rabbit

polyclonal antimouse, #103-PA50AG, Reliatech, 1/500) and Podoplanin (mouse antirat, #104-m40, Reliatech, 1/250), followed by fluorescence-coupled secondary antibodies (Cy5-conjugated donkey anti-rabbit, 1/500; Cy3- conjugated donkey anti mouse, 1/400; Jackson). Alternatively, arterial vasculature was visualized using Cy3-conjugated anti-alpha-smooth muscle actin antibodies (mouse monoclonal, #C6198, Sigma-Aldrich, 1/300). Extensive washing was performed to remove nonspecific binding. Hearts were clarified using a modified iDISCO+ protocol, as described(166), based on incubation in graded methanol baths followed by incubation in dichloromethane (DCM, Sigma-Aldrich, #270997-12X100ML) and dibenzyl ether (DBE, Sigma-Aldrich, #108014-1KG) before light sheet and confocal imaging.

Lightsheet and confocal Imaging

3D imaging was performed by light sheet microscopy as described(166) Acquisitions were performed with an ultramicroscope II (LaVision BioTec) using the InspectorPro software (LaVision BioTec). The light sheet was generated by a laser (wavelengths 561 or 640 nm, Coherent Sapphire Laser, LaVision BioTec) focused using two cylindrical lenses. A binocular stereomicroscope (MXV10, Olympus) with an x2 objective (MVPLAPO, Olympus) was used at different magnifications (x0.8 and x4). A dipping cap protective lens, including correction optics for MVPLAPO x2 objective, was applied for working distances inferior or equal to 5.7mm. The corresponding zoom factors and numerical apertures are available at:

https://www.miltenyibiotec.com/FR-en/products/ultramicroscope-ii.html#scrollto_specs

Samples were placed in an imaging reservoir made of 100% quartz (LaVision BioTec) filled with DBE and illuminated from the side by the laser light sheet. A PCO Edge SCMOS CCD camera (2560x 2160 pixel size, LaVision BioTec) was used to capture images. The step size between each image was fixed at 6 μm (x0.8 zoom) or 2 μm (x3.2 zoom). All tiff images were generated in 16-bit.

For confocal laser scanning microscopy, imaging was performed with an upright fixed-stage TCS SP8 confocal microscope (Leica Microsystems, France) equipped with multiple laser lines (wavelengths 561 or 640 nm). In order to acquire deep confocal views, a x25 objective was used (numerical aperture 0.95, working distance 2500 μm , water immersion). Images were captured using a hybrid detector (Hamamatsu) in photon counting z-stack mode.

Image analysis

Cardiac lymphatic vessels were defined as strongly Lyve1-positive structures, lacking macrophage marker (CD68). Lymphatics are preferentially located in the subepicardium in rodent hearts. These Lyve1-positive, CD68-negative vessels clearly differ from CD68⁺ macrophages, which either lack or display weaker Lyve1 expression. These macrophages, also differing in size and morphology from the elongated cell body and nucleus typical of lymphatic endothelial cells, were readily excluded from lymphatic counts. Photos were captured at $\times 20$ or $\times 40$.

Due to the absence of conclusive markers to distinguish precollectors from capillaries in rat cardiac lymphatics, we have made use of the fact that precollectors preferentially run in a base-to-apex fashion, whereas lymphatic capillaries lack such consistent spatial organization. Hence, by evaluating vessels with a lumen parallel to horizontal cardiac sections, the precollector population of vessels is more frequently detected as vessels running perpendicular to the section (= open lumen vessels). To assess the size and frequency of *open lymphatic vessels* (diameter > 5 μm ; a population enriched in precollector vessels), between 10-20 images from the LV free-wall were collected and analyzed for each rat. The density (open vessels/ mm^2) and lymphatic lumen sizes were measured and used to calculate mean vessel diameter. The parameter % open lymphatic area was calculated as the sum total of all measured lymphatic diameters divided by the total cardiac area analyzed for each mouse heart. On average for each rat $2.1 \pm 0.16 \text{ mm}^2$ of the LV was analyzed to determine lymphatic vessel sizes and % open lymphatic area.

Blood vessels were defined as strongly CD31-positive structures. These clearly differed from lymphatic vessels that displayed weaker CD31 signal. Blood to cardiomyocyte ratios were evaluated in sections double stained for CD31 and WGA imaged at $\times 40$. Individual endothelial cells were not counted, rather vessels structures were assessed. If two vessels were adjacent and partly overlapping, they were counted as two vessels. For one vessel that divides into two branches, two vessels were counted.

Arterioles were defined as smooth muscle α -actin-positive vessels. Images were captured at $\times 20$. Cardiac macrophages were defined as CD68 positive cells. Non-classical macrophages were defined as CD206⁺ cells, and classical, proinflammatory macrophages as CD206⁻ cells. Images were captured at $\times 20$.

Cardiac collagen density was evaluated in Sirius red stained LV sections imaged on a transmitted light microscope equipped with Zen 2012 software (Zeiss) equipped with an *x40* objective. Interstitial collagen densities were calculated in the LV as the surface occupied by collagen divided by the surface of the image using an image analysis system (ImageProPlus). Perivascular fibrosis was similarly evaluated in images taken at *x20*. Images were analyzed by an operator blinded to the treatment groups using Fiji imaging software (NIH). Perivascular fibrosis is expressed as fibrotic area (μm^2) surrounding arteries in the size-range of 5-50 μm in diameter.

Lightsheet images, 3D volume, and movies were generated using Imaris x64 software (version 8.0.1, Bitplane). Z stack light sheet images were first converted to imaris file (.ims) using ImarisFileConverter and 3D reconstruction was performed using the “volume rendering” function. To facilitate image processing, images were converted to 8-bit format. Optical slices were obtained using the “orthoslicer” tool. 3D pictures and movies were generated using the “snapshot” and “animation” tools. Movie reconstruction with .tiff series were performed with NIH ImageJ (1.50e, Java 1.8.0_60, 64-bit).

Z stack confocal raw data images were deconvoluted through image processing with Huygens professional software (SVI, The Netherlands). Maximal intensity projection views were generated with Fiji Image J software (1.51u, Java 1.8.0_66, 64-bit).

Renal histology

Kidneys were harvested at the end of study and fixed in Bouin’s solutions before embedding in paraffin. Trichrome green staining of paraffin-embedded kidney sections was used for semi-quantitative scoring of glomerulosclerosis, tubular injury (necrosis and atrophy), interstitial inflammation and interstitial fibrosis, as previously described (178). A minimum of 20 glomeruli (range: 20 to 30) in each specimen were examined, and the severity of the lesion was graded from 0 to 4 and expressed as a percentage of number of the glomeruli examined.

Cardiac expression analyses

Cardiac gene expression was analyzed by RT-qPCR(166). Briefly, rat LV samples were collected and RNA extraction was performed with Trizol method. Samples were homogenized (45 sec.) in TRIZOL using Precellys tubes with beads. RNA was obtained after incubation, successively, in chloroform and isopropanol and three

washes in ethanol. RNA quality was analyzed by Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). cDNAs were generated using a reverse transcriptase after DNase treatment. Real-time polymerase chain reaction was performed on a LightCycler 480 (Roche Molecular Biochemicals) with a commercially available mix (FastStart DNA Master SYBR Green I kit; Roche) on white 96-well plates. The reactions were performed in duplicate for each sample. Concentrations were calculated using a standard curve, obtained by serial dilutions of samples from an organ with high expression of the gene of interest. To normalize gene expression, values are expressed as ratios of a reference gene ($\beta 2m$). Healthy lean animal ratios are then set as 100%, and values in obese animals are expressed relative to their respective lean controls. The sequences of the specific primers are detailed in **table s3**.

Table S3 – RT-PCR primers used for cardiac expression analyses in rats

gene	sense	antisense	amplicon (bp)
<i>B2m</i>	TCTCAGTTCCACCCACCTCA	GGTCTCGGTGGGTGTGAATT	144
<i>Vegfa</i>	TCTTCAAGCCGTCCTGTGTG	GCTGGCTTTGGTGAGGTTTG	132
<i>Vegfc</i>	GACGGACACACATGGAGGTT	AGCTAAGGAAAGGCGGCTG	209
<i>Vegfd</i>	TTGAACACCGAGCAGTGAAG	TCCTCAGAGTGTGCGACTTG	127
<i>Nppa</i>	AGCCGAGACAGCAAACATCA	TGGACACCGCACTGTATACG	141
<i>Icam1</i>	CTGCTCCTGGTCCTGGTC	GCAAGAGGAAGAGCAGTTCA	109
<i>Il1β</i>	AGATTCTTCCCCTTGAGGCC	CACTGCAGGCTTCGAGATGA	154
<i>Il6</i>	CCACTGCCTTCCCTACTTCA	TTCTGACAGTGCATCATCGC	260

Flow-cytometry

Cardiac immune cells were analyzed by flow cytometry using a **LSRFortessa** (BD Biosciences) cytometer using an 9-color panel as described(179). Results are expressed as cells per mg cardiac tissue. Briefly, animals were sacrificed under deep anaesthesia (thiopental) and following cardiac perfusion with warmed physiological saline through the abdominal aorta, hearts were recovered. LV samples were minced with scalpels and placed in ice-cold DMEM medium. Single cell suspensions were prepared, as described(166), by incubation in tissue-dissociating solution (125 U/mL collagenase type XI, #C7657, Sigma; 450 U/mL collagenase type I, #C0130, Sigma;

60 U/mL hyaluronidase type I, #H3506, Sigma; and 60 U/mL DNase 1 #DN25, Sigma) coupled to gentleMACS Dissociator (MACS; Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Digested tissues were washed with DMEM culture medium and filtered to remove undigested tissue pieces (80 μ m mesh, and 40 μ m mesh, BD Biosciences).

Single cell suspensions were prepared in FACS buffer (1% BSA in PBS with 3 mM EDTA). To block nonspecific binding of antibodies to Fc γ receptors (CD32), isolated cells were first incubated with Fc-Block for 15 minutes at 4°C. Subsequently, cells were stained with viable dye (L/D) and specific antibody cocktails (see **table s4**) for 20 minutes at r.t, followed by washing with FACS buffer and resuspension in 600 μ L FACS buffer. For analyses of myeloid cells, the following combinations of antibodies was used: CD45, CD3, MHCII, CD172, CD11b/c, CD43, and His48. Monocytes were defined as live CD45⁺/CD172⁺/CD11b⁺/MHCII^{low}/SSC^{low} cells, whereas classical monocytes were defined as His48⁺/CD43⁻ and non-classical monocytes as His48⁻/CD43⁺, as described(179). For analyses of lymphoid cells, the following combinations of antibodies was used: CD45, CD172, B220, CD3, CD4, and CD8. T cells were identified as live CD45⁺/CD172⁻/CD3⁺ cells. B cells were identified as live CD45⁺/B220⁺ cells. To quantify immune cells per mg heart, fluobeads (Flow-count Fluorospheres, Beckman coulter #7547053) were added to each sample prior to analysis. Flow cytometry was analyzed using FlowJo software (TreeStar, Inc, San Carlos, CA). Results are expressed as immune cells per mg heart tissue.

Table S4 – Antibodies used for flow cytometry analyses in rats

Antigen	Fluorochrome	Source & catalogue #
CD32 (Fc block)	-	BD, 550271
Fixable Viability Dye (L/D)	eFluor 455UV	eBioscience, 65-0863-14
CD45	AF700	Sonybiotech, 1611090
CD45	APC-Cy7	Ozyme/Biolegend, 202216
CD45	BV786	BD, 740914
CD11b/c	BV605	BD, 743979
CD43	PE	Sonybiotech, 1614060
His48 (CSF3)	A488	eBioscience, 11-0570-82
CD172	APC	eBioscience, 17-1720-82
MHCII (I-A/I-E)	PerCP-eFluo710	eBioscience, 46-0463-82
CD206	APC	Sonybiotech, 1308540
CD206	PE-Cy7	Sonybiotech, 1308600
CD45R (B220)	PE-Cy7	eBioscience, 25-0460-82
CD3	Viogreen/405?	Miltenyi, 130-102-676
CD4	APC-Cy7	Sonybiotech,1607590
CD8a	PerCP-eFluo710	eBioscience, 46-0084-82

Plasma biochemistry

Blood samples, obtained after overnight fasting, were prepared with either EDTA or heparin for generation of plasma samples, which were processed by standardized biochemical assays to determine plasma glucose, triglyceride, cholesterol, insulin, and creatinine levels.

To evaluate insulin sensitivity, glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT) were performed in animals after overnight fasting as described(178). Briefly, for GTT oral administration of glucose (2 g/kg body weight) was used, and for ITT 1 U/kg of Actrapid was administered IP. Glucose strips (Glu-Test Strips, Nova Biomedicals, UK) and a glucometer (StatStrip Xpress-I, Nova Biomedicals, U.K.) were used to assess plasma glucose levels at regular intervals. Blood samples were collected from the tail vein, and glucose levels were measured after 15, 30, 45, 60, 90 and 120 minutes.

Vascular permeability and Tissue water content

To analyze vascular leakage animals a modified Miles assay was used. Evans blue solution (EB, 20 mg/mL) was prepared in physiological saline. Rats were

anaesthetized using 2% isoflurane. Slow intravenous injection of 1 mL EB solution per animal was performed in the jugular vein and allowed to circulate for exactly 2h. The animal was killed under deep anaesthesia (Thiopental) and a blood sample drawn as an internal control. Tissue samples (heart, lung, kidney, liver) were removed, briefly rinsed in ice-cold physiological saline, and sample wet weight was recorded. Samples were desiccated in the dark at for 5 days at 65°C to evaluate *tissue water content* as % ((wet weight-dry weight)/wet weight) as described (165). Dry tissue samples were crushed with a glass pounder and placed in individual Eppendorf tubes. EB dye was extracted by incubation in formamide (7 µL/mg dry tissue) for 12h at 67°C in the dark. Following ultracentrifugation (8000 G, 10 min) to remove debris, the supernatant was assayed for absorbance in a spectrophotometer at 620 nm and a reference value at 740 nm was subtracted. Values were compared to a standard curve of EB diluted in formamide to calculate *amount of EB per mg dry tissue weight* after normalization for circulating plasma levels (average circulating conc. 153 ± 9 µg/mL) of EB dye.

References

1. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 3 mars 2020;141(9):e139- 596.
2. Roth GA, Forouzanfar MH, Moran AE, Barber R, Nguyen G, Feigin VL, et al. Demographic and epidemiologic drivers of global cardiovascular mortality. *N Engl J Med*. 2 avr 2015;372(14):1333-41.
3. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Lond Engl*. 10 janv 2015;385(9963):117-71.
4. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 7 mars 2017;135(10):e146-603.
5. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail*. août 2016;18(8):891-975.
6. Fox KF, Cowie MR, Wood DA, Coats AJ, Gibbs JS, Underwood SR, et al. Coronary artery disease as the cause of incident heart failure in the population. *Eur Heart J*. févr 2001;22(3):228-36.
7. Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KK. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA*. 22 mai 1996;275(20):1557-62.
8. Cowie MR, Wood DA, Coats AJ, Thompson SG, Poole-Wilson PA, Suresh V, et al. Incidence and aetiology of heart failure; a population-based study. *Eur Heart J*. mars 1999;20(6):421-8.
9. Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*. 20 juill 2006;355(3):251-9.
10. Bursi F, Weston SA, Redfield MM, Jacobsen SJ, Pakhomov S, Nkomo VT, et al. Systolic and diastolic heart failure in the community. *JAMA*. 8 nov 2006;296(18):2209-16.
11. Pfeffer MA, Shah AM, Borlaug BA. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction In Perspective. *Circ Res*. 24 mai 2019;124(11):1598-617.
12. Gerber Y, Weston SA, Redfield MM, Chamberlain AM, Manemann SM, Jiang R, et al. A contemporary appraisal of the heart failure epidemic in Olmsted County, Minnesota, 2000 to 2010. *JAMA Intern Med*. juin 2015;175(6):996-1004.

13. Chang PP, Wruck LM, Shahar E, Rossi JS, Loehr LR, Russell SD, et al. Trends in Hospitalizations and Survival of Acute Decompensated Heart Failure in Four US Communities (2005-2014): ARIC Study Community Surveillance. *Circulation*. 3 juill 2018;138(1):12-24.
14. Zile MR, Gottdiener JS, Hetzel SJ, McMurray JJ, Komajda M, McKelvie R, et al. Prevalence and significance of alterations in cardiac structure and function in patients with heart failure and a preserved ejection fraction. *Circulation*. 6 déc 2011;124(23):2491-501.
15. Redfield MM, Chen HH, Borlaug BA, Semigran MJ, Lee KL, Lewis G, et al. Effect of phosphodiesterase-5 inhibition on exercise capacity and clinical status in heart failure with preserved ejection fraction: a randomized clinical trial. *JAMA*. 27 mars 2013;309(12):1268-77.
16. Mahmood SS, Levy D, Vasan RS, Wang TJ. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. *Lancet Lond Engl*. 15 mars 2014;383(9921):999-1008.
17. Kannel WB, LeBauer EJ, Dawber TR, McNamara PM. Relation of body weight to development of coronary heart disease. The Framingham study. *Circulation*. avr 1967;35(4):734-44.
18. Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol*. juill 1974;34(1):29-34.
19. Kannel WB, Castelli WP, Gordon T, McNamara PM. Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham study. *Ann Intern Med*. janv 1971;74(1):1-12.
20. Kannel WB, Castelli WP, McNamara PM. Serum lipid fractions and risk of coronary heart disease. The Framingham study. *Minn Med*. août 1969;52(8):1225-30.
21. Kannel WB, Schwartz MJ, McNamara PM. Blood pressure and risk of coronary heart disease: the Framingham study. *Dis Chest*. juill 1969;56(1):43-52.
22. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA*. 11 mai 1979;241(19):2035-8.
23. Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PWF, Benjamin EJ, Larson MG, et al. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med*. 1 août 2002;347(5):305-13.
24. Wang J, Sarnola K, Ruotsalainen S, Moilanen L, Lepistö P, Laakso M, et al. The metabolic syndrome predicts incident congestive heart failure: a 20-year follow-up study of elderly Finns. *Atherosclerosis*. mai 2010;210(1):237-42.
25. Ingelsson E, Arnlöv J, Lind L, Sundström J. Metabolic syndrome and risk for heart failure in middle-aged men. *Heart Br Card Soc*. oct 2006;92(10):1409-13.
26. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Drazner MH, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American

College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 15 oct 2013;62(16):e147-239.

27. Brouwers FP, de Boer RA, van der Harst P, Voors AA, Gansevoort RT, Bakker SJ, et al. Incidence and epidemiology of new onset heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction in a community-based cohort: 11-year follow-up of PREVEND. *Eur Heart J.* mai 2013;34(19):1424-31.
28. Dhingra A, Garg A, Kaur S, Chopra S, Batra JS, Pandey A, et al. Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Curr Heart Fail Rep.* déc 2014;11(4):354-65.
29. Lam CSP, Donal E, Kraigher-Krainer E, Vasan RS. Epidemiology and clinical course of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur J Heart Fail.* janv 2011;13(1):18-28.
30. Dunlay SM, Roger VL, Redfield MM. Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol.* 11 mai 2017;
31. Vinluan CM, Zreikat HH, Levy JR, Cheang KI. Comparison of different metabolic syndrome definitions and risks of incident cardiovascular events in the elderly. *Metabolism.* mars 2012;61(3):302-9.
32. Brede S, Serfling G, Klement J, Schmid SM, Lehnert H. Clinical Scenario of the Metabolic Syndrome. *Visc Med.* oct 2016;32(5):336-41.
33. Taube A, Schlich R, Sell H, Eckardt K, Eckel J. Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1 juin 2012;302(11):H2148-2165.
34. Cheng JM, Akkerhuis KM, Battes LC, van Vark LC, Hillege HL, Paulus WJ, et al. Biomarkers of heart failure with normal ejection fraction: a systematic review. *Eur J Heart Fail.* déc 2013;15(12):1350-62.
35. DuBrock HM, AbouEzzeddine OF, Redfield MM. High-sensitivity C-reactive protein in heart failure with preserved ejection fraction. *PloS One.* 2018;13(8):e0201836.
36. Chirinos JA, Orlenko A, Zhao L, Basso MD, Cvijic ME, Li Z, et al. Multiple Plasma Biomarkers for Risk Stratification in Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol.* 24 mars 2020;75(11):1281-95.
37. Shah SJ, Marcus GM, Gerber IL, McKeown BH, Vessey JC, Jordan MV, et al. High-sensitivity C-reactive protein and parameters of left ventricular dysfunction. *J Card Fail.* févr 2006;12(1):61-5.
38. Westermann D, Lindner D, Kasner M, Zietsch C, Savvatis K, Escher F, et al. Cardiac inflammation contributes to changes in the extracellular matrix in patients with heart failure and normal ejection fraction. *Circ Heart Fail.* janv 2011;4(1):44-52.
39. Hahn VS, Yanek LR, Vaishnav J, Ying W, Vaidya D, Lee YZJ, et al. Endomyocardial Biopsy Characterization of Heart Failure With Preserved

Ejection Fraction and Prevalence of Cardiac Amyloidosis. *JACC Heart Fail.* sept 2020;8(9):712-24.

40. Mishra S, Kass DA. Cellular and molecular pathobiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol.* 11 janv 2021;
41. Mohammed SF, Hussain S, Mirzoyev SA, Edwards WD, Maleszewski JJ, Redfield MM. Coronary microvascular rarefaction and myocardial fibrosis in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation.* 10 févr 2015;131(6):550-9.
42. Kato S, Saito N, Kirigaya H, Gytoku D, Iinuma N, Kusakawa Y, et al. Impairment of Coronary Flow Reserve Evaluated by Phase Contrast Cine-Magnetic Resonance Imaging in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Heart Assoc.* 23 févr 2016;5(2).
43. Borlaug BA. The pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol.* sept 2014;11(9):507-15.
44. Weber KT, Brilla CG, Janicki JS. Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc Res.* mars 1993;27(3):341-8.
45. Levick SP, Widiapradja A. The Diabetic Cardiac Fibroblast: Mechanisms Underlying Phenotype and Function. *Int J Mol Sci.* 1 févr 2020;21(3).
46. Paulus WJ, Tschöpe C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol.* 23 juill 2013;62(4):263-71.
47. Ahmed SH, Clark LL, Pennington WR, Webb CS, Bonnema DD, Leonardi AH, et al. 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.* 2 mai 2006;113(17):2089-96.
48. Borbély A, van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer JGF, Edes I, Stienen GJM, et al. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation.* 15 févr 2005;111(6):774-81.
49. Zile MR, Baicu CF, Ikonomidis JS, Stroud RE, Nietert PJ, Bradshaw AD, et al. Myocardial stiffness in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: contributions of collagen and titin. *Circulation.* 7 avr 2015;131(14):1247-59.
50. Borbély A, Papp Z, Edes I, Paulus WJ. Molecular determinants of heart failure with normal left ventricular ejection fraction. *Pharmacol Rep PR.* févr 2009;61(1):139-45.
51. van Heerebeek L, Hamdani N, Falcão-Pires I, Leite-Moreira AF, Begieneman MPV, Bronzwaer JGF, et al. Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation.* 14 août 2012;126(7):830-9.

52. Franssen C, Chen S, Unger A, Korkmaz HI, De Keulenaer GW, Tschöpe C, et al. Myocardial Microvascular Inflammatory Endothelial Activation in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *JACC Heart Fail.* avr 2016;4(4):312-24.
53. van Heerebeek L, Borbély A, Niessen HWM, Bronzwaer JGF, van der Velden J, Stienen GJM, et al. Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation.* 25 avr 2006;113(16):1966-73.
54. Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol.* juill 2018;15(7):387-407.
55. Borlaug BA, Paulus WJ. Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Eur Heart J.* mars 2011;32(6):670-9.
56. Phan TT, Abozguia K, Nallur Shivu G, Mahadevan G, Ahmed I, Williams L, et al. Heart failure with preserved ejection fraction is characterized by dynamic impairment of active relaxation and contraction of the left ventricle on exercise and associated with myocardial energy deficiency. *J Am Coll Cardiol.* 28 juill 2009;54(5):402-9.
57. Smith CS, Bottomley PA, Schulman SP, Gerstenblith G, Weiss RG. Altered creatine kinase adenosine triphosphate kinetics in failing hypertrophied human myocardium. *Circulation.* 12 sept 2006;114(11):1151-8.
58. Jia G, DeMarco VG, Sowers JR. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol.* mars 2016;12(3):144-53.
59. Jia G, Hill MA, Sowers JR. Diabetic Cardiomyopathy: An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity. *Circ Res.* 16 févr 2018;122(4):624-38.
60. Meagher P, Adam M, Civitarese R, Bugyei-Twum A, Connelly KA. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction in Diabetes: Mechanisms and Management. *Can J Cardiol.* mai 2018;34(5):632-43.
61. Drosatos K, Schulze PC. Cardiac lipotoxicity: molecular pathways and therapeutic implications. *Curr Heart Fail Rep.* juin 2013;10(2):109-21.
62. Schiattarella GG, Altamirano F, Kim SY, Tong D, Ferdous A, Pirstine H, et al. Xbp1s-FoxO1 axis governs lipid accumulation and contractile performance in heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Commun.* 16 mars 2021;12(1):1684.
63. Cook SA, Varela-Carver A, Mongillo M, Kleinert C, Khan MT, Leccisotti L, et al. Abnormal myocardial insulin signalling in type 2 diabetes and left-ventricular dysfunction. *Eur Heart J.* janv 2010;31(1):100-11.
64. Srivaratharajah K, Coutinho T, deKemp R, Liu P, Haddad H, Stadnick E, et al. Reduced Myocardial Flow in Heart Failure Patients With Preserved Ejection Fraction. *Circ Heart Fail.* juill 2016;9(7).
65. Shah SJ, Lam CSP, Svedlund S, Saraste A, Hage C, Tan RS, et al. Prevalence and correlates of coronary microvascular dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction: PROMIS-HFpEF. *Eur Heart J.* 1 oct 2018;39(37):3439-50.

66. Dryer K, Gajjar M, Narang N, Lee M, Paul J, Shah AP, et al. Coronary microvascular dysfunction in patients with heart failure with preserved ejection fraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1 mai 2018;314(5):H1033-42.
67. Shome JS, Perera D, Plein S, Chiribiri A. Current perspectives in coronary microvascular dysfunction. *Microcirc N Y N* 1994. janv 2017;24(1).
68. Bhuiyan T, Maurer MS. Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: Persistent Diagnosis, Therapeutic Enigma. *Curr Cardiovasc Risk Rep*. oct 2011;5(5):440-9.
69. Lam CSP, Gamble GD, Ling LH, Sim D, Leong KTG, Yeo PSD, et al. Mortality associated with heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction in a prospective international multi-ethnic cohort study. *Eur Heart J*. 21 mai 2018;39(20):1770-80.
70. Yusuf S, Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJV, et al. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial. *Lancet Lond Engl*. 6 sept 2003;362(9386):777-81.
71. Massie BM, Carson PE, McMurray JJ, Komajda M, McKelvie R, Zile MR, et al. Irbesartan in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *N Engl J Med*. 4 déc 2008;359(23):2456-67.
72. Vaduganathan M, Patel RB, Michel A, Shah SJ, Senni M, Gheorghiade M, et al. Mode of Death in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol*. 7 févr 2017;69(5):556-69.
73. Lam CSP, Voors AA, de Boer RA, Solomon SD, van Veldhuisen DJ. Heart failure with preserved ejection fraction: from mechanisms to therapies. *Eur Heart J*. 7 août 2018;39(30):2780-92.
74. Ter Maaten JM, Damman K, Verhaar MC, Paulus WJ, Duncker DJ, Cheng C, et al. Connecting heart failure with preserved ejection fraction and renal dysfunction: the role of endothelial dysfunction and inflammation. *Eur J Heart Fail*. juin 2016;18(6):588-98.
75. Damman K, Testani JM. The kidney in heart failure: an update. *Eur Heart J*. 14 juin 2015;36(23):1437-44.
76. Lam CSP, Carson PE, Anand IS, Rector TS, Kuskowski M, Komajda M, et al. Sex differences in clinical characteristics and outcomes in elderly patients with heart failure and preserved ejection fraction: the Irbesartan in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction (I-PRESERVE) trial. *Circ Heart Fail*. 1 sept 2012;5(5):571-8.
77. Beale AL, Nanayakkara S, Kaye DM. Impact of Sex on Ventricular-Vascular Stiffness and Long-Term Outcomes in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: TOPCAT Trial Substudy. *J Am Heart Assoc*. 2 juill 2019;8(13):e012190.

78. Anker SD, Butler J, Filippatos G, Ferreira JP, Bocchi E, Böhm M, et al. Empagliflozin in Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction. *N Engl J Med*. 14 oct 2021;385(16):1451-61.
79. Loffredo FS, Nikolova AP, Pancoast JR, Lee RT. Heart failure with preserved ejection fraction: molecular pathways of the aging myocardium. *Circ Res*. 20 juin 2014;115(1):97-107.
80. Valero-Muñoz M, Backman W, Sam F. Murine Models of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: a « Fishing Expedition ». *JACC Basic Transl Sci*. déc 2017;2(6):770-89.
81. Doi R, Masuyama T, Yamamoto K, Doi Y, Mano T, Sakata Y, et al. Development of different phenotypes of hypertensive heart failure: systolic versus diastolic failure in Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens*. janv 2000;18(1):111-20.
82. Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas PS. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation*. 15 mai 1995;91(10):2642-54.
83. Carbone S, Mauro AG, Toldo S, Abbate A. Diet-Induced Obesity HFpEF Murine Models. *JACC Basic Transl Sci*. févr 2018;3(1):157.
84. Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Fairus A, Ima-Nirwana S. Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr Metab*. 2016;13:65.
85. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*. 15 déc 2005;438(7070):946-53.
86. Tammela T, Alitalo K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell*. 19 févr 2010;140(4):460-76.
87. Aspelund A, Robciuc MR, Karaman S, Mäkinen T, Alitalo K. Lymphatic System in Cardiovascular Medicine. *Circ Res*. 5 févr 2016;118(3):515-30.
88. Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G, Gunn MD, et al. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J*. 2 avr 2002;21(7):1505-13.
89. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol*. janv 2004;5(1):74-80.
90. Karkkainen MJ, Ferrell RE, Lawrence EC, Kimak MA, Levinson KL, McTigue MA, et al. Missense mutations interfere with VEGFR-3 signalling in primary lymphoedema. *Nat Genet*. juin 2000;25(2):153-9.
91. Alitalo K. The lymphatic vasculature in disease. *Nat Med*. 7 nov 2011;17(11):1371-80.

92. Schwager S, Detmar M. Inflammation and Lymphatic Function. *Front Immunol.* 2019;10:308.
93. Yin N, Zhang N, Xu J, Shi Q, Ding Y, Bromberg JS. Targeting Lymphangiogenesis After Islet Transplantation Prolongs Islet Allograft Survival. *Transplantation.* 15 juill 2011;92(1):25-30.
94. Nykänen AI, Sandelin H, Krebs R, Keränen MAI, Tuuminen R, Kärpänen T, et al. Targeting lymphatic vessel activation and CCL21 production by vascular endothelial growth factor receptor-3 inhibition has novel immunomodulatory and antiarteriosclerotic effects in cardiac allografts. *Circulation.* 30 mars 2010;121(12):1413-22.
95. Mertlitz S, Shi Y, Kalupa M, Grötzinger C, Mengwasser J, Riesner K, et al. Lymphangiogenesis is a feature of acute GVHD, and VEGFR-3 inhibition protects against experimental GVHD. *Blood.* 30 mars 2017;129(13):1865-75.
96. Loukas M, Abel N, Tubbs RS, Grabska J, Birungi J, Anderson RH. The cardiac lymphatic system. *Clin Anat N Y N.* sept 2011;24(6):684-91.
97. Lupinski RW. Aortic fat pad and atrial fibrillation: cardiac lymphatics revisited. *ANZ J Surg.* févr 2009;79(1-2):70-4.
98. Brakenhielm E, Alitalo K. Cardiac lymphatics in health and disease. *Nat Rev Cardiol.* janv 2019;16(1):56-68.
99. Kholová I, Dragneva G, Cermáková P, Laidinen S, Kaskenpää N, Hazes T, et al. Lymphatic vasculature is increased in heart valves, ischaemic and inflamed hearts and in cholesterol-rich and calcified atherosclerotic lesions. *Eur J Clin Invest.* mai 2011;41(5):487-97.
100. Niinimäki E, Mennander AA, Paavonen T, Kholová I. Lymphangiogenesis is increased in heart valve endocarditis. *Int J Cardiol.* 15 sept 2016;219:317-21.
101. Dashkevich A, Bloch W, Antonyan A, Fries JUW, Geissler HJ. Morphological and quantitative changes of the initial myocardial lymphatics in terminal heart failure. *Lymphat Res Biol.* 2009;7(1):21-7.
102. Ebata R, Abe J, Yasukawa K, Hamada H, Higashi K, Suwazono Y, et al. Increased production of vascular endothelial growth factor-d and lymphangiogenesis in acute Kawasaki disease. *Circ J Off J Jpn Circ Soc.* 2011;75(6):1455-62.
103. Ishikawa Y, Akishima-Fukasawa Y, Ito K, Akasaka Y, Tanaka M, Shimokawa R, et al. Lymphangiogenesis in myocardial remodelling after infarction. *Histopathology.* sept 2007;51(3):345-53.
104. Klotz L, Norman S, Vieira JM, Masters M, Rohling M, Dubé KN, et al. Cardiac lymphatics are heterogeneous in origin and respond to injury. *Nature.* 4 juin 2015;522(7554):62-7.

105. Henri O, Pouehe C, Houssari M, Galas L, Nicol L, Edwards-Lévy F, et al. Selective Stimulation of Cardiac Lymphangiogenesis Reduces Myocardial Edema and Fibrosis Leading to Improved Cardiac Function Following Myocardial Infarction. *Circulation*. 12 avr 2016;133(15):1484-97; discussion 1497.
106. Houssari M, Dumesnil A, Tardif V, Kivelä R, Pizzinat N, Boukhalifa I, et al. Lymphatic and Immune Cell Cross-Talk Regulates Cardiac Recovery After Experimental Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. juill 2020;40(7):1722-37.
107. Bizou M, Itier R, Majdoubi M, Abbadi D, Pichery E, Dutaur M, et al. Cardiac macrophage subsets differentially regulate lymphatic network remodeling during pressure overload. *Sci Rep*. 19 août 2021;11(1):16801.
108. Rademakers T, van der Vorst EPC, Daissormont ITMN, Otten JJT, Theodorou K, Theelen TL, et al. Adventitial lymphatic capillary expansion impacts on plaque T cell accumulation in atherosclerosis. *Sci Rep*. 28 mars 2017;7:45263.
109. Nakano T, Nakashima Y, Yonemitsu Y, Sumiyoshi S, Chen YX, Akishima Y, et al. Angiogenesis and lymphangiogenesis and expression of lymphangiogenic factors in the atherosclerotic intima of human coronary arteries. *Hum Pathol*. avr 2005;36(4):330-40.
110. Vieira JM, Norman S, Villa Del Campo C, Cahill TJ, Barnette DN, Gunadasa-Rohling M, et al. The cardiac lymphatic system stimulates resolution of inflammation following myocardial infarction. *J Clin Invest*. 1 août 2018;128(8):3402-12.
111. Vuorio T, Ylä-Herttuala E, Laakkonen JP, Laidinen S, Liimatainen T, Ylä-Herttuala S. Downregulation of VEGFR3 signaling alters cardiac lymphatic vessel organization and leads to a higher mortality after acute myocardial infarction. *Sci Rep*. 12 nov 2018;8(1):16709.
112. Harvey NL, Srinivasan RS, Dillard ME, Johnson NC, Witte MH, Boyd K, et al. Lymphatic vascular defects promoted by Prox1 haploinsufficiency cause adult-onset obesity. *Nat Genet*. oct 2005;37(10):1072-81.
113. Lim HY, Rutkowski JM, Helft J, Reddy ST, Swartz MA, Randolph GJ, et al. Hypercholesterolemic mice exhibit lymphatic vessel dysfunction and degeneration. *Am J Pathol*. sept 2009;175(3):1328-37.
114. García Nores GD, Cuzzone DA, Albano NJ, Hespe GE, Kataru RP, Torrisi JS, et al. Obesity but not high-fat diet impairs lymphatic function. *Int J Obes* 2005. oct 2016;40(10):1582-90.
115. Kataru RP, Park HJ, Baik JE, Li C, Shin J, Mehrara BJ. Regulation of Lymphatic Function in Obesity. *Front Physiol*. 2020;11:459.
116. Blum KS, Karaman S, Proulx ST, Ochsenbein AM, Luciani P, Leroux JC, et al. Chronic high-fat diet impairs collecting lymphatic vessel function in mice. *PLoS One*. 2014;9(4):e94713.

117. Weitman ES, Aschen SZ, Farias-Eisner G, Albano N, Cuzzone DA, Ghanta S, et al. Obesity impairs lymphatic fluid transport and dendritic cell migration to lymph nodes. *PloS One*. 2013;8(8):e70703.
118. Torrisi JS, Hespe GE, Cuzzone DA, Savetsky IL, Nitti MD, Gardenier JC, et al. Inhibition of Inflammation and iNOS Improves Lymphatic Function in Obesity. *Sci Rep*. 22 janv 2016;6:19817.
119. Savetsky IL, Torrisi JS, Cuzzone DA, Ghanta S, Albano NJ, Gardenier JC, et al. Obesity increases inflammation and impairs lymphatic function in a mouse model of lymphedema. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 15 juill 2014;307(2):H165-172.
120. Clavin NW, Avraham T, Fernandez J, Daluvoy SV, Soares MA, Chaudhry A, et al. TGF-beta1 is a negative regulator of lymphatic regeneration during wound repair. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. nov 2008;295(5):H2113-2127.
121. Savetsky IL, Ghanta S, Gardenier JC, Torrisi JS, García Nores GD, Hespe GE, et al. Th2 cytokines inhibit lymphangiogenesis. *PloS One*. 2015;10(6):e0126908.
122. Shin K, Kataru RP, Park HJ, Kwon BI, Kim TW, Hong YK, et al. TH2 cells and their cytokines regulate formation and function of lymphatic vessels. *Nat Commun*. 4 févr 2015;6:6196.
123. Liao S, von der Weid PY. Inflammation-induced lymphangiogenesis and lymphatic dysfunction. *Angiogenesis*. avr 2014;17(2):325-34.
124. Zawieja SD, Gasheva O, Zawieja DC, Muthuchamy M. Blunted flow-mediated responses and diminished nitric oxide synthase expression in lymphatic thoracic ducts of a rat model of metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1 févr 2016;310(3):H385-393.
125. Zawieja SD, Wang W, Chakraborty S, Zawieja DC, Muthuchamy M. Macrophage alterations within the mesenteric lymphatic tissue are associated with impairment of lymphatic pump in metabolic syndrome. *Microcirc N Y N* 1994. oct 2016;23(7):558-70.
126. Zawieja SD, Wang W, Wu X, Nepiyushchikh ZV, Zawieja DC, Muthuchamy M. Impairments in the intrinsic contractility of mesenteric collecting lymphatics in a rat model of metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1 févr 2012;302(3):H643-653.
127. Zafar MI, Mills K, Ye X, Blakely B, Min J, Kong W, et al. Association between the expression of vascular endothelial growth factors and metabolic syndrome or its components: a systematic review and meta-analysis. *Diabetol Metab Syndr*. 2018;10:62.
128. Karaman S, Hollmén M, Robciuc MR, Alitalo A, Nurmi H, Morf B, et al. Blockade of VEGF-C and VEGF-D modulates adipose tissue inflammation and improves metabolic parameters under high-fat diet. *Mol Metab*. févr 2015;4(2):93-105.

129. Lachaux M, Soulié M, Hamzaoui M, Bailly A, Nicol L, Rémy-Jouet I, et al. Short- and long-term administration of imeglimin counters cardiorenal dysfunction in a rat model of metabolic syndrome. *Endocrinol Diabetes Metab.* juill 2020;3(3):e00128.
130. Carr MC. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab.* juin 2003;88(6):2404-11.
131. Gale SK, Van Itallie TB. Genetic obesity: estrogenic influences on the body weight and food intake of lean and obese adult Zucker (fa/fa) rats. *Physiol Behav.* juill 1979;23(1):111-20.
132. Shaw MA, Whitaker EM, Hervey E, Hervey GR. The effects of ovarian hormones on regulation of energy balance in Zucker rats. *J Endocrinol.* août 1983;98(2):165-71.
133. Mauvais-Jarvis F, Clegg DJ, Hevener AL. The Role of Estrogens in Control of Energy Balance and Glucose Homeostasis. *Endocr Rev.* juin 2013;34(3):309-38.
134. Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7 nov 2000;97(23):12729-34.
135. Rogers NH, Perfield JW, Strissel KJ, Obin MS, Greenberg AS. Reduced Energy Expenditure and Increased Inflammation Are Early Events in the Development of Ovariectomy-Induced Obesity. *Endocrinology.* mai 2009;150(5):2161-8.
136. Beale AL, Meyer P, Marwick TH, Lam CSP, Kaye DM. Sex Differences in Cardiovascular Pathophysiology: Why Women Are Overrepresented in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation.* 10 juill 2018;138(2):198-205.
137. Lam CSP, Arnott C, Beale AL, Chandramouli C, Hilfiker-Kleiner D, Kaye DM, et al. Sex differences in heart failure. *Eur Heart J.* 14 déc 2019;40(47):3859-3868c.
138. Redfield MM, Jacobsen SJ, Borlaug BA, Rodeheffer RJ, Kass DA. Age- and gender-related ventricular-vascular stiffening: a community-based study. *Circulation.* 11 oct 2005;112(15):2254-62.
139. Ho JE, Enserro D, Brouwers FP, Kizer JR, Shah SJ, Psaty BM, et al. Predicting Heart Failure With Preserved and Reduced Ejection Fraction: The International Collaboration on Heart Failure Subtypes. *Circ Heart Fail.* juin 2016;9(6):e003116.
140. Iorga A, Li J, Sharma S, Umar S, Bopassa JC, Nadadur RD, et al. Rescue of Pressure Overload-Induced Heart Failure by Estrogen Therapy. *J Am Heart Assoc.* 22 janv 2016;5(1):e002482.
141. Rossitto G, Mary S, McAllister C, Neves KB, Haddow L, Rocchiccioli JP, et al. Reduced Lymphatic Reserve in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol.* 15 déc 2020;76(24):2817-29.
142. Morfoisse F, Tatin F, Chaput B, Therville N, Vaysse C, Métivier R, et al. Lymphatic Vasculature Requires Estrogen Receptor- α Signaling to Protect From Lymphedema. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* juin 2018;38(6):1346-57.

143. Trincot CE, Xu W, Zhang H, Kulikauskas MR, Caranasos TG, Jensen BC, et al. Adrenomedullin Induces Cardiac Lymphangiogenesis After Myocardial Infarction and Regulates Cardiac Edema Via Connexin 43. *Circ Res.* 4 janv 2019;124(1):101-13.
144. Heron C, Dumesnil A, Houssari M, Renet S, Lebon A, Godefroy D, et al. Regulation and impact of cardiac lymphangiogenesis in pressure-overload-induced heart failure [Internet]. *BioRxiv*; 2021 avr [cité 30 sept 2021]. Disponible sur: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.04.27.441616>
145. Norden PR, Kume T. The Role of Lymphatic Vascular Function in Metabolic Disorders. *Front Physiol.* 2020;11:404.
146. Hespe GE, Kataru RP, Savetsky IL, García Nores GD, Torrisi JS, Nitti MD, et al. Exercise training improves obesity-related lymphatic dysfunction. *J Physiol.* 1 août 2016;594(15):4267-82.
147. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* août 2014;105(2):141-50.
148. Packer M, Lam CSP, Lund LH, Maurer MS, Borlaug BA. Characterization of the inflammatory-metabolic phenotype of heart failure with a preserved ejection fraction: a hypothesis to explain influence of sex on the evolution and potential treatment of the disease. *Eur J Heart Fail.* sept 2020;22(9):1551-67.
149. Guimbal S, Cornuault L, Rouault P, Hollier PL, Chapouly C, Bats ML, et al. Mast Cells Are the Trigger of Small Vessel Disease and Diastolic Dysfunction in Diabetic Obese Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* avr 2021;41(4):e193-207.
150. Ferrario CM, Jessup JA, Smith RD. Hemodynamic and hormonal patterns of untreated essential hypertension in men and women. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* déc 2013;7(6):293-305.
151. Zhao Z, Wang H, Jessup JA, Lindsey SH, Chappell MC, Groban L. Role of estrogen in diastolic dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1 mars 2014;306(5):H628-640.
152. Sickinghe AA, Korporaal SJA, den Ruijter HM, Kessler EL. Estrogen Contributions to Microvascular Dysfunction Evolving to Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Front Endocrinol.* 2019;10:442.
153. Nguyen ITN, Brandt MM, van de Wouw J, van Drie RWA, Wesseling M, Cramer MJ, et al. Both male and female obese ZSF1 rats develop cardiac dysfunction in obesity-induced heart failure with preserved ejection fraction. *PloS One.* 2020;15(5):e0232399.
154. Lopez Gelston CA, Balasubramanian D, Abouelkheir GR, Lopez AH, Hudson KR, Johnson ER, et al. Enhancing Renal Lymphatic Expansion Prevents Hypertension in Mice. *Circ Res.* 13 avr 2018;122(8):1094-101.

155. Sundström J, Risérus U, Byberg L, Zethelius B, Lithell H, Lind L. Clinical value of the metabolic syndrome for long term prediction of total and cardiovascular mortality: prospective, population based cohort study. *BMJ*. 15 avr 2006;332(7546):878-82.
156. Forti P, Pirazzoli GL, Maltoni B, Bianchi G, Magalotti D, Muscari A, et al. Metabolic syndrome and all-cause mortality in older men and women: Metabolic Syndrome And Mortality In Older Age. *Eur J Clin Invest*. sept 2012;42(9):1000-9.
157. He D, Zhang X, Chen S, Dai C, Wu Q, Zhou Y, et al. Dynamic Changes of Metabolic Syndrome Alter the Risks of Cardiovascular Diseases and All-Cause Mortality: Evidence From a Prospective Cohort Study. *Front Cardiovasc Med*. 4 août 2021;8:706999.
158. The GBD 2015 Obesity Collaborators. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med*. 6 juill 2017;377(1):13-27.
159. Lam CSP, Arnott C, Beale AL, Chandramouli C, Hilfiker-Kleiner D, Kaye DM, et al. Sex differences in heart failure. *Eur Heart J*. 14 déc 2019;40(47):3859-3868c.
160. Borlaug BA. The pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol*. sept 2014;11(9):507-15.
161. Obokata M, Reddy YNV, Pislaru SV, Melenovsky V, Borlaug BA. Evidence Supporting the Existence of a Distinct Obese Phenotype of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation*. 4 juill 2017;136(1):6-19.
162. Sorimachi H, Obokata M, Takahashi N, Reddy YNV, Jain CC, Verbrugge FH, et al. Pathophysiologic importance of visceral adipose tissue in women with heart failure and preserved ejection fraction. *Eur Heart J*. 21 avr 2021;42(16):1595-605.
163. Paulus WJ, Tschöpe C. A Novel Paradigm for Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol*. juill 2013;62(4):263-71.
164. Cuijpers I, Simmonds SJ, van Bilsen M, Czarnowska E, González Miqueo A, Heymans S, et al. Microvascular and lymphatic dysfunction in HFpEF and its associated comorbidities. *Basic Res Cardiol*. 25 2020;115(4):39.
165. Henri O, Pouehe C, Houssari M, Galas L, Nicol L, Edwards-Lévy F, et al. Selective Stimulation of Cardiac Lymphangiogenesis Reduces Myocardial Edema and Fibrosis Leading to Improved Cardiac Function Following Myocardial Infarction. *Circulation*. 12 avr 2016;133(15):1484-97; discussion 1497.
166. Houssari M, Dumesnil A, Tardif V, Kivelä R, Pizzinat N, Boukhalfa I, et al. Lymphatic and Immune Cell Cross-Talk Regulates Cardiac Recovery After Experimental Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40(7):1722-37.
167. Chakraborty S, Zawieja S, Wang W, Zawieja DC, Muthuchamy M. Lymphatic system: a vital link between metabolic syndrome and inflammation: Roles of lymphatics in metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci*. oct 2010;1207:E94-102.

168. Scallan JP, Zawieja SD, Castorena-Gonzalez JA, Davis MJ. Lymphatic pumping: mechanics, mechanisms and malfunction: Lymphatic pumping mechanisms. *J Physiol*. 15 oct 2016;594(20):5749-68.
169. Lim HY, Rutkowski JM, Helft J, Reddy ST, Swartz MA, Randolph GJ, et al. Hypercholesterolemic mice exhibit lymphatic vessel dysfunction and degeneration. *Am J Pathol*. sept 2009;175(3):1328-37.
170. Morfoisse F, Tatin F, Chaput B, Therville N, Vaysse C, Métivier R, et al. Lymphatic Vasculature Requires Estrogen Receptor- α Signaling to Protect From Lymphedema. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. juin 2018;38(6):1346-57.
171. Trincot CE, Xu W, Zhang H, Kulikauskas MR, Caranasos TG, Jensen BC, et al. Adrenomedullin Induces Cardiac Lymphangiogenesis After Myocardial Infarction and Regulates Cardiac Edema Via Connexin 43. *Circ Res*. 4 janv 2019;124(1):101-13.
172. Dubois C, Rocks N, Blacher S, Primac I, Gallez A, García-Caballero M, et al. Lymph/angiogenesis contributes to sex differences in lung cancer through oestrogen receptor alpha signalling. *Endocr Relat Cancer*. févr 2019;26(2):201-16.
173. Brakenhielm E, Alitalo K. Cardiac lymphatics in health and disease. *Nat Rev Cardiol*. janv 2019;16(1):56-68.
174. Brakenhielm E, González A, Díez J. Role of Cardiac Lymphatics in Myocardial Edema and Fibrosis: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol*. 11 août 2020;76(6):735-44.
175. Fudim M, Salah HM, Sathananthan J, Bernier M, Pabon-Ramos W, Schwartz RS, et al. Lymphatic Dysregulation in Patients With Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. juill 2021;78(1):66-76.
176. Rossitto G, Mary S, McAllister C, Neves KB, Haddow L, Rocchiccioli JP, et al. Reduced Lymphatic Reserve in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol*. déc 2020;76(24):2817-29.
177. Medina-Contreras J, Villalobos-Molina R, Zarain-Herzberg A, Balderas-Villalobos J. Ovariectomized rodents as a menopausal metabolic syndrome model. A minireview. *Mol Cell Biochem*. déc 2020;475(1-2):261-76.
178. Lachaux M, Soulié M, Hamzaoui M, Bailly A, Nicol L, Rémy-Jouet I, et al. Short- and long-term administration of imeglimin counters cardiorenal dysfunction in a rat model of metabolic syndrome. *Endocrinol Diabetes Metab*. juill 2020;3(3):e00128.
179. Barnett-Vanes A, Sharrock A, Birrell MA, Rankin S. A Single 9-Colour Flow Cytometric Method to Characterise Major Leukocyte Populations in the Rat: Validation in a Model of LPS-Induced Pulmonary Inflammation. Sanchez-Margalet V, éditeur. *PLOS ONE*. 14 janv 2016;11(1):e0142520.
180. Zucker TF, Zucker LM. Fat Accretion and Growth in the Rat. *Obes Res*. janv 1996;4(1):102-8.

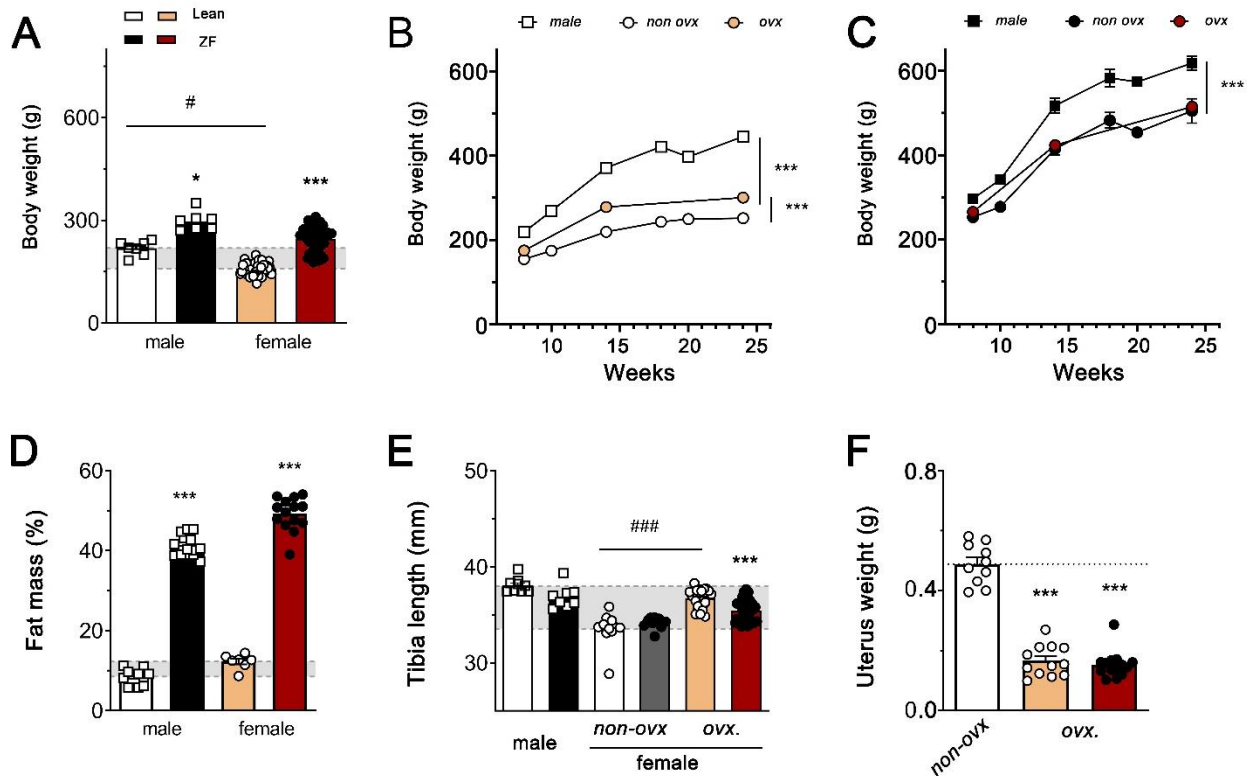
181. Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Mostefai HA, Tesse A, Mulder P, Rouet P, et al. Red Wine Polyphenols Prevent Metabolic and Cardiovascular Alterations Associated with Obesity in Zucker Fatty Rats (Fa/Fa). Polidori C, éditeur. PLoS ONE. 18 mai 2009;4(5):e5557.
182. Favre J, Gao J, Henry JP, Remy-Jouet I, Fourquaux I, Billon-Gales A, et al. Endothelial Estrogen Receptor α Plays an Essential Role in the Coronary and Myocardial Protective Effects of Estradiol in Ischemia/Reperfusion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* déc 2010;30(12):2562-7.
183. Heron C, Dumesnil A, Houssari M, Renet S, Lebon A, Godefroy D, et al. Regulation and impact of cardiac lymphangiogenesis in pressure-overload-induced heart failure [Internet]. *Physiology*; 2021 avr [cité 30 sept 2021]. Disponible sur: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.04.27.441616>
184. Wu CH, Chi JC, Jerng JS, Lin SJ, Jan KM, Wang DL, et al. Transendothelial macromolecular transport in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* août 1990;16(2):154-61.
185. Chinnakkannu P, Reese C, Gaspar JA, Panneerselvam S, Pleasant-Jenkins D, Mukherjee R, et al. Suppression of angiotensin II-induced pathological changes in heart and kidney by the caveolin-1 scaffolding domain peptide. *PloS One.* 2018;13(12):e0207844.
186. Zucker LM. Hereditary obesity in the rat associated with hyperlipemia. *Ann N Y Acad Sci.* oct 1965;131(1 Adipose Tissu):447-58.
187. Vieira JM, Norman S, Villa Del Campo C, Cahill TJ, Barnette DN, Gunadasa-Rohling M, et al. The cardiac lymphatic system stimulates resolution of inflammation following myocardial infarction. *J Clin Invest.* 1 août 2018;128(8):3402-12.
188. Bizou M, Itier R, Majdoubi M, Abbadì D, Pichery E, Dutaur M, et al. Cardiac macrophage subsets differentially regulate lymphatic network remodeling during pressure overload. *Sci Rep.* 19 août 2021;11(1):16801.
189. López B, Ravassa S, Moreno MU, José GS, Beaumont J, González A, et al. Diffuse myocardial fibrosis: mechanisms, diagnosis and therapeutic approaches. *Nat Rev Cardiol.* 10 févr 2021;
190. Zhou X, Ma L, Habibi J, Whaley-Connell A, Hayden MR, Tilmon RD, et al. Nebivolol improves diastolic dysfunction and myocardial remodeling through reductions in oxidative stress in the Zucker obese rat. *Hypertens Dallas Tex* 1979. avr 2010;55(4):880-8.
191. Nguyen ITN, Brandt MM, van de Wouw J, van Drie RWA, Wesseling M, Cramer MJ, et al. Both male and female obese ZSF1 rats develop cardiac dysfunction in obesity-induced heart failure with preserved ejection fraction. *Lionetti V, éditeur. PLOS ONE.* 6 mai 2020;15(5):e0232399.

192. Sickinghe AA, Korporaal SJA, den Ruijter HM, Kessler EL. Estrogen Contributions to Microvascular Dysfunction Evolving to Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Front Endocrinol.* 3 juill 2019;10:442.
193. Eaton CB, Pettinger M, Rossouw J, Martin LW, Foraker R, Quddus A, et al. Risk Factors for Incident Hospitalized Heart Failure With Preserved Versus Reduced Ejection Fraction in a Multiracial Cohort of Postmenopausal Women. *Circ Heart Fail* [Internet]. oct 2016 [cité 1 sept 2021];9(10). Disponible sur: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002883>
194. Zhao D, Guallar E, Ballantyne CM, Post WS, Ouyang P, Vaidya D, et al. Sex Hormones and Incident Heart Failure in Men and Postmenopausal Women: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 oct 2020;105(10):e3798-807.
195. Savji N, Meijers WC, Bartz TM, Bhambhani V, Cushman M, Naylor M, et al. The Association of Obesity and Cardiometabolic Traits With Incident HFpEF and HFrEF. *JACC Heart Fail.* août 2018;6(8):701-9.
196. Gale SK, Van Itallie TB. Genetic obesity: Estrogenic influences on the body weight and food intake of lean and obese adult Zucker (fa/fa) rats. *Physiol Behav.* juill 1979;23(1):111-20.
197. Olster DH, Auerbach ID. Deficits in Progesterone-Facilitated Sexual Behaviors and Forebrain Estrogen and Progestin Receptors in Obese Female Zucker Rats. *Neuroendocrinology.* 2000;72(6):350-9.
198. Gades MD, Stern JS, van Goor H, Nguyen D, Johnson PR, Kaysen GA. Estrogen accelerates the development of renal disease in female obese Zucker rats. *Kidney Int.* janv 1998;53(1):130-5.
199. Mohammed SF, Hussain S, Mirzoyev SA, Edwards WD, Maleszewski JJ, Redfield MM. Coronary Microvascular Rarefaction and Myocardial Fibrosis in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation.* 10 févr 2015;131(6):550-9.
200. Iorga A, Li J, Sharma S, Umar S, Bopassa JC, Nadadur RD, et al. Rescue of Pressure Overload-Induced Heart Failure by Estrogen Therapy. *J Am Heart Assoc.* 22 janv 2016;5(1):e002482.
201. Katz DH, Beussink L, Sauer AJ, Freed BH, Burke MA, Shah SJ. Prevalence, clinical characteristics, and outcomes associated with eccentric versus concentric left ventricular hypertrophy in heart failure with preserved ejection fraction. *Am J Cardiol.* 15 oct 2013;112(8):1158-64.
202. Chirinos JA, Orlenko A, Zhao L, Basso MD, Cvijic ME, Li Z, et al. Multiple Plasma Biomarkers for Risk Stratification in Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol.* mars 2020;75(11):1281-95.
203. Packer M, Lam CSP, Lund LH, Maurer MS, Borlaug BA. Characterization of the inflammatory-metabolic phenotype of heart failure with a preserved ejection

fraction: a hypothesis to explain influence of sex on the evolution and potential treatment of the disease. *Eur J Heart Fail.* sept 2020;22(9):1551-67.

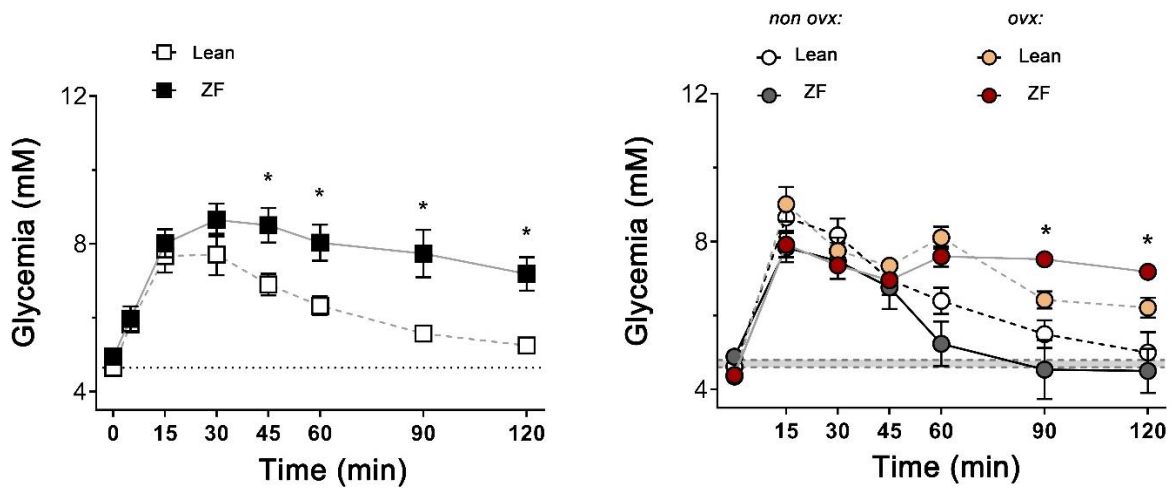
204. Lopez Gelston CA, Balasubbramanian D, Abouelkheir GR, Lopez AH, Hudson KR, Johnson ER, et al. Enhancing Renal Lymphatic Expansion Prevents Hypertension in Mice. *Circ Res.* 13 avr 2018;122(8):1094-101.
205. Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Description of a new method of ovariectomy in female rats. *Rev Bras Reumatol.* juin 2012;52(3):462-70.
206. Banquet S, Gomez E, Nicol L, Edwards-Lévy F, Henry JP, Cao R, et al. Arteriogenic therapy by intramyocardial sustained delivery of a novel growth factor combination prevents chronic heart failure. *Circulation.* 30 août 2011;124(9):1059-69.

Supplemental Figures



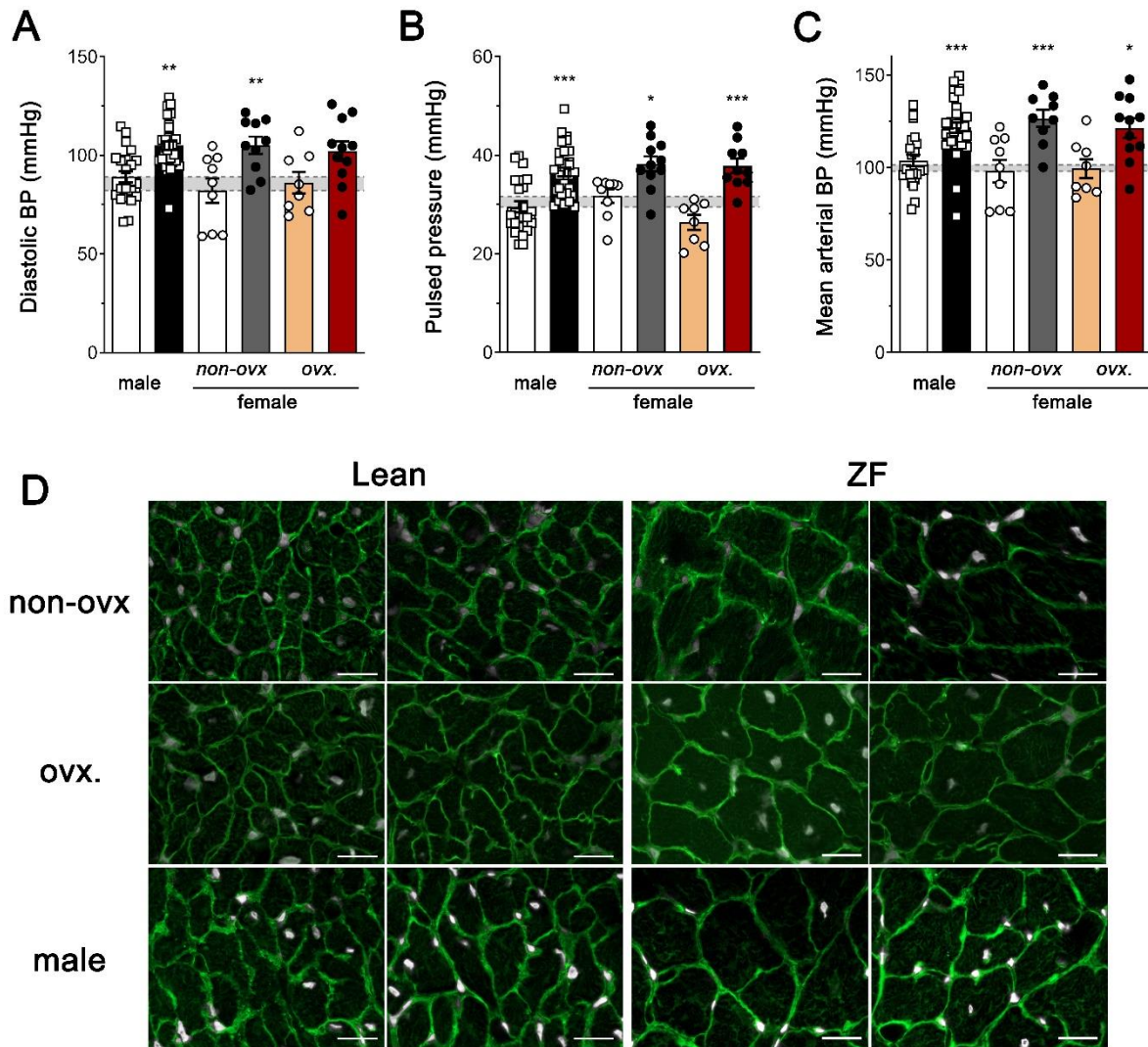
Suppl Fig. 1 –Body weight gain in male and female ZF rats

Lean and ZF rats ($n=6-15$ rats / group) were examined to determine initial body weight at 8 weeks (a), and the kinetics of body weight gain in Lean (b) and ZF rats (c) throughout the study. EchoMRI analyses of fat content at 24 weeks (d). Tibial length (e), and uterine mass (f) evaluated at 24 weeks. Males are indicated by square symbols, ZF male group is shown in black bars. Females are indicated by circle symbols, Lean groups are shown in white (*non-ovx*) or yellow (*ovx*) bars, while ZF female groups are shown in dark grey (*non-ovx*) or red (*ovx*) bars. Data is presented as mean \pm sem. Groups were compared by one-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test or by non-parametric Kruskal Wallis followed by Dunn's posthoc test: * $p<0.05$, *** $p<0.001$ versus respective lean controls; # $p<0.05$, ### $p<0.001$ Lean male and ovx females versus non-ovx Leans.



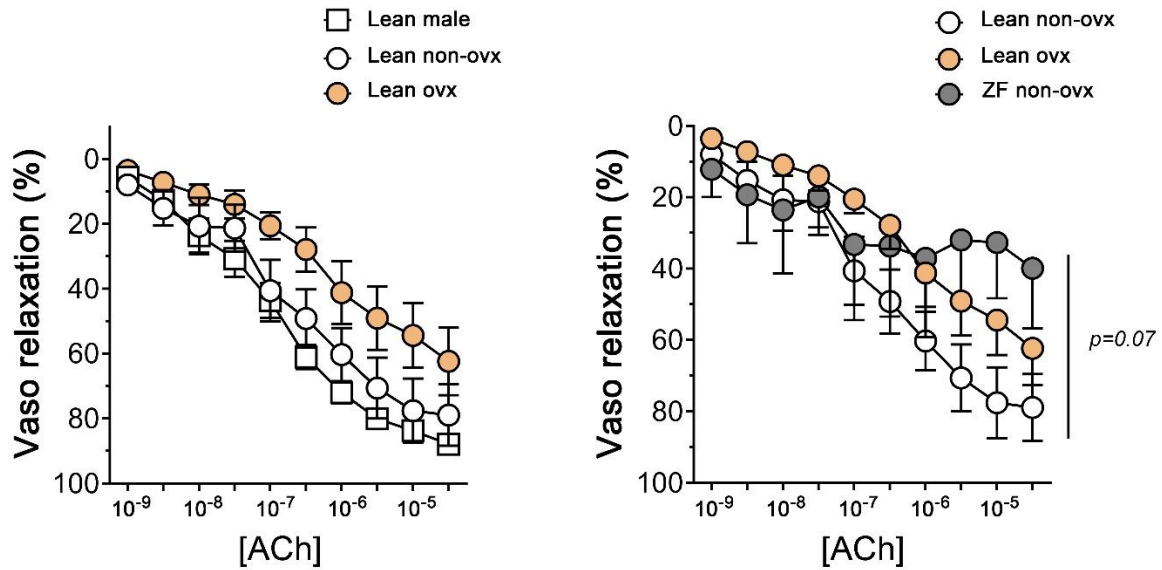
Suppl Fig. 2 –Glucose tolerance test in male and female ZF rats

Glucose tolerance test was performed ($n=8-14$ rats / group) at 24 weeks. Lean males are indicated by open square symbols, ZF males are indicated by closed square symbols. Lean non-ovx females are indicated by open circle symbols, Lean ovx females in yellow circles, while non ovx ZF females are shown in dark grey circles and ovx ZF females in red circles. Data is presented as mean \pm sem. Groups were compared by one-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test or by non-parametric Kruskal Wallis followed by Dunn's posthoc test: * $p < 0.05$ versus respective lean controls.



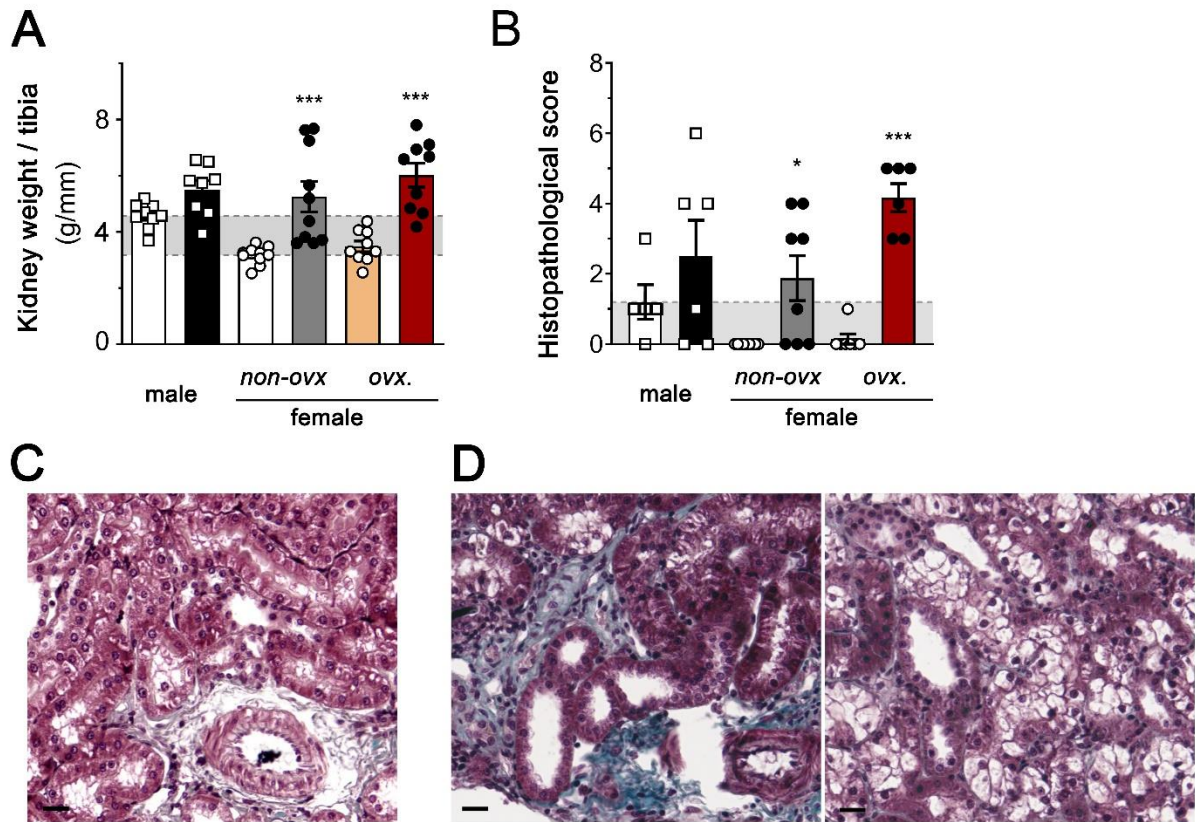
Suppl Fig. 3 –Arterial hypertension and cardiac hypertrophy in ZF rats

Hemodynamic analyses ($n=6-15$ rats / group) were used to determine diastolic blood pressure (BP, a), pulsed pressure (b), and mean arterial blood pressure (c) at 24 weeks. Males are indicated by square symbols, ZF male group is shown in black bars. Females are indicated by circle symbols, Lean groups are shown in white (*non-ovx*) or yellow (*ovx*) bars, while ZF female groups are shown in dark grey (*non-ovx*) or red (*ovx*) bars. Data is presented as mean \pm sem. Groups were compared by one-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test or by non-parametric Kruskal Wallis followed by Dunn's posthoc test: * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ versus respective lean controls. Examples of cardiomyocyte sizes (d) analyzed in cardiac sections in female (*non-ovx*. or *ovx*.) and male Lean and ZF rats respectively. WGA, green, DAPI, grey, $\times 20$. Scale bar, 20 μm .



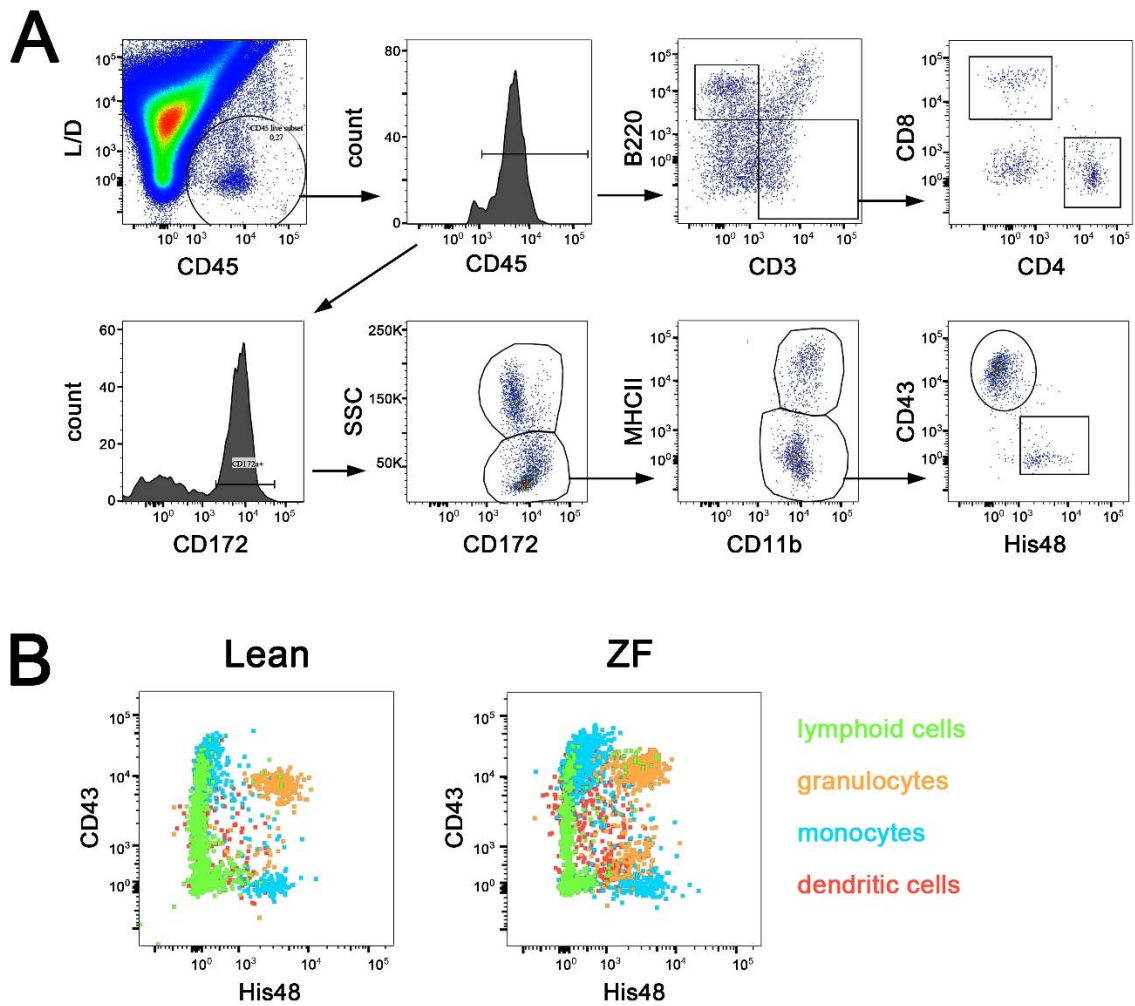
Suppl Fig. 4 –Coronary endothelial reactivity and microvascular density in Lean and ZF rats

Coronary vascular endothelial reactivity (a) to Acetylcholine (ACh) was examined *ex vivo* ($n=6-15$ rats / group). Lean males are indicated by open square symbols, Lean non-ovx females are indicated by open circle symbols, Lean ovx females in yellow circles, while non ovx ZF females are shown in dark grey circles. Data is presented as mean \pm sem. Groups were compared by one-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test or by non-parametric Kruskal Wallis followed by Dunn's posthoc test *versus* respective lean controls.



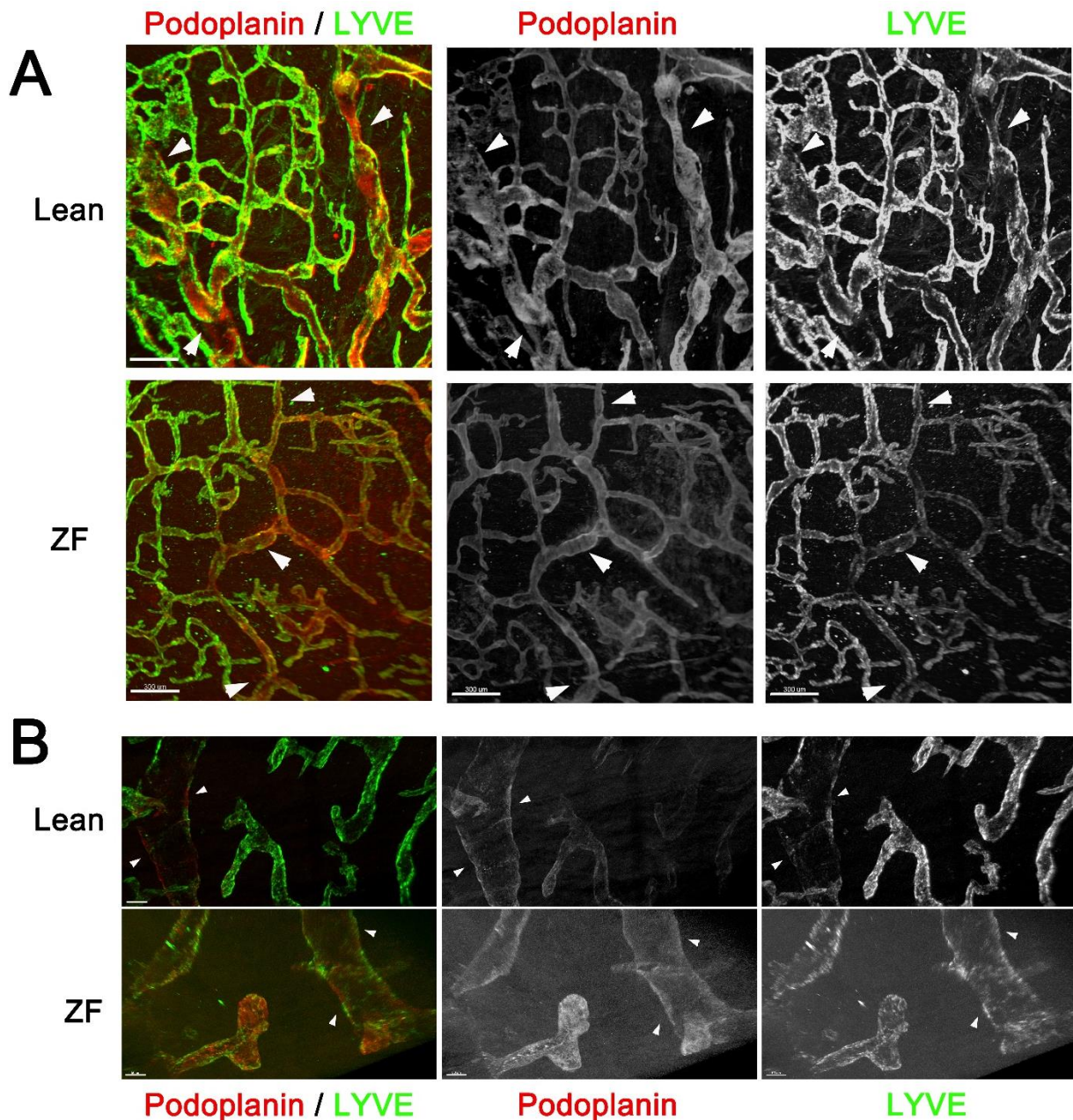
Suppl Fig. 5 –Renal changes in male and female rats

Kidney samples ($n=5-10$ rats / group) were examined to determine renal hypertrophy (a) and histopathological score (inflammation, vacuoles, fibrosis; b) at 24 weeks. Examples of renal histology in a healthy Lean rat (c), and in a ZF rat with diffuse nephropathy with tubulointerstitial focal and segmental sclerosis (Trichrome staining, $\times 20$, scale bar = $20\ \mu\text{m}$). Males are indicated by square symbols, ZF male group is shown in black bars. Females are indicated by circle symbols, Lean groups are shown in white (*non-ovx*) or yellow (*ovx*) bars, while ZF female groups are shown in dark grey (*non-ovx*) or red (*ovx*) bars. Data is presented as mean \pm sem. Groups were compared by one-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test or by non-parametric Kruskal Wallis followed by Dunn's posthoc test *versus* respective lean controls. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ *versus* respective lean controls.



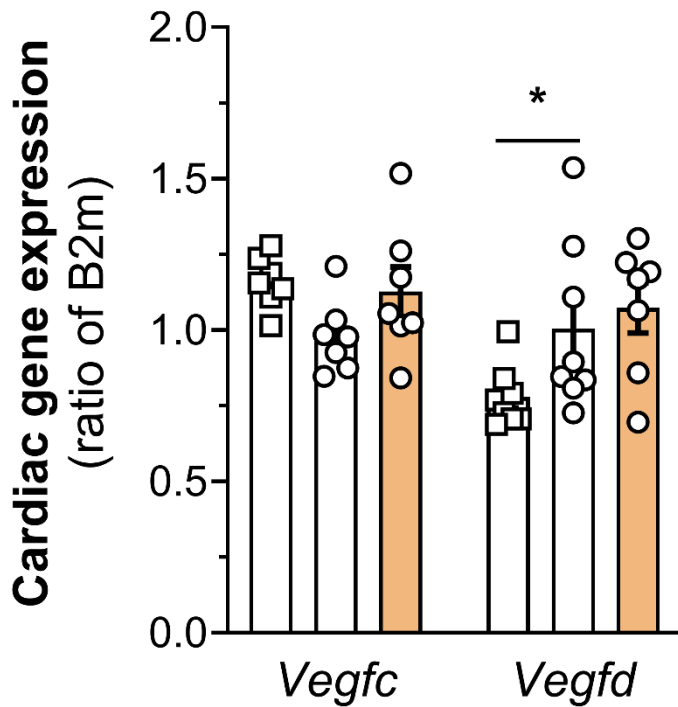
Suppl Fig. 6 –Flow cytometric evaluation of cardiac inflammation

Cardiac samples ($n=6-9$ rats / group) were examined by flow cytometry at 24 weeks to determine the degree of inflammation. Examples of gating strategies (a) L/D= live/dead stain. Overview of cardiac CD45⁺ leucocyte subpopulations in ovx. Lean vs ovx ZF female hearts (b). Lymphoid cells (*green*) were defined as B220⁺ B cells, and CD3⁺/CD4⁺ or CD3⁺/CD8⁺ T cells; Myeloid cell subpopulations, among total CD172⁺/CD11b⁺ cells, were defined as SSC^{high} for granulocytes (*orange*), MHCII^{high} for dendritic cells (*red*), and either CD43⁺ or His48⁺ monocytes among SSC^{low}/MHCII^{low} cells (*blue*).



Suppl Fig. 7 – Alteration of cardiac lymphatic profiles in MetS

Cardiac lymphatics were visualized by lightsheet microscopy (a, *LYVE1*, green; *Podoplanin*, red; Scale bar, 300 μ m), and confocal microscopy (b, *LYVE1*, green; *Podoplanin*, red; Scale bar, 50 μ m) at 24 weeks of age in Lean or ZF female rats. Arrowheads points to lymphatic *pre-collector* segments, which are endowed with valves and display lower levels of *LYVE1* as compared to the blunt-ended *capillary* lymphatic segments. In ZF rats, the level of *LYVE1* in these capillary vessels are reduced, while pre-collectors retain their patchy *LYVE1* expression.



Suppl Fig. 8 –Comparing cardiac Vegfc and Vegfd expression between genders

Cardiac samples ($n=7-8$ rats / group) from Lean rats at 24 weeks of age were examined by qPCR for expression of lymphangiogenic growth factor gene expression. Data is expressed as ratio of B2m house-keeping gene. Males are indicated by square symbols. Females, indicated by circle symbols, are shown in white (*non-ovx*) or yellow (*ovx*) bars. Data is presented as mean \pm sem. Groups were compared by one-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test. *, $p<0.05$

Impact du syndrome métabolique sur les réseaux vasculaires et lymphatiques cardiaques

Résumé

Le syndrome métabolique (Sd Met), ainsi que le sexe féminin et l'âge avancé, sont des facteurs de risque majeurs de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (ICFEP). Le manque actuel de stratégies thérapeutiques pour réduire la morbi-mortalité de l'ICFEP souligne la nécessité d'une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de la dysfonction diastolique cardiaque. Des études récentes ont révélé que le Sd Met entraîne un dysfonctionnement lymphatique systémique chez la souris et l'homme. Cependant, l'impact potentiel du Sd Met sur les lymphatiques cardiaques n'a jamais été étudié.

Nous avons émis l'hypothèse qu'une dysfonction ou un remodelage lymphatique au niveau cardiaque pourrait contribuer à aggraver l'inflammation et la dysfonction cardiaque lors du Sd Met et contribuer au développement d'ICFEP.

Après avoir validé nos modèles mâles et femelles de Sd Met et confirmé l'existence d'une dysfonction diastolique chez les rats ZF, nous avons déterminé les mécanismes sous-jacents à cette dysfonction cardiaque en évaluant la perfusion myocardique et la réserve coronaire par IRM, la densité en vaisseaux sanguins et lymphatiques au sein du myocarde, et l'aspect des lymphatiques par des techniques d'immunohistochimie et l'inflammation myocardique par cytométrie en flux et RTqPCR. Nous avons évalué la perméabilité vasculaire, l'œdème tissulaire myocardique et évalué la fibrose cardiaque interstitielle et périvasculaire.

Ce travail a permis de démontrer que tandis que le Sd Met, l'hypertrophie cardiaque et la dysfonction diastolique sont comparables entre les rats mâles et femelles ZF, seules les femelles ZF présentent une raréfaction microvasculaire sanguine et lymphatique cardiaque, accentuée par l'ovariectomie, et qui contribue à l'inflammation cardiaque et probablement à l'installation d'une fibrose et à la perte de compliance du VG.

Mots clés : Syndrome métabolique, Hypertrophie cardiaque, inflammation, dysfonction diastolique, fibrose

Impact of metabolic syndrome on cardiac vascular and lymphatic networks

Abstract

Metabolic syndrome, along with female gender and advanced age, are major risk factors for heart failure with preserved ejection fraction (HFPEF). The current lack of therapeutic strategies to reduce the morbidity and mortality of HFPEF highlights the need for a better understanding of the pathophysiological mechanisms of cardiac diastolic dysfunction. Recent studies have revealed that metabolic syndrome causes systemic lymphatic dysfunction in mice and humans. However, the potential impact of metabolic syndrome on cardiac lymphatics has never been studied.

We hypothesized that cardiac lymphatic dysfunction or remodeling may contribute to worsening cardiac inflammation and dysfunction during metabolic syndrome and contribute to the development of HFPEF.

After validating our male and female models of Sd Met and confirming the existence of diastolic dysfunction in ZF rats, we determined the mechanisms underlying this cardiac dysfunction by evaluating myocardial perfusion and coronary reserve by MRI, the density of blood and lymphatic vessels within the myocardium, and the appearance of lymphatics by immunohistochemistry techniques and myocardial inflammation by flow cytometry and RTqPCR. We assessed vascular permeability, myocardial tissue edema, and assessed interstitial and perivascular cardiac fibrosis.

This work demonstrated that while Sd Met, cardiac hypertrophy and diastolic dysfunction are comparable between male and female ZF rats, only ZF females show microvascular blood and cardiac lymphatic rarefaction, accentuated by ovariectomy, and which contributes to cardiac inflammation and probably to the onset of fibrosis and loss of LV compliance.

Keywords: Metabolic syndrome, Cardiac hypertrophy, inflammation, diastolic dysfunction, fibrosis