

# Thèse de Doctorat

Valentine PRAT

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

**École doctorale : Biologie Santé**

**Discipline :** Physiologie, biologie des organismes, populations, interactions

**Spécialité :** Biologie des organismes

**Unité de recherche :** l'institut du thorax, UMR INSERM 1087/CNRS 6291

**Soutenue le :** 9/02/2017

**Thèse N° :** 104039

## Identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

### JURY

<b>Président du jury</b>	<b>Olivier BOUCHOT</b> , Pr, MD, CHU de Dijon Bourgogne
<b>Rapporteurs :</b>	<b>Jean-Luc BALLIGAND</b> , Pr, Université Catholique de Louvain <b>Paul MULDER</b> , Pr, Université de Rouen
<b>Examineurs :</b>	<b>Bertrand COLLIN</b> , PharmD, PhD, Centre Georges François Leclerc
<b>Directeur de Thèse :</b>	<b>Chantal GAUTHIER</b> , Pr, Université de Nantes
<b>Co-directeur de Thèse :</b>	<b>Benjamin LAUZIER</b> , PhD, Université de Nantes



“Savoir s'étonner à propos est le premier pas fait sur la route de la découverte.”

Louis Pasteur, 1822-1895



# REMERCIEMENTS

Je remercie le Pr. Chantal Gauthier, qui a supervisé mes travaux de thèse en tant que directrice de thèse ainsi que Benjamin Lauzier, en tant que co-directeur, pour leur investissement, leurs conseils avisés et leur disponibilité.

Je remercie les Pr. Jean-Luc Balligand et Paul Mulder, pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon manuscrit de thèse, et pour le temps consacré à la lecture de mes travaux.

Je remercie le Pr. Olivier Bouchot et le Dr. Bertrand Collin pour leur intérêt pour mon travail de thèse et leur participation à ce jury.

# REMERCIEMENTS

Chaque doctorant a des mots qui lui sont propres pour décrire sa thèse. Les qualificatifs « long », « parsemé d'embuches », ou encore « aboutissement personnel » sont certainement choisis assez fréquemment. Pour ma part, je dois admettre qu'elle a représenté un sacré challenge. J'ai fait le choix de partir pour l'aventure de la recherche il y a 5 ans. J'étais étudiante vétérinaire, et, au milieu de la 4<sup>ème</sup> année, alors que le choix le plus facile était de choisir entre « canine », « bovine », et « équine », j'ai opté pour une option moins usitée : « M2 recherche ». Pari risqué s'il en est ! Alors pendant ces 5 dernières années, c'est vrai que j'ai souvent menacé mes proches collaborateurs de « partir dans la Creuse au cul des vaches » ... C'est vrai que les us et coutumes du laboratoire de recherche m'ont souvent déroutée... J'ai parfois regretté d'avoir quitté le cocon des relations confraternelles si vite après mes études. Mais dans le même temps, comme il était passionnant de se confronter à tous ces autres corps de métier !

C'est donc assez naturellement que je remercie mes encadrants de tout le temps et l'énergie dont ils ont eu besoin pour me guider, me conseiller, m'écouter, tout au long de ces 4 ans où l'on s'est côtoyés. Merci à vous Chantal, de m'avoir ouvert les portes de votre équipe, et d'avoir été présente tout en jonglant entre vos multiples responsabilités.

Merci à toi Ben, pour avoir été aussi disponible, présent, et surtout patient face à mon sale caractère qui m'amena bien des fois à râler sur les aléas des manips, du labo, des étudiants en TP... Je suis un peu émue de penser que je suis la première de la liste de tes thésards, et je ne doute pas qu'elle sera très longue. Merci aussi pour ton enthousiasme débordant (je trouve ce mot très approprié pour qualifier ton enthousiasme), et pour tous ces moments, qui ne se sont pas déroulés entre les murs de l'institut, qui m'ont menée là où je suis aujourd'hui. Après tout, l'aventure de mon actuel post-doc trouve bel et bien son origine à la fin de ma première année de thèse, autour d'une bière et d'un barbecue un samedi 7 juin, alors que tu conviais des collaborateurs venus de loin à un week-end en Vendée...

Merci à toi Bertrand, même si tu n'étais pas sur les papiers officiels se rapportant à ma thèse, tu n'en restes pas moins « mon troisième chef », et comme on dit « last but not least » ! Je garderai en mémoire toutes ces discussions passionnantes où tu me racontais ton quotidien d'anesthésiste, et moi les bizarreries de la médecine vétérinaire (je me souviendrai également de la quantité impressionnante de m&m's qui ont disparu dans ton bureau).

Je ne peux pas continuer ces remerciements sans mentionner les membres de mon équipe. Si seul mon nom apparaît sur la couverture de ce manuscrit, le travail que j'y expose n'en reste pas moins le fruit de notre travail à tous. Je suis heureuse et fière d'avoir travaillé de concert avec vous. Merci Marine, ma compagne d'infortune, pour tous les moments rigolos et moins rigolos qu'on a partagés. Entre les murs de l'institut, du Santeuil, ou devant l'imprimerie centrale en attendant l'impression du dernier poster avant de partir en congrès (moment épique s'il en est), on a quand même passé beaucoup de bons moments ensemble. Je garde un regret seulement de ces trois ans... quel dommage qu'on ne soit pas allées à l'EB en même temps ! Mais qui sait, à l'avenir, où est-ce que nos chemins respectifs nous mèneront...

Merci Virginie, avec qui je n'ai pas passé moins de temps durant mon passage à l'institut. Merci pour nos folles journées et nos folles nuits, pour les longues heures de mise au point de chirurgie comme pour les afterworks à rallonge.

Merci Angélique, toi qui resteras dans mon esprit la reine du Western, la seule à mes yeux à pouvoir dompter les anticorps, les tampons, et tout ce qui peut faire rater une manip. Mis à part ton don certains pour résoudre les problèmes techniques de toutes les manip de biochimie de l'équipe, merci pour ta bonne humeur et la patience dont tu fais preuve avec les différents étudiants qui te sont confiés pour apprendre les rudiments de la biochimie.

Merci Morteza, pour ton investissement au sein de l'équipe, tant sur un plan personnel que professionnel. Je ne manquerai pas de me souvenir de notre cohabitation dans le « labo du 1<sup>er</sup> » et de nos nombreuses collaborations, et des viennoiseries que tu ne manquais pas de nous ramener en réunion (surtout des pâtes d'ours qui étaient délicieuses).

Merci Marja, pour tes conseils avisés et l'œil neuf que tu as porté sur le projet des rats transgéniques. Merci Corinne ! Toi qui œuvres à ce que notre quotidien soit plus facile au labo,

en déplacement, à l'étranger... Cela en devient tellement facile que l'on oublie, grâce à toi, que la logistique peut être très compliquée.

Merci à vous les « anciens ». Vous avez quitté l'institut avant moi, mais qui n'en avez pas moins marqué mon passage... Merci David, toi qui as été d'une certaine manière comme un parrain de labo. Merci Amadandine, c'est toi qui m'as passé la main à l'échographie ! Merci Damien, pour toutes les discussions passionnantes que nous avons pu avoir.

Merci à vous les « nouveaux », Antoine, Justine, Mélanie, à vous maintenant de faire vivre l'équipe. Mais je n'ai pas trop de craintes de ce côté-là...

Je tiens également à remercier les personnes qui, même si elles n'apparaissent pas à mes côtés dans les écrits se rapportant à mes travaux, n'en ont pas moins joué un rôle prépondérant au sein de l'unité. Simon d'abord, sans qui je ne serais peut-être pas en train de rédiger ces lignes aujourd'hui. He oui ! Depuis 2005, je suis contente de te compter parmi mes amis, et il faut bien reconnaître que c'est ta main innocente qui a retiré mon CV du tas de la broyeuse, quand, quelques temps avant de rencontrer Chantal, j'avais voulu pousser pour la première fois les portes de l'institut (sans succès jusqu'à ton intervention !). Mais ça, ça n'est qu'un détail de l'histoire, je préfère te remercier pour tout le reste... Pour nos nuits Quimpéroises dans ton 15 m<sup>2</sup>, pour les Parnières, pour les macdal du jeudi soir parce que bon, y a partiel le vendredi, alors on n'osait pas boire des bières...

Merci Delphine, la deuxième personne qui a fortement contribué à mon arrivée dans l'équipe... C'est toi, au final, qui a orchestré notre rencontre avec Ben, et, quelque part, tout ce qui a suivi.

Merci Thibaut, avec qui je rêvais de « l'après thèse », et avec qui je dissertais des sirènes du privé, de stratégie, de carrière, de com', de marketing, de la condition des femmes dans la recherche, mais aussi de nos mésaventures et de nos déceptions respectives. Je sais que tu es dans les starting-blocks pour ta propre thèse et ton post-doc... je t'envoie toutes mes ondes positives.

Merci Sandie ! Merci à toi aussi, juste pour avoir été là, dans tous les moments, joyeux et moins joyeux (quoi que, à l'heure où j'écris ces lignes, j'ignore encore ce que vous avez ramené de Bali... ai-je raison de vous remercier... ?).

Merci à Maxime, à Karim, au trio infernal Damien, Jérôme et Fabien, à Sophie, à Martine et Marie-France, à Sabine, à Agnès... Merci à vous tous, vous qui formez une liste bien trop longue pour que je puisse être exhaustive. Merci pour les cafés, les coups de main, les sourires, les blagues, les silences, les conseils... Vous tous qui avez croisé ma route à un moment ou à un autre de ces 4 années, et qui, à votre manière, l'avez rendue plus agréable.

Je remercie ma famille, pour avoir cru en mon pari un peu fou. Je vous remercie de m'avoir laissée faire, en dépit du caractère un peu risqué de certains de mes choix. C'est vrai qu'on trouve plus facilement du travail en exerçant dans une clinique, et qu'il est certainement mieux payé et mieux valorisé. C'est vrai que dans la recherche, l'avenir n'est pas idyllique pour les jeunes doctorants. Néanmoins vous m'avez soutenue dans ce projet, et nous voilà aujourd'hui réunis pour fêter la fin de cette thèse, et le début de ma nouvelle vie à Bordeaux. Alors mille fois merci, pour toutes ces années où vous avez assuré mes arrières pour que je puisse me consacrer à mes projets d'avenir sans tracas, ce qui n'est pas rien en 2017.

Comme je ne sais pas si j'aurai à nouveau l'occasion de faire imprimer des remerciements sur du papier de bonne qualité, je ne vais pas m'arrêter là.

Merci les korrigans 2.0. Que vous soyez éparpillés à SF, au Japon, ou rentrés au bercail, vous ne vous en êtes peut être pas rendus compte, mais nos rendez-vous bisannuels ont été un grand soutiens pendant ces dernières années. Vous revoir et parler de nos bêtises de jeunes rennais, c'était bien. Vous revoir et parler de start-up, des nouveaux goûts de Loïc Raison, d'Apple et de Silicon Valley, de turbulettes, de MOOC, c'était bien. Alors ne nous arrêtons pas, et je vous dis à l'été prochain, quand nos expatriés reviendront en Bretagne. Merci Julien, Jean, Sophia, Sarah, Thibaut, Gerger, Erik, Anouk, Marlène, Maxence, Valériane, Mathieu.

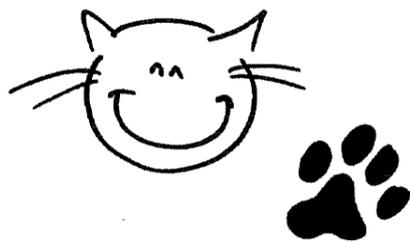
Merci Alexia ! On ne l'a pas fêté, mais te rends-tu compte que l'on a passé nos 20 ans d'amitié ? En mémoire de tous nos déjeuners à base de pâtes au camembert, de nos fringales nocturnes à base de camembert, et de nos petits déjeuners à base de camembert, merci ! Même si on est loin l'une de l'autre, même si on ne se voit pas souvent, je suis heureuse de savoir qu'on se retrouve toujours comme au premier jour. C'est peut être ça l'amitié : pouvoir reprendre là où on s'était arrêtées à chaque retrouvaille, sans que ça ne soit plus compliqué que ça.

Merci les vétos ! Après nos folles années nantaises, ça n'est pas évident de se retrouver maintenant que vous êtes chacun installés aux quatre coins de la France. Mais quel bonheur quand, lorsque l'été arrive, vient notre week-end à nous. Quel bonheur de se retrouver encore et toujours, comme si on ne s'était jamais quittés. J'ai l'impression qu'on ne se rend pas vraiment compte de l'importance de ses années d'école avant d'en être parti. On en bave pour y rentrer, on se rend compte que ça n'est pas non plus aisé d'en sortir. On y apprend un nombre incalculable de mots savants par cœur, dont on ne sait pas bien si on les prononcera souvent le reste de notre vie. On y perd pas mal d'heures de sommeil, tout ça pour se rendre compte à la sortie qu'en fait on ne sait pas grand-chose. En fait on se rend compte qu'on a surtout appris à savoir quand est-ce qu'on ne sait pas, ce qui est à la fois très rassurant et très angoissant. Mais on y gagne tellement ! A commencer par des amis épatants (poulot !). Merci Canette, Clémence, Charlène, Valentine G, Jeanph, Marianne, Sophie, Céline, Céline, Mathilde, Marie, Valérie, Alexia... Merci aussi à tous les copains qui font aussi partie de la grande famille des vétos, Lucien, Ludo, Patou, JB ! Après Azay, Gourfaleur, La Luzerne, vivement Les Hauts de Bruyère, que je vous fasse un gros bisou et qu'on rigole à nouveau de nos rires gras à des blagues non moins grasses.

Merci Simon Ritz ! Toi je t'ai connu en prépa, quand on bûchait nos concours, alors que moi je rêvais d'école vétérinaire et toi de l'ENSAR. Cela n'a duré qu'une année, mais qui fût tellement riche qu'elle représente presque 3 ans de ma vie. En mémoire des petits riens qui ont jalonné notre quotidien d'interne... Ma bouilloire qui faisait sauter les plombs du bâtiment, obligeant toute la classe à attendre dans le couloir (seule partie encore éclairée) à 22h, tes répétitions de backpipe dans les douches « parce que l'acoustique est meilleure », et tous nos petits moments extirpés de notre routine de colles, d'exercices rébarbatifs, de révisions... Merci pour tout ça ! Je suis bien contente que tu sois rentré de Chicago, et en plus pour Saint-Jean d'Angély, qui n'est qu'à une heure de Bordeaux. Longue vie à notre amitié !

Et enfin, Merci Quentin... Toi qui fut successivement mon « pote de bière », mon pote tout court, mon copain, mon ami, mon amoureux, mon amant. C'est vrai qu'on est deux diésels tous les deux, mais regarde nous maintenant, après tout ce chemin parcouru ! D'ailleurs, nous n'avons toujours pas répondu à cette question qui nous anime depuis quelques mois : maintenant qu'on est pacsé, quel mot doit-on employer ? Le mystère reste entier... Peut-être

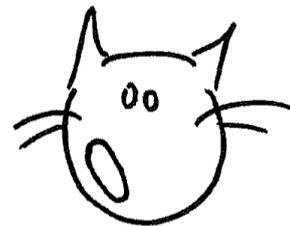
qu'un jour notre embarras sera résolu lorsqu'on passera dans la case d'après, en passant devant Monsieur le Maire. Mais chaque chose en son temps, tout vient à point à qui sait attendre. En tout cas, Merci. Tout au long de mon long et sinueux parcours, c'était bien toi qui étais en première ligne... Tu as essuyé mes tempêtes de colère, mes larmes de crocodile, mes silences renfrognés. Mon don inégalé pour semer le chaos dans l'appartement aussi (les personnes connaissant l'état de mon bureau comprendront). Tu as aussi subi la capacité incroyable de mon chat de 15 ans à avoir gros pépins de santé exactement à l'instant où c'est le moins approprié... On se rappellera le gag de l'hypokaliémie quand j'étais à Boston, celui de la ficelle avalée (et surtout ressortie) pendant la rédaction de mon manuscrit, ou encore le plus récent en date, la crise de vomissement/chat bouché mais en fait non alors que j'écris ces lignes.



(Ça c'est l'idée que je me fais du chat quand il nous fait ses plaisanteries)

(Et ça c'est quand il réalise qu'il est en route pour voir un de mes confrères)

(Les chats, c'est vraiment tous des ...)



Croise les doigts, le 9 février arrive bientôt, il devrait moins somatiser après cette date, parole de véto.

Et avec tout ça, nous voilà malgré tout embarqués ensemble dans la grande aventure de Bordeaux. Merci pour avoir été là envers et contre tout, merci d'avoir accepté toi aussi mes choix de carrière, et d'être encore là, et longue vie à nous. Promis, tu feras un très bon infirmier. Comme je le répète tous les jours à mes collègues bordelais à propos de mon projet impossible : la question n'est pas « est-ce que ... ? » mais bien « quand est-ce que... ? ».

Ai-je été exhaustive ? J'ai bien peur que non. On n'a pas assez d'une vie pour remercier les personnes qui nous sont chères. C'est, je trouve, un peu présomptueux de penser que l'on peut réussir cet exercice en seulement quelques pages. Alors, tout simplement, à vous tous qui lisez ces pages...

**Merci.**

# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS .....	i
SOMMAIRE .....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	xiii
INDEX DES FIGURES .....	xvii
INDEX DES TABLEAUX .....	xviii
INTRODUCTION.....	1
1. Rappels de physiologie cardiaque .....	1
1.1. Anatomie du cœur .....	1
1.2. Le cycle cardiaque.....	1
1.3. La contraction cardiaque .....	4
1.3.1. La fibre musculaire cardiaque .....	4
1.3.2. Le couplage excitation-contraction .....	6
2. Régulation de la fonction cardiaque .....	8
2.1. Régulation neurohormonale .....	8
2.1.1. Le système $\beta$ -adrénergique.....	10
2.1.1.1. Structure .....	10
2.1.1.2. Voies de signalisation des récepteurs $\beta_1$ et $\beta_2$ -adrénergiques .....	11
2.1.1.3. Voies de signalisations des récepteurs $\beta_3$ -adrénergiques.....	13
2.2. Régulation paracrine par les cellules endothéliales.....	15
3. L'insuffisance cardiaque .....	17
3.1. L'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée.....	18
3.1.1. Epidémiologie de l'ICFEP .....	18
3.1.2. Les comorbidités associées à l'ICFEP .....	18
3.1.3. La classification des patients atteints d'ICFEP en fonction des comorbidités...	24
3.1.4. Manifestations cliniques de l'ICFEP et de l'ICFER.....	27
3.2. Etat actuel de la connaissance de la physiopathologie .....	28
3.2.1. Anomalies cardiaques .....	28

3.2.1.1.	Anomalies macroscopiques.....	28
3.2.1.2.	Anomalies des protéines sarcomériques .....	32
3.2.1.3.	Anomalies du cycle du calcium .....	34
3.2.1.4.	Anomalies de la matrice extracellulaire.....	36
3.2.2.	La dysfonction endothéliale .....	37
3.3.	La réponse au stress dans l'ICFEP.....	38
3.3.1.	Inadaptation de la fonction systolique.....	38
3.3.2.	Inadaptation de la fonction diastolique .....	39
3.3.3.	Insuffisance chronotrope .....	39
3.3.4.	Anomalies vasculaires.....	40
3.4.	Traitements de l'ICFEP .....	40
3.4.1.	Recommandations actuelles pour la prise en charge des patients .....	40
3.4.2.	Essais cliniques existants .....	41
4.	Les modèles animaux d'ICFEP .....	44
4.1.	Modèles d'ICFEP induite par une élévation de la post-charge .....	44
4.1.1.	Constriction aortique .....	44
4.1.2.	Modèle DOCA-Salt.....	45
4.1.3.	Le rat Dahl/Salt sensitive .....	46
4.1.4.	Le rat mRen2.Lewis .....	46
4.2.	Modèles spontanés d'ICFEP .....	47
4.2.1.	Le rat SHR.....	47
4.2.2.	La souris SAM .....	47
4.3.	Modèles d'ICFEP associant des altérations métaboliques.....	47
4.3.1.	Le rat SHHF .....	48
4.3.2.	Zucker fatty rat (ZFR) .....	48
4.3.3.	Zucker diabetic fatty rat (ZDF) .....	48
4.3.4.	Rat Zucker diabétique et hypertendu (ZSF1).....	49
4.3.5.	Souris diabétique db/db .....	49
4.4.	Modèles développés chez des gros animaux .....	49
4.4.1.	Modèle canin .....	50
4.4.2.	Modèle porcin .....	50

4.5.	Cardiomyopathie félines spontanées .....	51
4.6.	Limites des modèles d'étude actuels .....	52
5.	Objectifs de l'étude.....	54
MATERIEL ET METHODES .....		55
1.	Modèle animal .....	55
2.	Génotypage .....	55
3.	Ovariectomie .....	56
4.	Echocardiographie .....	57
5.	Mesure de la pression ventriculaire gauche.....	58
6.	Cœur isolé perfusé en mode travaillant .....	59
7.	Contractilité des muscles papillaires .....	60
8.	Analyses histologiques .....	62
8.1.	Fibrose cardiaque .....	63
8.2.	Glomérulosclérose rénale .....	63
8.3.	Hypertension artérielle pulmonaire .....	65
9.	RT-PCR quantitatives.....	65
10.	Western Blot.....	66
11.	Analyse des résultats .....	67
RESULTATS .....		69
1.	Détermination du phénotype du modèle dans des conditions standards d'hébergement... 69	
1.1.	Détermination du phénotype des femelles ovariectomisées ou non jusqu'à l'âge de 30 semaines. ....	69
1.2.	Détermination du phénotype des mâles jusqu'à l'âge de 45 semaines .....	73
1.3.	Limites de l'étude des rats dans des conditions d'hébergement standard.....	75
2.	Détermination du phénotype du modèle en l'absence de phytoestrogènes .....	76
Transgenic rat model overexpressing endothelial $\beta_3$ -adrenoceptor: a new relevant model for heart failure with preserved ejection fraction.....		77
DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....		109
1.	Etude du transcriptome des rats Tg $\beta_3$ .....	109
2.	Les anomalies métaboliques .....	111
3.	L'anémie et l'état proinflammatoire.....	114
4.	Les anomalies du cycle du Ca <sup>2+</sup> des rats Tg $\beta_3$ .....	117

5. Le rôle de l'endothélium et du $\beta_3$ -AR chez les rats Tg $\beta_3$ .....	120
6. L'impact des comorbidités sur les rats Tg $\beta_3$ .....	123
CONCLUSION GENERALE .....	125
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	127
ANNEXES .....	141

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> : concentration calcique intracellulaire  
•NO : monoxyde d'azote  
AC : adénylate cyclase  
ADNc : ADN complémentaire  
ADP : adénosine diphosphate  
AK1 : adénylate kinase 1  
Akt : protéine Akt  
AMPc : 3',5'-adénosine monophosphate cyclique  
ARNm : ARN messenger  
ATP : adénosine triphosphate  
Ca<sup>2+</sup> : ion calcium  
CD : Cluster de différenciation  
CEC : couplage excitation-contraction  
CGP 20712A : antagoniste des récepteurs β<sub>1</sub>-adrénergiques  
CICR : calcium induced-calcium released  
CL 316243 : agoniste des récepteurs β<sub>3</sub>-adrénergiques  
DAG : diacylglycérol  
db/db : souris diabétique déficiente pour le gène de la leptine  
DOCA : désoxyacetate de cortisone  
E/A : ratio du remplissage passif et du remplissage dû à la contraction auriculaire  
E/E' : rapport de la vitesse de remplissage sur la vitesse de l'anneau mitral pendant la phase précoce du remplissage  
ECC : endothélium des capillaires coronaires  
EE : endothélium endocardique  
eNOS : synthase endothéliale de monoxyde d'azote  
ESC : European Society of Cardiology  
FA : fibrillation atriale  
FC : fréquence cardiaque  
FE : fraction d'éjection  
GC : guanylate cyclase  
Gi : protéine G inhibitrice  
GMPc : 3',5'-guanosine monophosphate cyclique  
Gq : protéine Gq  
GRK : kinase des récepteurs couplés aux protéines G  
Gs : protéine G stimulatrice  
HDL : high density lipoprotein  
HTA : hypertension artérielle

HTAP : hypertension artérielle pulmonaire  
IC : insuffisance cardiaque  
 $I_{Ca,L}$  : courant calcique de type L  
ICAM2 : intercellular adhesion molecule 2  
ICFER/P insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite/préservée  
ICI 118,551 : antagoniste des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques  
IL : interleukine  
IMC : indice de masse corporelle  
iNOS : synthase inductible de monoxyde d'azote  
INVS : Institut de Veille Sanitaire  
IRC : insuffisance rénale chronique  
JNK : c-Jun N-terminal kinase  
KCl : chlorure de potassium  
 $MgCl_2$  : Chlorure de magnésium  
MKK4 : Mitogen-activated protein kinase kinase 4  
MLC20 : chaîne légère de la myosine  
MLCP : phosphatase des chaînes légères de la myosine  
MMP : matrix metalloproteinase  
mRen2.Lewis : rat de souche Lewis surexprimant la rénine  
MTA3 : Metastasis Associated 1 Family Member 3  
MyBPC : myosine binding protein C  
N2A/N2B/N2BA : isoformes de la titine  
 $Na^+$  : ion sodium  
NaCl : chlorure de sodium  
 $NaH_2PO_4$  : phosphate monosodique  
 $NaHCO_3$  : carbonate de sodium  
NCX : échangeur sodium/calcium  
nNOS : synthase neuronale de monoxyde d'azote  
NOS : synthase de monoxyde d'azote  
 $O_2$  : dioxygène  
OD : oreillette droite  
OG : oreillette gauche  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
PAD : pression artérielle diastolique  
PAM : pression artérielle moyenne  
PAS : pression artérielle systolique  
PAVGd/s : épaisseur de la paroi antérieure du ventricule gauche en diastole/systole  
PCR : réaction de polymérase en chaîne  
PDE : phosphodiesterase  
PEVK : domaine de la titine  
Pi : phosphate

PI3K : phosphoinositide 3-kinase  
PKA : protéine kinase A  
PKC : protéine kinase C  
PKG : protéine kinase G  
PLB : phospholamban  
PPVGd/s : épaisseur de la paroi postérieure du ventricule gauche en diastole/systole  
PTDVG : pression intraventriculaire télédiastolique gauche  
RCPG : récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G  
RhoA : Ras homolog type A  
RS : réticulum sarcoplasmique  
RyR : récepteur à la ryanodine  
SAM : senescence accelerated mouse  
SERCA2a : sarco/endoplasmic reticulum calcium-adenosine triphosphatase  
SHHF : spontaneously hypertensive heart failure  
SHR : spontaneously hypertensive rat  
SIVd/s : épaisseur du septum interventriculaire en diastole/systole  
SS : salt-sensitive  
TAC : constriction trans-aortique  
TAK1 : Transforming growth factor beta-activated kinase 1  
TDE : temps de décélération de l'onde E  
TG : triglycéride  
TGF $\beta$  : tumor growth factor  $\beta$   
TIMP : tissue inhibitor metalloproteinase  
TnC : troponine C  
TNF $\alpha$  : tumor necrosis factor  $\alpha$   
TnI : troponine I  
TnT : troponine T  
TRIV : temps de relaxation isovolumique  
TTR : transthyréine  
VD : ventricule droit  
VG : ventricule gauche/ventriculaire gauche  
VGd/s : volume du ventricule gauche en diastole/systole  
VO<sub>2max</sub> : consommation maximale d'oxygène  
ZDF : Zucker diabetic fatty rat  
ZFR : Zucker fatty rat  
ZSF1 : croisement entre une femelle ZDF et un rat mâle SHHF  
 $\beta$ -AR : récepteurs  $\beta$ -adrénergique



# INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Anatomie du cœur.....	1
Figure 2. Le cycle cardiaque du ventricule gauche. ....	3
Figure 3. Structure et composition des fibres musculaires cardiaques .....	4
Figure 4. La contraction musculaire cardiaque à l'échelle protéique .....	7
Figure 5. Couplage excitation-contraction. ....	8
Figure 6. Effet de l'abrasion de l'endothélium par du Triton X100 sur la contraction de muscles papillaires cardiaques. ....	16
Figure 7. Comorbidités associées à l'ICFEP et à l'ICFER en fonction du sexe. ....	23
Figure 8. Sous-groupes de patients atteints d'ICFEP. ....	25
Figure 9. Remodelage cardiaque des patients atteints d'ICFEP .....	29
Figure 10. Anomalies fonctionnelles cardiaques dans l'ICFEP.....	31
Figure 11. Proportions des patients exprimant des anomalies fonctionnelles échographiques ou hémodynamiques.....	32
Figure 12 : Effet de la phosphorylation sur les isoformes N2B et N2BA de la titine.....	33
Figure 13 : La surcharge calcique dans l'insuffisance cardiaque. ....	35
Figure 14. Représentation schématique de la cuve expérimentale.....	61
Figure 15. Paramètres échographiques diastoliques des femelles WT et Tg $\beta_3$ , ovariectomisées ou non, nourries avec de l'aliment standard, à 15 et 30 semaines. ....	72
Figure 16. Paramètres échographiques diastoliques des mâles WT et Tg $\beta_3$ nourris avec de l'aliment standard, à 15, 30 et 45 semaines. ....	74
Figure 17 : Expression des gènes au niveau cardiaque des rats Tg $\beta_3$ mâles et femelles à l'âge de 45 semaines. ....	110
Figure 18. Paramètres métaboliques des rats Tg $\beta_3$ à 45 semaines. ....	112
Figure 19 : Expression des protéines du calcium dans le myocarde de rats WT et Tg $\beta_3$ à l'âge de 45 semaines. ....	119
Figure 20. Mesure de la contractilité des muscles papillaires en présence et en absence d'endothélium suite à l'administration de doses croissantes d'isoprotérénol, chez les rats sauvages et transgéniques âgés de 45 semaines. ....	120
Figure 21. Mesure de la contractilité des muscles papillaires en présence et en absence d'endothélium suite à l'administration de doses croissantes de CL 316243, chez les rats sauvages et transgéniques âgés de 45 semaines. ....	121

# INDEX DES TABLEAUX

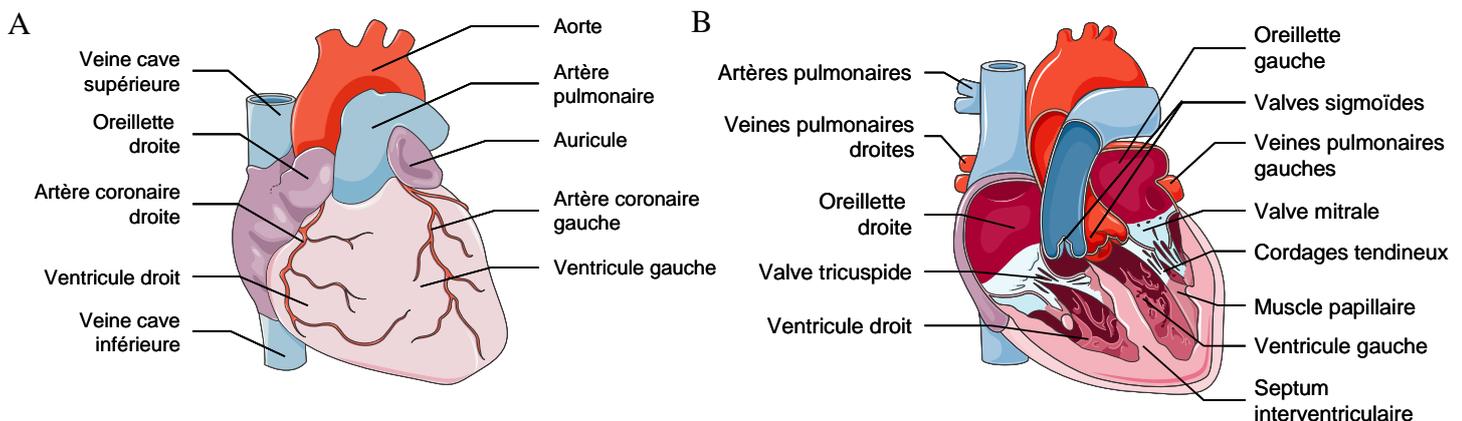
Tableau 1 : Régulation de l'activité cardiaque par les systèmes parasympathique via et les récepteurs M2 et sympathique via les $\beta_1$ -AR et $\beta_2$ -AR.....	10
Tableau 2 : Voies de signalisations impliquées dans la vasorelaxation médiée par le $\beta_3$ -AR..	14
Tableau 3 : Différences entre endothélium endocardique et endothélium des capillaires coronaires .....	16
Tableau 4. Prévalence des symptômes et des signes cliniques ou radiologiques au cours d'ICFEP ou ICFER .....	27
Tableau 5. Essais cliniques menés sur des cohortes de patients atteints d'ICFEP. ....	43
Tableau 6. Comparaison des différents modèles d'ICFEP .....	53
Tableau 7. Paramètres échographiques du VG mesurés dans l'étude.....	58
Tableau 8. Paramètres évalués par cathétérisme .....	59
Tableau 9. Substances pharmacologiques employées dans les protocoles de contraction des muscles papillaires. ....	62
Tableau 10. Protocole d'inclusion en paraffine des reins et des poumons de rat.....	64
Tableau 11 : Conditions de réalisation des western blot.....	67
Tableau 12. Paramètres échographiques morphologiques et fonction systolique des femelles WT et Tg $\beta_3$ , ovariectomisées ou non, nourries avec de l'aliment standard, à 15 et 30 semaines. ....	71
Tableau 13. Paramètres échographiques des mâles WT et Tg $\beta_3$ nourris avec de l'aliment standard à 15, 30 et 45 semaines. ....	73
Tableau 14. Paramètres hématologiques des rats WT et Tg $\beta_3$ à l'âge de 45 semaines.....	115
Tableau 15. Sous-populations des monocytes et leurs fonctions. ....	116
Tableau 16. Similitudes et différences entre les patients en ICFEP et les rats Tg $\beta_3$ .....	126

# INTRODUCTION

## 1. Rappels de physiologie cardiaque

### 1.1. Anatomie du cœur

Le cœur assure dans l'organisme un rôle de pompe, permettant la distribution *via* les vaisseaux sanguins de dioxygène et des métabolites à l'ensemble des organes périphériques. Cet organe est un muscle strié constitué de deux parties anatomiquement distinctes et séparées par une cloison, le septum interventriculaire : le cœur gauche et le cœur droit. Le cœur gauche qui assure la circulation systémique est constitué de l'oreillette (OG) et du ventricule (VG) gauche alors que le cœur droit qui assure la circulation pulmonaire est constitué de l'oreillette (OD) et du ventricule (VD) droit. Il existe entre les oreillettes et les ventricules ainsi qu'entre les ventricules et la circulation, un système de valves qui empêche le sang de refluer en amont (Figure 1) [1].



**Figure 1 : Anatomie du cœur.** A : Face antérieure du cœur. B : Coupe frontale montrant les cavités et les valves cardiaque.

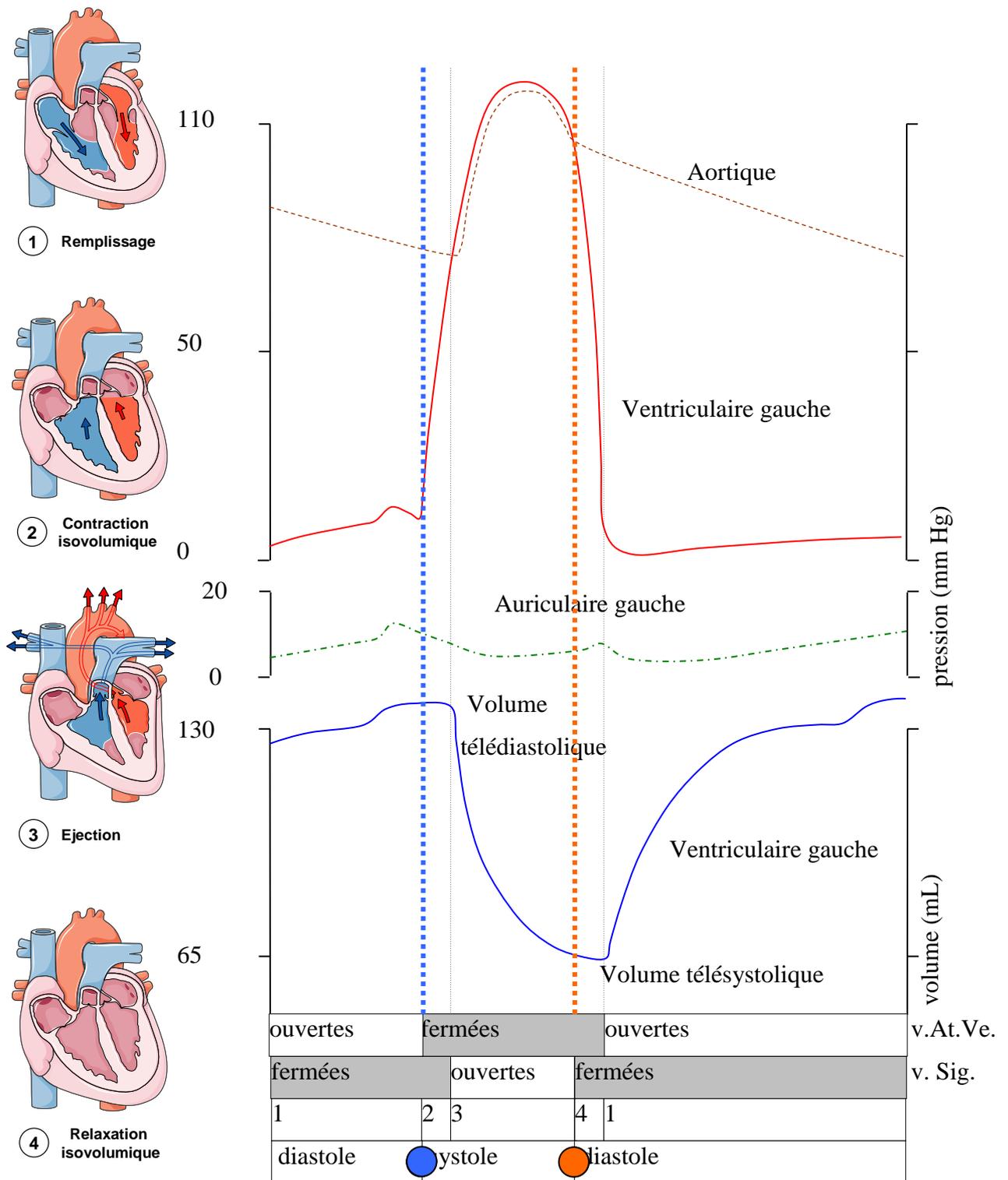
### 1.2. Le cycle cardiaque

Au cours du cycle cardiaque, le cœur alterne des phases de systole (phase de contraction/éjection) et des phases de diastole (phase de relaxation/remplissage). Pendant la phase de remplissage (Figure 2), les valves atrioventriculaires sont ouvertes, et le sang remplit

les ventricules. La phase de remplissage se divise elle-même en deux phases successives : un remplissage passif (le sang est acheminé dans le ventricule de manière passive par gradient de pression), et un remplissage actif (par contraction de l'oreillette, qui chasse le sang vers le ventricule).

Après la contraction auriculaire, le ventricule initie alors la phase de contraction isovolumique. Le muscle cardiaque se contracte, et l'élévation de la pression intraventriculaire entraîne la fermeture des valves atrioventriculaires. La pression à l'intérieur du ventricule va continuer à augmenter sous l'action de la contraction du myocarde, jusqu'à devenir supérieure à la pression artérielle en aval des valves sigmoïdes, et provoquer leur ouverture. Le sang est alors éjecté soit dans l'artère aorte (VG) et soit dans l'artère pulmonaire (VD).

Le cœur initie alors sa relaxation. Suite à la phase d'éjection, le volume de sang dans le ventricule diminue, permettant à la pression intraventriculaire d'être inférieure à la pression artérielle, et les valves sigmoïdes se referment. Le cœur entame alors la phase de relaxation isovolumique : le myocarde se relâche, les valves sigmoïdes et atrioventriculaires sont toujours fermées, et la pression intraventriculaire diminue, jusqu'à devenir inférieure à la pression exercée par le sang veineux, et provoquer l'ouverture des valves atrioventriculaires. Le cœur entame alors un nouveau cycle cardiaque [1].



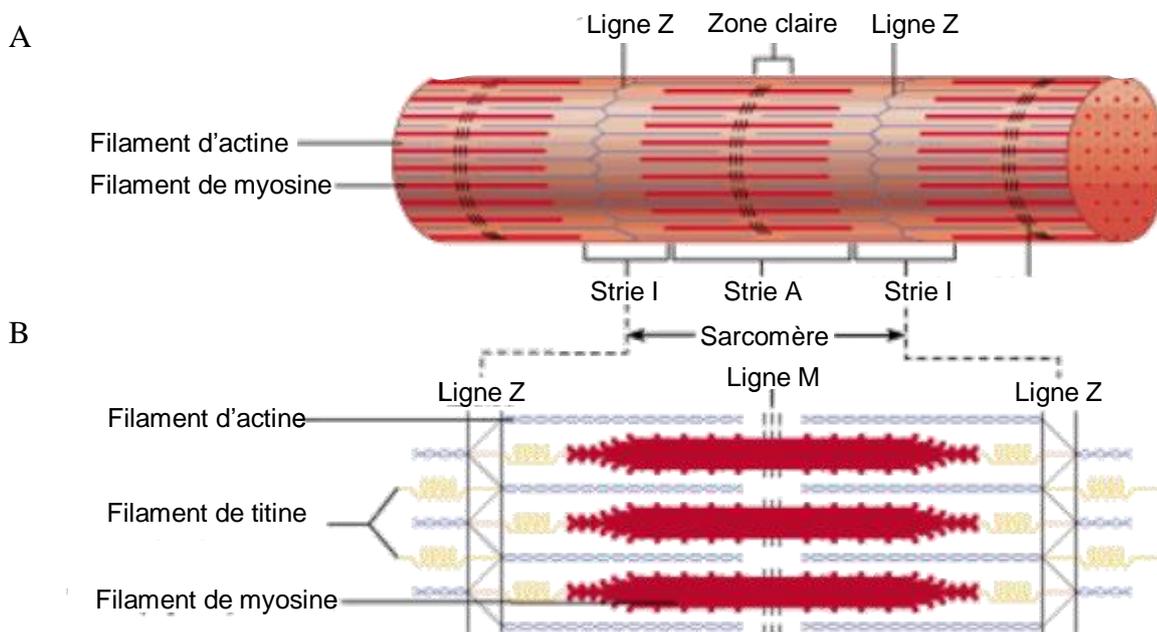
**Figure 2. Le cycle cardiaque du ventricule gauche.**

● Fin de la systole. ● Fin de la diastole. V. At. Ve : valve auriculoventriculaire. V. Sig : valves sigmoïdes.

## 1.3. La contraction cardiaque

### 1.3.1. La fibre musculaire cardiaque

Le myocarde est, entre autre, constitué de fibres musculaires, elles-mêmes constituées de myofibrilles (Figure 3A). Chaque myofibrille s'étend sur toute la longueur de la cellule musculaire, et est contractile. Les myofibrilles sont composées de filaments épais et de filaments fins. Les filaments épais sont constitués essentiellement de myosine. La myosine a la particularité d'être à la fois une protéine structurale et fonctionnelle : chaque protéine est constituée d'une queue formée par deux chaînes polypeptidiques, et d'une tête bilobée, correspondant au site catalytique de la myosine. La tête d'une protéine de myosine comporte un site de liaison à l'actine (responsable de la formation des ponts d'union nécessaires à la contraction musculaire), un site de liaison à l'ATP ainsi qu'une ATPase. Chaque filament épais comprend environ 200 protéines de myosine qui sont assemblées ensemble de manière à ce que les tiges soient rassemblées au milieu du filament épais, et à ce que les têtes soient réparties à ses extrémités (Figure 3B).



**Figure 3. Structure et composition des fibres musculaires cardiaques**

**A.** Structure d'une myofibrille. **B.** Structure d'un sarcomère.

D'après E. Marieb, « Anatomie et physiologie humaines » ed. 2013.

Les filaments fins sont quant à eux constitués essentiellement d'actine, une protéine globulaire, associée en protéine fibreuse : l'actine F. Les têtes de myosines sont capables de se lier à l'actine durant la contraction musculaire.

Les filaments fins sont également constitués de protéines régulatrices de la contraction : la troponine et la tropomyosine. La tropomyosine est une molécule fibreuse qui a pour but de masquer les sites d'interaction des têtes de myosines avec l'actine. La troponine, quant à elle, est un complexe protéique constitué de trois sous-unités :

- La troponine I (TnI) se liant à l'actine
- La troponine T (TnT) se liant à la tropomyosine et l'aligne avec l'actine
- La troponine C (TnC) se liant aux ions calcium

Le complexe troponine-tropomyosine permet de camoufler les sites d'interactions entre l'actine et la myosine lorsque la fibre musculaire est au repos. Lorsque la concentration intracellulaire en calcium augmente, le complexe subit un changement de conformation spatiale, rendant accessibles les sites d'interaction. L'interaction entre les têtes de myosine et les filaments d'actine est responsable du raccourcissement des sarcomères, et donc de la contraction musculaire.

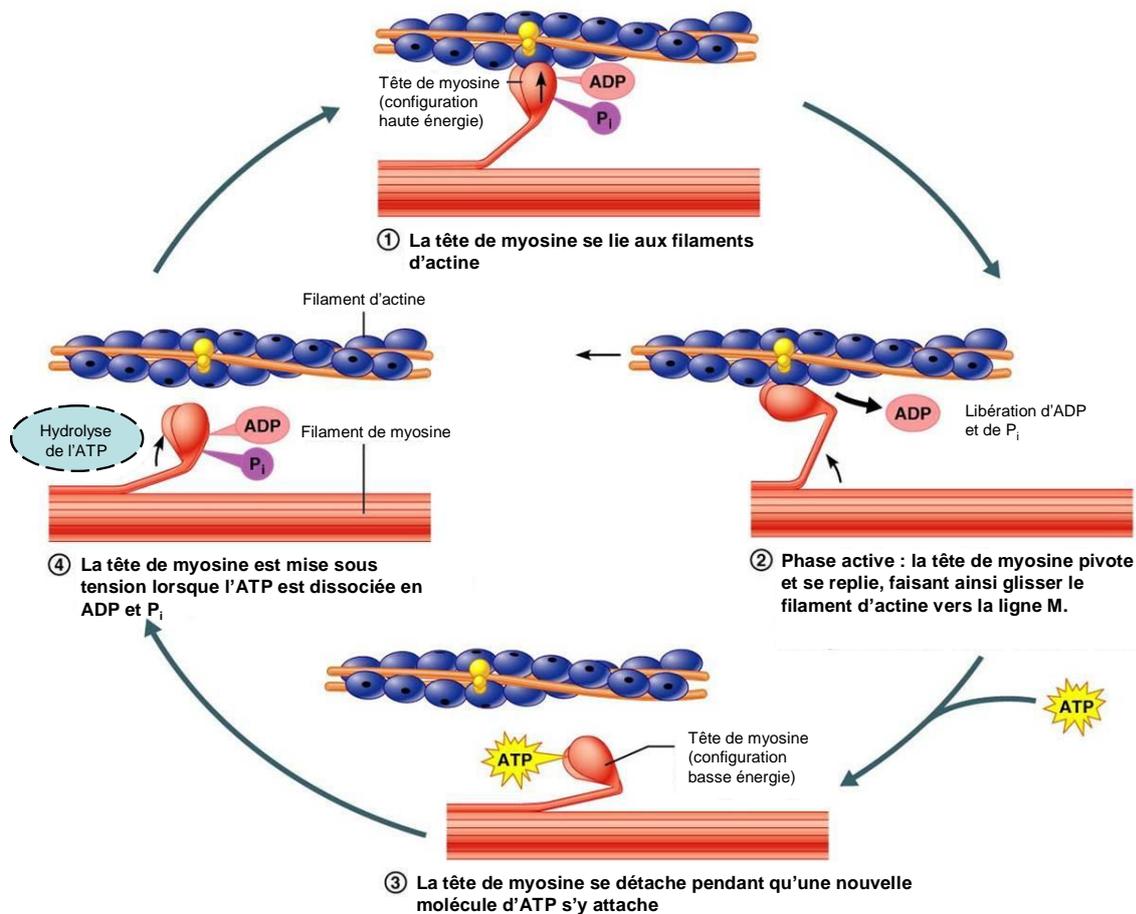
La titine est une protéine extensible reliant les filaments épais à la strie Z. Outre son rôle de maintien des filaments épais dans la fibre musculaire, ses propriétés élastiques permettent au muscle de retrouver sa forme initiale lorsqu'il est étiré. La titine peut être exprimée dans les cardiomyocytes sous deux isoformes : l'isoforme N2A, plus compliant, et l'isoforme N2B, plus rigide. De plus, elle peut être phosphorylée sur deux de ses domaines : les domaines N2B/N2BA (spécifiques de chaque isoforme) et PEVK par la PKA et la PKG, modulant alors ses capacités de compliance.

### 1.3.2. Le couplage excitation-contraction

Au niveau des cardiomyocytes, la dépolarisation entraîne l'activation des canaux calciques de type L ( $\text{Ca}^{2+}$ , L) localisés au niveau des tubules transverses (Figure 5). Ces canaux activés s'ouvrent alors, et laissent pénétrer dans la cellule un flux d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . La concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire augmente et entraîne l'activation de récepteurs-canaux à la ryanodine (RyR2).

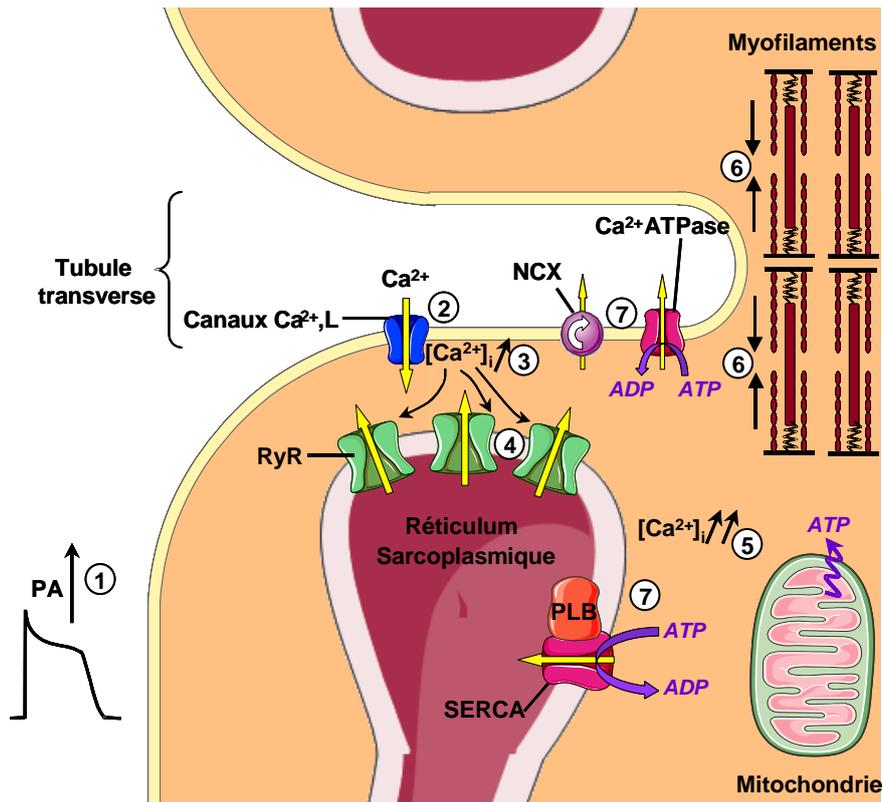
RyR2 est une protéine tétramérique de 550 kDa, localisée au niveau de la membrane du réticulum sarcoplasmique (RS). RyR2 interagit avec de nombreuses protéines régulatrices et possède deux sites de fixation au  $\text{Ca}^{2+}$  : l'un à haute affinité induit l'ouverture du canal et l'autre, à basse affinité induit la fermeture du canal. La fixation de  $\text{Ca}^{2+}$  sur le site à haute affinité de RyR2 lors du couplage excitation-contraction (CEC) permet l'ouverture du canal et la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  stocké dans le RS grâce à un mécanisme appelé calcium induced-calcium release (CICR). La  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  augmente alors à 200-400  $\mu\text{M}$  et les ions  $\text{Ca}^{2+}$  vont alors diffuser vers les myofilaments et se fixer à la TnC, exposant ainsi les sites d'interaction de l'actine et de la myosine.

Dans ces conditions, les têtes de myosine et les filaments d'actine se lient entre elles, et forment ainsi des ponts d'union, première étape nécessaire à la contraction de la fibre musculaire. La tête de myosine pivote alors sur elle-même et libère un ADP et un  $\text{P}_i$ , entraînant un mouvement de glissement entre les filaments fins et épais. Par la suite, la fixation d'une nouvelle molécule d'ATP sur son site de fixation au niveau des têtes de myosine entraîne le détachement de la myosine et de l'actine. L'hydrolyse de l'ATP en un ADP et un  $\text{P}_i$  rétablit alors la conformation initiale de la tête de la myosine, permettant à celle-ci de se lier à nouveau au filament d'actine, et ainsi de permettre un nouveau mouvement de glissement (Figure 4).



**Figure 4. La contraction musculaire cardiaque à l'échelle protéique.**  
D'après E. Marieb, « Anatomie et physiologie humaines » ed. 2013.

Lors de la repolarisation, le calcium est ensuite recapté majoritairement par le RS (80%) grâce à l'activation des pompes  $Ca^{2+}$ -ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA2a) et expulsé au niveau de la membrane plasmique par l'échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX, environ 20%). La pompe calcique membranaire intervient très peu dans le retour à la  $[Ca^{2+}]_i$  de repos. Le phospholamban (PLB) est une protéine régulatrice de l'activité de SERCA2a. Lorsqu'il est phosphorylé, le PLB se détache de SERCA2a, levant l'inhibition qu'il exerce sur la pompe, ce qui provoque une augmentation de la recapture des ions  $Ca^{2+}$  par le RS (Figure 5).



**Figure 5. Couplage excitation-contraction.**

1. Arrivée du potentiel d'action. 2. Activation et ouvertures des canaux calciques de type L (Ca<sup>2+</sup>, L). 3. Augmentation locale de la concentration en calcium intracellulaire ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>). 4. Activation des récepteurs à la Ryanodine (RyR2). 5. Augmentation de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> libre. 6. Diffusion du Ca<sup>2+</sup> libre vers les myofilaments et contraction. 7. Recapture du Ca<sup>2+</sup> au niveau du réticulum sarcoplasmique (RS) par les pompes Ca<sup>2+</sup>-ATPase du RS (SERCA2a) et au niveau de la membrane plasmique par l'échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX). ADP : adénosine diphosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; PLB : phospholamban.

## 2. Régulation de la fonction cardiaque

### 2.1. Régulation neurohormonale

L'activité du cœur est régulée en partie par le système nerveux autonome : le système parasympathique et sympathique.

- **Système parasympathique**

Les fibres nerveuses parasympathiques, d'origine bulbaire, innervent essentiellement le nœud sinusal, le nœud auriculoventriculaire, et les myocytes auriculaires. Leur stimulation entraîne la libération d'acétylcholine, qui active les récepteurs muscariniques M2. Leur stimulation au niveau du nœud sinusal et des ventricules entraîne l'activation de la protéine  $G_i$  à laquelle ils sont couplés, provoquant une diminution des taux d'AMPc. La stimulation de ces récepteurs est responsable des effets cardiomodérateurs du système parasympathique (Tableau 1).

- **Système sympathique**

Les fibres nerveuses sympathiques, d'origine médullaire, innervent quant à elles le tissu nodal et l'ensemble du myocarde, tant au niveau des oreillettes qu'au niveau des ventricules. La stimulation de ces neurones entraîne la libération de noradrénaline. Le système sympathique innerve également la glande médullosurrénale, capable de libérer dans la circulation générale majoritairement de l'adrénaline ainsi que de la noradrénaline, participant à la régulation humorale de la fonction cardiaque. Les catécholamines ainsi libérées sont capables d'activer les récepteurs adrénergiques. Au niveau du VG, les récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques ( $\beta_1$ -AR) représentent la plus grande partie des récepteurs (80%), avec les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques ( $\beta_2$ -AR) (20%) [2]. La stimulation de ces récepteurs est responsable des effets cardio-accélerateurs du système sympathique (Tableau 1). Les récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques ( $\beta_3$ -AR) sont également exprimés au niveau cardiaque.

**Tableau 1 : Régulation de l'activité cardiaque par les systèmes parasympathique via et les récepteurs M2 et sympathique via les  $\beta_1$ -AR et  $\beta_2$ -AR.**

Tropisme	Paramètre modifié	Effets du système parasympathique	Effets du système sympathique
Chronotropisme	Fréquence cardiaque	↘	↗
Inotropisme	Contractilité (Volume d'éjection systolique)	↘	↗
Tonotropisme	Tonus myocardique au repos	↘	↗
Lusitropisme	Vitesse de relaxation	↘	↗

Afin de clarifier le message, et compte-tenu de la spécificité du modèle animal présenté dans ces travaux, qui présente une élévation de l'expression des récepteurs  $\beta_3$ -AR, seul le système  $\beta$ -adrénergique sera détaillé par la suite.

## 2.1.1. Le système $\beta$ -adrénergique

### 2.1.1.1. Structure

Les  $\beta$ -AR font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Ils sont constitués de sept domaines transmembranaires hydrophobes, reliés entre eux par des boucles extra et intracellulaires. Les  $\beta_1$ -AR et  $\beta_2$ -AR possèdent au niveau de leur extrémité carboxy-terminale intracellulaire des sites phosphorylables par les kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRK). La phosphorylation de ces sites entraîne un découplage du récepteur de sa protéine G, conduisant à l'inactivation du récepteur [3]. Ce phénomène de désensibilisation homologue intervient lors d'une stimulation chronique des récepteurs par le système  $\beta$ -adrénergique, notamment durant l'insuffisance cardiaque. En plus de ce phénomène de désensibilisation rapide, la réponse  $\beta_1$ -adrénergique est également affectée par l'expression des récepteurs, qui est diminuée en cas de stimulation chronique [3]. A l'inverse, les  $\beta_3$ -AR sont dépourvus de site de phosphorylation. Leur désensibilisation est ainsi beaucoup plus limitée. Plusieurs études ont montré une incapacité des  $\beta_3$ -AR à être désensibilisés, notamment dans des systèmes d'expressions hétérologues dans des cellules [4-6], ou dans des cellules de

neuroblastome exprimant le  $\beta_3$ -AR de manière endogène [7]. Toutefois, ces données sont à pondérer vis-à-vis d'autres études qui ont montré une désensibilisation possible du  $\beta_3$ -AR dans un modèle de cellules HEK transfectées [8], et l'iléon de souris [9].

### **2.1.1.2. Voies de signalisation des récepteurs $\beta_1$ et $\beta_2$ -adrénergiques**

Les  $\beta$ -AR sont activés par la fixation de catécholamines. La fixation d'un agoniste entraîne un changement de conformation de la protéine, et l'activation de la protéine G associée au récepteur.

Les  $\beta_1$ -AR sont localisés sur l'ensemble de la surface des cardiomyocytes et sont associés à des protéines Gs. Toutefois, ces récepteurs peuvent aussi être exprimés au niveau de la membrane nucléaire, et leur activation a un effet sur la régulation de la transcription des gènes [10]. Pour la suite de ce manuscrit, seul l'effet des récepteurs membranaires sera détaillé. Leur stimulation entraîne l'activation de l'adénylate cyclase (AC), qui catalyse la formation d'AMPc à partir d'ATP. Si l'AC5 et l'AC6 sont les isoformes majoritaires d'AC dans le myocarde [11, 12], une étude récente a mis en évidence le fait que les  $\beta_1$ -AR sont couplés à l'AC5, tandis que les  $\beta_2$ -AR sont couplés préférentiellement à l'AC6 [13]. L'AMPc produite par cette voie diffuse largement dans le cytosol des cardiomyocytes, et active la protéine kinase A [14], capable de phosphoryler à distance des  $\beta_1$ -AR différentes cibles moléculaires [15, 16] :

- les canaux calciques de types L : leur phosphorylation entraîne l'augmentation de leur probabilité d'ouverture [17], et donc une augmentation du courant  $I_{Ca,L}$  et de  $[Ca^{2+}]_i$ .
- RyR2 : augmentant alors leur sensibilité à l'élévation de  $[Ca^{2+}]_i$  et leur activité [18].
- TnI : induisant alors un changement conformationnel, qui a pour effet d'accélérer la cinétique de la formation des ponts actine-myosine [19].
- PLB : la phosphorylation du PLB lève l'inhibition sur la pompe SERCA2a, et améliore ainsi la recapture du  $Ca^{2+}$  par le SR [20].

- la titine : sa phosphorylation sur le domaine N2B a pour effet d'améliorer ses propriétés élastiques, pour *in fine* augmenter la compliance du myocarde et le remplissage ventriculaire [21, 22].

Par ailleurs, la PKA phosphoryle plusieurs phosphodiésterases (PDE4B, PDE4D, PDE3) produisant ainsi un rétrocontrôle négatif sur la voie AC/AMPC/PKA et ce qui évite l'apparition d'effets délétères pour la fonction cardiaque [23-25].

Les  $\beta_2$ -AR, quant à eux, sont localisés au niveau des cavéoles en condition physiologique [26], et peuvent être couplés à une protéine Gs ou Gi. Lorsqu'ils sont associés à une protéine Gs, leur stimulation entraîne une élévation localisée de [AMPC] via l'activation de l'AC6 [13]. De ce fait, la stimulation de la voie AC/AMPC/PKA par le récepteur  $\beta_2$ -AR est de plus faible efficacité [27]. Lors d'une stimulation prolongée, la phosphorylation des  $\beta_2$ -AR par la PKA augmente leur affinité pour les protéines Gi, et permet ainsi l'activation d'autres voies de signalisation [28]. Tout d'abord, le couplage à une protéine Gi aura pour effet d'inhiber l'activité de la voie AC/AMPC/PKA, contrebalançant les effets d'une stimulation des  $\beta_1$ -AR. De plus, les  $\beta_2$ -AR couplés à une protéine Gi activent la voie PI3K/Akt, impliqués dans des mécanismes anti-apoptotiques [29], et apparaissent ainsi comme un mécanisme protecteur en réponse à une stimulation catécholaminergique excessive.

Les  $\beta_1$ -AR et  $\beta_2$ -AR sont également présents au niveau des vaisseaux, aussi bien au niveau endothélial qu'au niveau des cellules musculaires lisses, et induisent l'activation de la voie Gs/AMPC/PKA. Dans les cellules endothéliales, la PKA active à son tour la NO synthase endothéliale (eNOS), et le •NO produit diffuse alors dans les cellules musculaires lisses, où il active la voie du GMPC/PKG et induit une vasorelaxation [30]. Dans les cellules musculaires lisses, l'activation de la voie Gs/AMPC/PKA est à l'origine d'une vasorelaxation. En effet, la PKA et/ou la PKG vont phosphoryler de nombreuses protéines aboutissant à une relaxation par (i) une désensibilisation de leur appareil contractile et par (ii) un retour de la  $[Ca^{2+}]_i$  à son niveau de repos.

La désensibilisation de l'appareil contractile des cellules musculaires lisses implique la phosphorylation de la Myosin Light Chain Kinase (MLCK) par la PKA, ce qui diminue son activité [31]. A l'inverse, la PKA et la PKG par inhibition de la voie RhoA/RhoKinase permettent la phosphorylation de la Myosin Light Chain Phosphatase (MLCP), augmentant alors son activité et favorisant la déphosphorylation de la MLC20 [32-34].

Le retour de la  $[Ca^{2+}]_i$  à son niveau de repos est opéré par une inactivation des canaux  $Ca^{2+}$  de type L. Cette inactivation est induite par une repolarisation voir une hyperpolarisation membranaire qui dépend de la phosphorylation et de l'activation par la PKA et/ou la PKG de nombreux canaux ioniques de la membrane plasmique, dont des canaux potassiques [35-38], et la  $Ca^{2+}$ -ATPase de la membrane plasmique. De plus, la PKG phosphoryle l'IP3R et l'inactive empêchant ainsi l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  par libération de  $Ca^{2+}$  des stocks du RS [39]. Enfin, la phosphorylation par la PKA et la PKG du PLB provoque son détachement de SERCA2a et le recaptage du  $Ca^{2+}$  par le RS [40].

### **2.1.1.3. Voies de signalisations des récepteurs $\beta_3$ -adrénergiques**

Au niveau du ventricule gauche, les récepteurs  $\beta_3$ -AR sont couplés à une protéine Gi, et entraînent l'activation de la voie du NO. Initialement, sa production a été attribué à la NOS endothéliale (eNOS) [41], mais plus récemment, d'autres études ont montré l'implication de l'isoforme neuronale (nNOS) dans la voie [42-44]. Birenbaum et al. (2008) ont également mis en évidence l'implication de iNOS dans la diminution de la réponse contractile induite par une stimulation à l'isoprénaline avec le vieillissement, suggérant son implication potentielle dans un contexte pathologique [43].

Le •NO produit est capable d'agir sur le couplage excitation-contraction, soit par phosphorylation des canaux calciques de type L par une voie PKG/GMPc dépendante, soit par S-nitrosylation des canaux, indépendamment du GMPc [45]. Physiologiquement, la stimulation des  $\beta_3$ -AR a sur les ventricules un effet inotrope négatif [46, 47] et lusitrope positif [48].

Au niveau de l'oreille gauche, Skeberdis et al. (2008) ont rapporté que la stimulation du  $\beta_3$ -AR entraînait à l'inverse l'activation de la production d'AMPc, entraînant l'augmentation du courant  $I_{Ca,L}$ , et une augmentation de la contractilité atriale [49].

Récemment, des travaux ont montré l'implication des  $\beta_3$ -AR dans des mécanismes cardioprotecteurs dans des pathologies aiguës, comme l'infarctus du myocarde [42, 50, 51], ainsi que dans des mécanismes anti-hypertrophiques [44]. Toutefois, à terme, la stimulation excessive des  $\beta_3$ -AR est soupçonnée de dégrader la fonction cardiaque, comme c'est le cas dans l'insuffisance cardiaque terminale [52].

Dans les vaisseaux, les récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques sont localisés au niveau des cellules endothéliales. Leur stimulation entraîne une vasodilatation. Toutefois, la voie de signalisation associée à la vasorelaxation varie en fonction de l'espèce étudiée et du territoire vasculaire, comme résumé dans le Tableau 2 [53-56].

**Tableau 2 : Voies de signalisations impliquées dans la vasorelaxation médiée par le  $\beta_3$ -AR**

Localisation	Artères pulmonaires	Aorte		Microartères coronaires
Espèce	Canine	Bovin	Rat	Humain
Tissu/Type cellulaire	Anneaux vasculaires <sup>1</sup>	Cellules endothéliales <sup>2</sup>	Anneaux aortiques <sup>3</sup>	Cellules endothéliales <sup>4</sup>
Voie identifiée	AMPc	GMPC eNOS	GMPC NO	NO
Effet biologique	Vasorelaxation	Vasorelaxation	Vasorelaxation	Vasorelaxation

<sup>1</sup> Tagaya et al. 1999 ; <sup>2</sup> Kou et al. 2007 ; <sup>3</sup> Trochu et al. 1999 ; <sup>4</sup> Dessy et al. 2004.

## 2.2. Régulation paracrine par les cellules endothéliales

Bien que les cardiomyocytes représentent environ 75% du poids du cœur, les cellules endothéliales sont trois fois plus nombreuses dans le cœur [57]. Les cellules endothéliales, initialement décrites comme un déterminant majeur de la régulation de l'hémostase et de la fluidité du sang [58], ont également un rôle essentiel dans la régulation de l'activité cardiaque via une action paracrine sur les cardiomyocytes [59]. Ce phénomène est possible grâce à la localisation des cellules endothéliales, qui sont au contact du myocarde. Un cardiomyocyte ne se trouve ainsi jamais à plus de 50  $\mu\text{m}$  d'une cellule endothéliale chez l'homme [59].

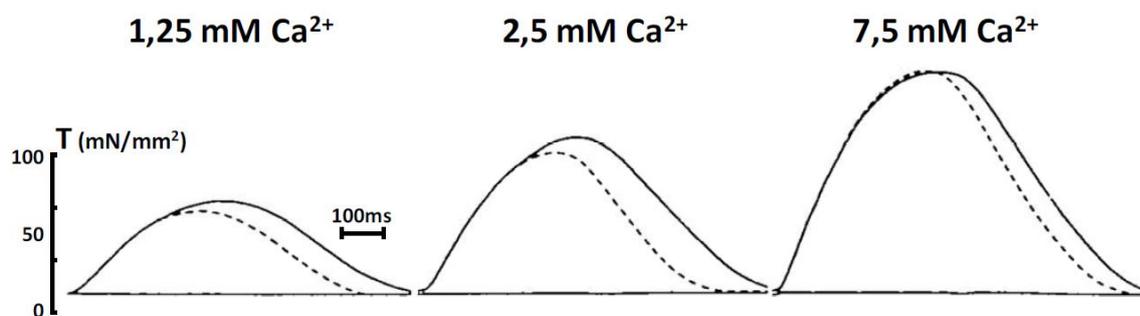
Au niveau cardiaque 2 types d'endothéliums sont décrits : l'endothélium endocardique (EE) qui tapisse les parois des cavités ventriculaires et l'endothélium des capillaires coronaires (ECC) qui tapisse l'ensemble du réseau vasculaire perfusant le cœur. Ces 2 types d'endothélium, bien que présentant des similitudes au niveau structurel et fonctionnel, présentent également de nombreuses différences (Tableau 3) [60, 61].

Brutsaert et al. (1988) ont montré que l'endothélium endocardique est capable de réguler la contractilité cardiaque. Après avoir immergé des muscles papillaires de chat dans du Triton X-100 à 1% durant 1s, ils ont réalisé des expériences de contraction à diverses concentrations extracellulaires en  $\text{Ca}^{2+}$ . Ils ont mis en évidence sur des muscles papillaires désendothélialisés l'apparition rapide d'une relaxation conduisant à une diminution de la durée et de l'amplitude de contraction, au moins pour les deux premières concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$  (Figure 6) [62]. Ces modifications de la contractilité des muscles papillaires mettent ainsi en évidence la régulation de l'activité contractile cardiaque par l'endothélium endocardique. Ces résultats ont depuis été confirmés [63, 64] et transposés à l'endothélium des capillaires coronaires [65, 66].

**Tableau 3 : Différences entre endothélium endocardique et endothélium des capillaires coronaires**

		Endothélium endocardique	Endothélium des capillaires coronaires
Localisation		Cavités cardiaques	Capillaires coronaires
Origine embryonnaire		Plaque cardiogénique	Cellules mésothéliales de l'épicaarde
Organisation du cytosquelette	Microvillosités	Présentes	Absentes
	Filaments de vimentine et microtubules	Réseau filamenteux	Compactes et alignées dans l'axe cellulaire
Organelles	Golgi	>	>
	Activité métabolique	>	>
	Vésicules	<	<
Jonctions cellulaires	Espaces intercellulaires	Profonds	Peu profonds
	Jonctions GAP	>	>
	Jonctions serrées	>	>
Activité paracrine	eNOS	Expression élevée dans l'appareil de Golgi	Expression plus faible diffuse dans le cytosol
	Facteur de Von Willebrand	>	>

Adapté de Kuruvilla & Kartha, 2003 et Aird 2007.



**Figure 6. Effet de l'abrasion de l'endothélium par du Triton X100 sur la contraction de muscles papillaires cardiaques.**

D'après Brutsaert et al. (1988). – endothélium intègre, --- endothélium abrasé. T : tension exprimée en mN/mm<sup>2</sup>.

La régulation paracrine de l'endothélium sur la contractilité cardiaque s'effectue par la sécrétion de différentes substances, comme par exemple le monoxyde d'azote ( $\bullet$ NO). Le  $\bullet$ NO est synthétisé à partir de la L-Arginine par trois types de NOS : la nNOS ou NOS1, la eNOS ou

NOS3 et la iNOS ou NOS2 [67]. Au niveau des cellules endothéliales, le •NO est produit par la eNOS. Il active la voie GC/GMPc/PKG mais a également des effets indépendants de cette voie qui ne seront pas détaillés dans ce manuscrit [68, 69]. L'activation de la voie GC/GMPc/PKG a des effets dépendants de la concentration en •NO [70]. Ainsi à de faibles concentrations (au repos), le •NO a un effet inotrope positif sur la contraction cardiaque alors qu'à de fortes concentrations (à l'effort, en condition pathologique), le •NO a un effet inotrope négatif [30, 71]. En effet, à de faibles concentrations le GMPc produit inhibe la PDE3 induisant une augmentation des concentrations en AMPc alors qu'à des concentrations plus importantes, le GMPc active la PKG [72] qui phosphoryle et inactive les canaux  $Ca^{2+}$  de type L [73] et phosphoryle la TnI [74]. Le GMPc active également la PDE2 qui catalyse l'AMPc et diminue l'action de la voie AC/AMPc/PKA [75]. Enfin, un effet inotrope négatif direct du •NO est également possible par S-nitrosylation des canaux  $Ca^{2+}$  de type L [76].

### 3. L'insuffisance cardiaque

Les maladies cardiovasculaires touchent plus d'un adulte sur trois et sont la première cause de décès dans les pays développés. L'insuffisance cardiaque (IC) est aujourd'hui un problème de santé publique majeur qui touche 2 à 3% des adultes et dont la prévalence augmente avec l'âge [77]. L'IC est un syndrome clinique, traduisant l'incapacité du cœur à maintenir un débit nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme. D'après la définition de l'European Society of Cardiology, l'insuffisance cardiaque associe :

- des **symptômes** (dyspnée, fatigue) et des **signes caractéristiques** de l'IC (tachycardie, polypnée, râles crépitants pulmonaires, épanchement pleural, turgescence jugulaire, œdèmes périphériques, hépatomégalie) ;
- une **preuve objective** d'une **anomalie structurelle** ou **fonctionnelle** du cœur au repos (cardiomégalie, 3<sup>ème</sup> bruit cardiaque, souffle cardiaque, anomalie de l'échocardiogramme, élévation du dosage des peptides natriurétiques).

Il existe deux types d'IC : l'IC à fraction d'éjection réduite (ICFER), caractérisée par une altération de la contraction cardiaque et une fraction d'éjection inférieure à 50%, et l'IC à fraction d'éjection préservée (ICFEP), caractérisée par une altération de la relaxation et du remplissage myocardique, associée à une fraction d'éjection supérieure ou égale à 50%.

### **3.1. L'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée**

#### **3.1.1. Epidémiologie de l'ICFEP**

Au cours des deux dernières décennies, la prévalence de l'ICFEP n'a cessé de croître jusqu'à atteindre plus de la moitié des cas d'IC en 2006. La proportion d'ICFEP augmente chaque année de 1% parallèlement au vieillissement de la population, engendrant une augmentation de la mortalité, des hospitalisations et des frais de prise en charge [78]. A l'heure actuelle, 4-6% des adultes sont touchés par cette maladie, et cette proportion atteint 10% des patients de plus de 75 ans [79]. L'ICFEP, comparativement à l'ICFER, atteint une population de patients plus âgés. Selon les études, les femmes représentent une part plus ou moins importante des patients (entre 45 et 70%) [80], laissant supposer que la perte d'hormones sexuelles liée à la ménopause joue un rôle important dans le développement de la maladie [81].

#### **3.1.2. Les comorbidités associées à l'ICFEP**

Dans la littérature, les patients atteints d'ICFEP présentent classiquement également un grand nombre de comorbidités. On retrouve parmi elles l'hypertension artérielle modérée, les troubles métaboliques, le diabète, l'obésité, l'insuffisance rénale. Il est intéressant de noter que, si ces comorbidités sont classiquement associées à un risque accru de toutes les maladies cardiovasculaires confondues, les patients atteints d'ICFEP présentent fréquemment plusieurs de ces comorbidités en même temps (en moyenne 4-5). La prévalence particulièrement élevée des comorbidités dans l'ICFEP suggère qu'elles jouent un rôle particulièrement important dans le développement de la maladie [82] (Figure 7).

- **L'hypertension artérielle**

L'hypertension artérielle (HTA) est caractérisée par une élévation anormale de la pression artérielle systémique. En pratique, un patient souffre d'HTA lorsque sa pression artérielle systolique excède 140 mmHg et sa pression artérielle diastolique 90 mmHg. Cette pathologie est un fléau majeur : en effet, d'après un rapport de 2011 de l'Institut National de Veille Sanitaire (INVS), l'HTA touche aujourd'hui 30% des adultes de 18 à 74 ans. Sa prévalence augmente avec l'âge, et 67% des adultes de 64 à 74 ans sont hypertendus [83]. De nombreux travaux antérieurs ont déjà établi que l'HTA était un facteur de risque majeur pour l'apparition d'évènements cardiovasculaires, et augmentait le risque de formation de plaques d'athérome [84], d'accident vasculaires cérébraux [85], de cardiopathie ischémique, et d'insuffisance rénale chronique [86]. Chez les patients atteints d'ICFEP, l'HTA est une comorbidité majeure retrouvée chez 60 à 80% des patients selon les études [87], et a clairement été établie comme le premier facteur de risque d'apparition d'ICFEP [79].

Il a déjà été démontré que l'élévation de la postcharge due à l'HTA était capable de favoriser l'apparition d'un remodelage hypertrophique du myocarde et de fibrose [88], qui sont deux facteurs intimement liés à l'apparition de dysfonction diastolique. Il est également déjà connu que les patients atteints d'HTA, avant de déclarer une ICFEP, présentent déjà des altérations des fonctions diastolique et systolique décelables à l'échographie [89, 90]. En outre, l'HTA est également associée à la dysfonction endothéliale et à l'augmentation de la rigidité artérielle, deux facteurs liés à la physiopathologie de l'ICFEP, qui seront détaillés dans ce manuscrit.

- **La fibrillation atriale**

La fibrillation atriale (FA) est l'arythmie la plus fréquemment diagnostiquée, et est caractérisée par l'activation incontrôlée de l'oreillette, entraînant la détérioration de la fonction atriale. La FA est une affection dont la prévalence est fortement liée à l'âge. En effet, sa prévalence est de 0,89% de la population générale, mais atteint 5,9% des personnes de plus de 65 ans [91]. La FA est une comorbidité fréquemment associée à l'ICFEP, en effet, dans la

plupart des études, entre 20 et 40% des patients sont concernés [87]. L'augmentation des pressions de remplissage du VG est susceptible d'entraîner une élévation de la pression dans l'oreillette gauche, et donc d'entraîner son remodelage et à terme une perte de fonction. Il est intéressant de noter que la FA est considérée comme un facteur de mauvais pronostic pour l'ICFEP, du fait de la perte de fonction auriculaire lors du remplissage, et que la dysfonction diastolique est un facteur aggravant de la FA, du fait de l'élévation de la pression atriale.

- **Hypertension artérielle pulmonaire**

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est définie par une pression artérielle pulmonaire moyenne supérieure à 25 mmHg au repos ou supérieure à 30 mmHg à l'effort. On distingue classiquement deux grands types d'HTAP : l'HTAP précapillaire et postcapillaire. L'HTAP précapillaire est le plus souvent consécutives à une pathologie d'origine pulmonaire, tandis que l'HTAP postcapillaire est plus fréquemment une complication d'une pathologie du cœur gauche.

Dans le cas de l'ICFEP, consécutivement à l'augmentation des pressions dans le VG, l'augmentation de la pression dans l'oreillette gauche puis dans le système vasculaire pulmonaire favorise l'apparition d'une HTAP postcapillaire : selon les études, la proportion de patients en ICFEP atteints d'HTAP est estimée entre 53 et 83 % [92, 93], et est associée à une forte mortalité [94]. L'augmentation aiguë de la pression dans la circulation pulmonaire entraîne une altération de la fonction et de la perméabilité endothéliale. Ainsi, le risque majeur d'une élévation aiguë de la pression artérielle pulmonaire est la survenue d'un œdème pulmonaire [95].

L'HTAP chronique, entraîne également un remodelage de la paroi vasculaire des vaisseaux pulmonaires, caractérisé par un dépôt anormal de collagène IV et une dysfonction endothéliale chronique, entraînant une forte altération des capacités de relaxation des fibres musculaires lisses vasculaires [96]. A terme, l'HTAP va imposer au ventricule droit (VD) une postcharge anormalement accrue. Dans un premier temps, une hypertrophie compensatrice du

VD se met en place, mais à terme, le remodelage peut évoluer en dilatation, insuffisance de la valve tricuspide, et enfin vers une perte de la contractilité du VD, entraînant une IC droite [95].

- **Le diabète**

Le diabète se définit par une hyperglycémie chronique supérieure à 1,26 mg/L ou 7 mmol/L. La prévalence du diabète en France est estimée à 4,4% de la population générale, et atteint 14,2% des personnes âgées de 65 à 74 ans [97]. Le diabète est un facteur de risque connu d'apparition de maladies cardiovasculaires, notamment pour l'athérosclérose, les accidents vasculaires, l'insuffisance rénale. En cas de cardiopathie ischémique, les patients diabétiques ont également un pronostic plus engagé, et évoluent plus rapidement vers une insuffisance cardiaque congestive [98]. Il est intéressant de noter que la prévalence du diabète est particulièrement élevée chez les patients atteints d'ICFEP. Selon les études, on estime qu'environ 30 à 40% des patients souffrant d'ICFEP sont diabétiques [87].

- **L'obésité**

L'obésité, définie par l'augmentation de l'indice de masse corporelle (IMC) au-delà de 30 kg/m<sup>2</sup>. D'après le rapport Obepi 2012, l'obésité est en constante augmentation en France. On estime que 15% des adultes sont obèses et que 32,3% sont en surpoids. Si l'on s'intéresse à la prévalence des personnes âgées, la population la plus à risque d'ICFEP, 17,6% des personnes de plus de 65 ans sont atteintes d'obésité, et 41,2% sont considérées en surpoids. L'obésité est un facteur de risque bien connu des maladies cardiovasculaires, notamment pour la survenue d'IC, d'HTA, de dyslipidémie, et de diabète [99]. Dans le cadre de l'ICFEP en particulier, l'obésité est une comorbidité très présente parmi les patients, et concerne 27 à 46% des patients selon les cohortes [87].

- **L'insuffisance rénale chronique**

L'insuffisance rénale chronique (IRC), est définie par une diminution du débit de filtration glomérulaire au-dessous de 60 mL/min, associé ou non à des marqueurs d'atteinte

rénale, et ce depuis plus de trois mois. L'IRC est une comorbidité fréquemment associée aux pathologies cardiaques, et l'étroite association de la physiopathologie de ces deux organes a donné lieu au concept de « syndrome cardiorénal », défini par Claudio Ronco comme « une entité physiopathologique complexe touchant le cœur et les reins dans laquelle la dysfonction aiguë ou chronique d'un des organes peut induire une dysfonction aiguë ou chronique de l'autre organe » [100]. On estime ainsi que 30 à 40% des patients insuffisants cardiaques présentent une atteinte de la fonction rénale [101].

D'un point de vue physiopathologique, il est difficile de déterminer si l'atteinte rénale est une cause ou une conséquence de la pathologie cardiaque. La dysfonction cardiaque est susceptible d'entraîner une hypoperfusion rénale chronique, et l'activation du système rénine-angiotensine aldostérone. A terme, cela favorise le développement de fibrose rénale, et la détérioration progressive de capacités de filtration du rein. A l'inverse, une détérioration de la fonction rénale va provoquer une surcharge hydrosodée chronique, et donc d'une élévation de la postcharge et de la précharge, favorisant alors le remodelage du cœur et le développement d'une dysfonction cardiaque [100].

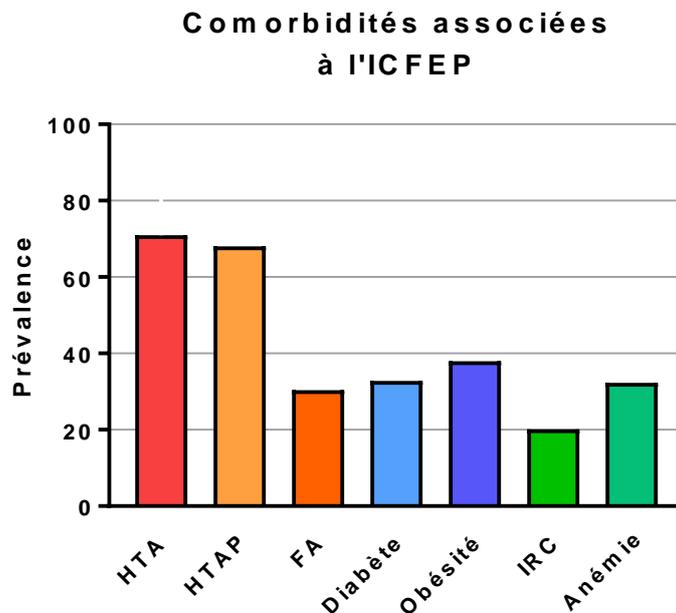
Dans le cas de l'ICFEP, les études menées rapportent une prévalence de l'IRC de 30% chez les patients [101, 102] dont la sévérité est corrélée à celle de l'atteinte cardiaque [103]. L'IRC est un facteur de mauvais pronostic pour les patients, et il apparaît que les patients présentant une ICFEP associée à de l'IRC présentent une fonction diastolique plus altérée que ceux possédant une fonction rénale préservée [104].

- **L'anémie**

L'anémie, selon la définition de l'OMS, est caractérisée par un taux d'hémoglobine inférieur à 12 g/dL pour les femmes et à 13 g/dL pour les hommes. L'anémie peut trouver son origine dans de multiples causes, liées à la formation, à la durée de vie, ou à la dégradation des hématies ou de l'hémoglobine. Dans le cadre des affections cardiovasculaires, l'anémie est fréquemment associée à l'insuffisance cardiaque. On estime que 10 à 49% des patients insuffisants cardiaques en sont atteints [105]. Il apparaît que la prévalence de l'anémie est assez

similaire entre l'ICFEP et l'ICFER, et, dans les deux cas, représente un facteur de mauvais pronostic pour les patients [106, 107].

La prévalence élevée chez les patients insuffisants cardiaques est le plus souvent la conséquence des altérations hémodynamiques. La baisse de perfusion rénale chez les patients est responsable d'une diminution de la sécrétion d'érythropoïétine par le rein, et donc d'une diminution de la production des hématies par la moelle épinière. A ce mécanisme s'ajoute le fait que l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone favorise la réabsorption de l'eau et l'apparition d'une hémodilution [105]. Plus qu'une cause de l'ICFEP, l'anémie apparaît comme une complication fréquente, péjorant fortement le pronostic des patients.



**Figure 7. Comorbidités associées à l'ICFEP et à l'ICFER en fonction du sexe.**

Adapté de Dhingra et al. 2014 et Hussain et al. 2016 ; HTA : hypertension artérielle ; HTAP : hypertension artérielle pulmonaire ; FA : fibrillation atriale ; IRC : insuffisance rénale chronique.

### 3.1.3. La classification des patients atteints d'ICFEP en fonction des comorbidités

Initialement, les comorbidités associées à l'ICFEP ne faisaient pas l'objet d'une discrimination particulière dans la prise en charge des patients et les essais cliniques menés. Ce n'est que plus récemment que les auteurs ont utilisé les comorbidités pour identifier des groupes phénotypiques de patients. Dès 2012, Mohammed et al. suggéraient que les hommes et les femmes atteints d'ICFEP ne présentaient pas le même profil de comorbidités [108]. Leur étude suggérait que les femmes étaient plus fréquemment d'un âge très avancé et hypertendues, tandis que les hommes étaient plus susceptibles d'être moins âgés, et atteints de troubles métaboliques (diabète, dyslipidémie...).

Plus récemment, d'autres études ont permis de montrer la grande hétérogénéité des patients. Une première vague d'études a concerné l'analyse *a posteriori* de cohortes de patients, dans lesquels les essais cliniques menés ont montré des résultats peu encourageants. Dans un éditorial publié en 2014, Lindman et al. soulignaient l'importance du diabète chez les patients atteints d'ICFEP dans la cohorte RELAX [109]. En effet, dans cette cohorte, les patients diabétiques présentaient un profil particulier : ces patients étaient plus fréquemment des hommes, plus jeunes que la moyenne d'âge des autres patients, obèses, et avec un plus grand nombre de comorbidités associées (hypertension et insuffisance rénale). En outre, ces patients présentaient également un pronostic plus réservé, avec un taux d'hospitalisation plus élevé et une intolérance à l'effort accrue [109, 110].

En 2015, cette fois-ci sur les cohortes I-PRESERVE et CHARM-PRESERVE, Kao et al. ont réussi à identifier 6 sous-groupes de patients sur des bases phénotypiques, sur les 4113 patients enrôlés dans l'étude [111]. Les caractéristiques de chaque groupe sont détaillées dans la Figure 8. Dans cette étude, les auteurs ont clairement identifié deux groupes plus sévèrement atteints que les autres. D'une part, le groupe C, caractérisé par une petite majorité de femmes (59%) présentant un nombre élevé de comorbidités coexistant ensemble (obésité, troubles métaboliques, maladie coronaire, dysfonction rénale, anémie). D'autre part, le groupe F, composé d'une large majorité de femmes (77,5%), présentant un indice de masse corporelle

plus faible, de la fibrillation atriale, de l'anémie et des dysfonctions rénales. Pour ces deux groupes, les auteurs ont clairement montré que les patients présentaient un pronostic plus engagé.

Sous-groupe	A	B	C	D	E	F
Âge moyen	65 ans	65 ans	70 ans	73 ans	75 ans	82 ans
Sexe	100 % ♂	96 % ♀	59% ♀/41%♂	100 % ♀	100 % ♂	77,5% ♀
Fibrillation atriale	+	+			++	+++
Maladies valvulaires	+	+				
Faible IMC					++	+++
Obésité			+++	++		
Dyslipidémie				++		
Diabète			+++	++		
Maladie coronaire			+++		++	
Anémie			+++			+++
Dysfonction rénale			+++	++		+++

**Figure 8. Sous-groupes de patients atteints d'ICFEP, d'après l'étude de Kao et al. 2015.**  
 + : fréquence d'observation faible; ++ : fréquence d'observation moyenne; +++ : fréquence d'observation élevée.

Dans une autre étude menée par [112], dans une étude prospective portant sur 397 patients, les auteurs ont tenté une classification des patients en utilisant plusieurs algorithmes d'apprentissage statistique. Par cette méthode, 3 sous-groupes de patients ont été identifiés par les auteurs. Le groupe 1, d'un âge moins avancé (60,7 ans), avec un taux plus faible de BNP que les autres groupes. Le groupe 2, d'âge moyen 65,7 ans, présente les taux d'obésité, de diabète, de dyslipidémie, d'hypertension et d'apnée du sommeil les plus importants. Et enfin le groupe 3, d'âge moyen 67,3 ans, est à la fois le plus vieux et le plus atteint de dysfonctions rénales. Dans cette étude, les proportions de femmes sont équivalentes entre les groupes (55-68%). De manière intéressante, cette étude est la première à corréliser la nature des comorbidités des patients et la sévérité de la dysfonction diastolique. Il s'avère que les patients du groupe 1

sont ceux dont la fonction diastolique et la morphologie cardiaque sont les moins altérés. Les patients du groupe 2 présentent la relaxation la plus altérée, et ses pressions des vaisseaux capillaires pulmonaires la plus élevée. Les patients du groupe 3 présentaient plus d'anomalies de l'ECG, un remodelage ventriculaire plus marqué et des valeurs de pression télédiastolique les plus élevées. Dans cette étude, il apparaît que les groupes 2 et 3 comportent également les patients au pronostic le plus réservé.

Parallèlement à ces constatations, d'autres études se sont également intéressées aux phénotypes des patients en fonction de leur région d'origine. En effet, l'analyse *a posteriori* de la cohorte TOPCAT a montré des différences très significatives en fonction du lieu de recrutement des patients. Initialement, cette étude menée par Pitt et al. (2014) a recruté des patients à la fois aux Etats-Unis et en Europe de l'Est (Russie et Géorgie) [113]. Si les conclusions finales sur l'efficacité du traitement n'ont pas été à la hauteur des attentes des auteurs, elle a permis en revanche de mettre en évidence deux phénotypes différents entre ces deux régions du monde, et deux réponses distinctes à un même traitement. En effet, les patients d'Europe de l'Est présentaient une fonction rénale moins détériorée que les patients américains, et présentaient donc une moins bonne réponse au traitement à base de spironolactone [114].

Ferreira et al. (2015) ont également étudié les caractéristiques basales des patients enrôlés dans les essais cliniques CHARM-PRESERVE, I-PRESERVE et TOPCAT, et ont tenté d'identifier des profils types selon les pays d'Europe de l'Est, et les pays dit "de l'Ouest", regroupant l'Europe de l'Ouest, l'Amérique du Nord et l'Amérique du sud [115]. Selon cette étude, les patients provenant des pays de l'Ouest étaient généralement plus âgés, avec un plus fort taux de comorbidités (dysfonction rénale, fibrillation atriale, diabète) et présentaient un pronostic plus sombre. A l'inverse, les patients originaires d'Europe de l'Est étaient moins âgés, plus souvent hypertendus, et avec une moins forte prévalence des comorbidités citées précédemment. Ces résultats ont également été confirmés par Kristensen et al. (2015) [116]. A l'heure actuelle, aucun élément ne permet d'identifier les causes de telles différences géographiques (génétiques, environnementales, sociétales...), mais soulèvent de sérieuses questions quant à la prise en charge des patients et aux recommandations à tenir pour le traitement de l'ICFEP. Par ailleurs, même si la plupart des études portant sur l'ICFEP se sont

concentrées en Europe et aux Etats-Unis, quelques études rapportent également que cette maladie n'est pas uniquement circonscrite aux régions favorisées. Ainsi, même si les études sont peu nombreuses, les populations des continents africains et asiatiques sont également concernées par la progression de l'ICFEP, soulignant le fait que cette maladie n'est pas uniquement l'apanage des régions les plus riches [117-119].

### 3.1.4. Manifestations cliniques de l'ICFEP et de l'ICFER

Lors d'une décompensation, l'ICFEP et l'ICFER partagent un même tableau clinique, comme l'illustre une étude de McMurray et al. (2003) (Tableau 4) [120], à savoir les symptômes et les signes cliniques d'une insuffisance cardiaque.

**Tableau 4. Prévalence des symptômes et des signes cliniques ou radiologiques au cours d'ICFEP ou ICFER**

D'après McMurray et al. 2003

		ICFER (%)	ICFEP (%)
Symptômes	Orthopnée	73	60
	Dyspnée d'effort	96	85
	Dyspnée paroxystique nocturne	50	55
Signes cliniques	Turgescence jugulaire	46	35
	Œdème	40	30
	Hépatomégalie	16	15
	Râles crépitant	60	72
Signes radiologiques	Hypertension veineuse pulmonaire	80	75
	Cardiomégalie	96	90

Le diagnostic différentiel entre l'ICFEP et l'ICFER repose sur des techniques d'imagerie, et notamment l'échocardiographie, afin de mettre en évidence un trouble fonctionnel de la diastole associée à une fraction d'éjection supérieure à 40 ou 50% selon les

études. Toutefois, il est important de noter que les patients présentent généralement des profils très variés, associant diverses altérations de la relaxation et/ou du remplissage cardiaque.

## **3.2. Etat actuel de la connaissance de la physiopathologie**

### **3.2.1. Anomalies cardiaques**

Au niveau du cœur, la dysfonction diastolique est un point clé de la pathologie. Elle implique des mécanismes complexes et encore partiellement connus, que cela soit à l'échelle macro ou microscopique, ou à l'échelle structurale ou fonctionnelle.

#### **3.2.1.1. Anomalies macroscopiques**

- **Anomalies structurales**

Dans la littérature, les patients atteints d'ICFEP sont fréquemment atteints d'hypertrophie cardiaque de type concentrique, en réponse à l'élévation de la pression artérielle systémique et des autres comorbidités [121-124]. L'hypertrophie concentrique est caractérisée par une augmentation de l'épaisseur des parois et une réduction des volumes ventriculaire, et est directement associée à des anomalies de la relaxation et du remplissage. L'hypertrophie cardiaque est également susceptible d'obstruer la chambre de chasse du ventricule gauche, et de diminuer l'efficacité de l'éjection du sang.

Toutefois, la littérature plus récente nuance ces données, et il apparaît que les patients souffrant d'ICFEP présentent des profils de remodelage très variés. En effet, l'épaississement de la paroi observé dans un remodelage de type concentrique ou à plus long terme une hypertrophie concentrique ne concerne que 53% des patients. On observe également chez les patients une morphologie cardiaque normale (31% des patients), ou encore une hypertrophie excentrique (16%) (Figure 9) [125].

Type de remodelage	Normal	Remodelage concentrique	Hypertrophie concentrique	Hypertrophie excentrique
Épaisseur relative des parois	0,45	↑	↑↑	↓
Masse cardiaque	Homme : < 134 g/m <sup>2</sup> Femme <110 g/m <sup>2</sup>	=	↑	↓
Volume télédiastolique	50-90 mL/m <sup>2</sup>	=	↓	↑
Proportion de patients atteints	31%	27%	26%	16%

**Figure 9. Remodelage cardiaque des patients atteints d'ICFEP**

Adapté de Shah AM & Pfeffer. 2012

- **Anomalies fonctionnelles**

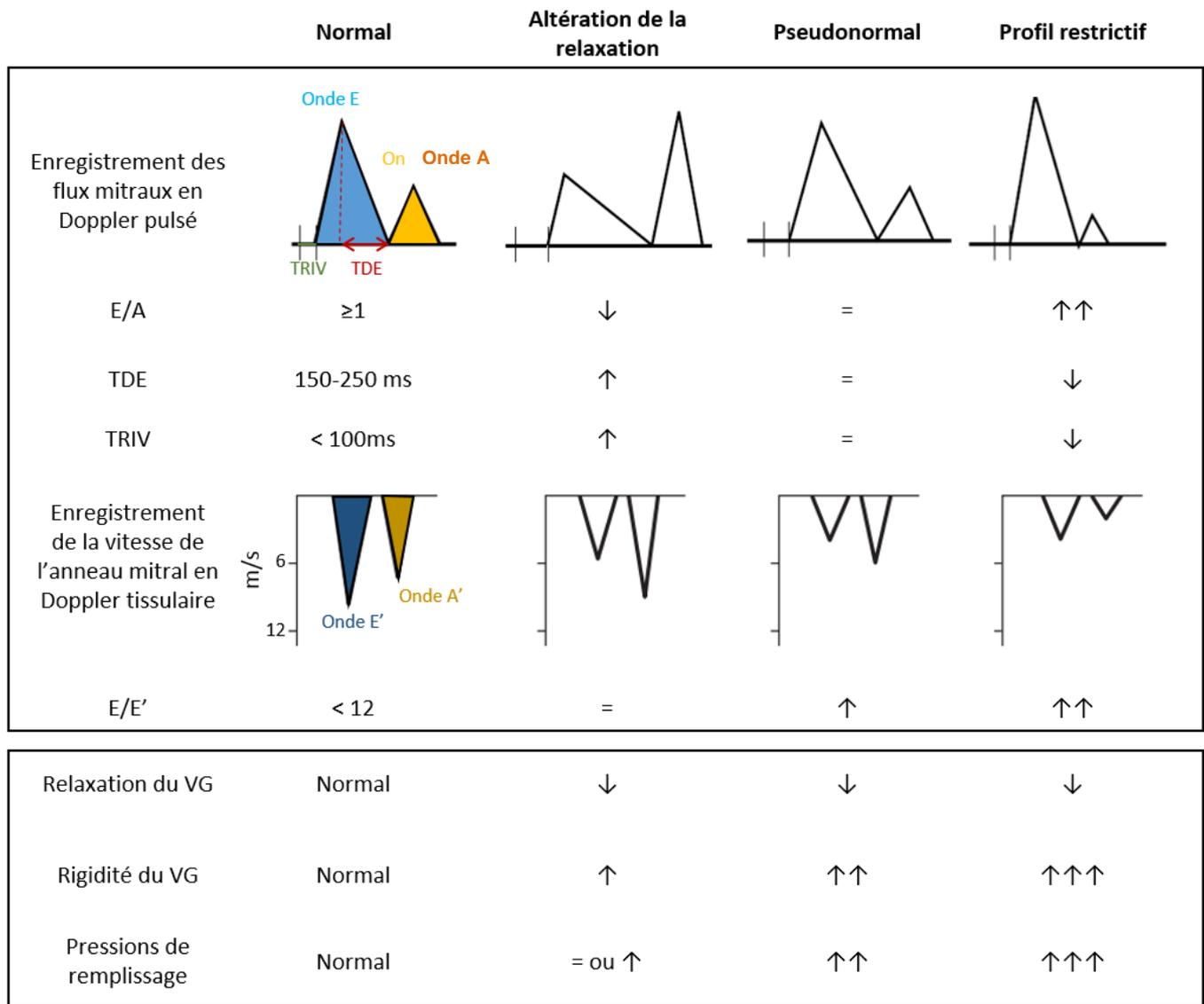
Si la dysfonction diastolique est l'élément majeur de la physiopathologie, les patients présentent néanmoins des manifestations très variées de cette dernière. L'utilisation de critères échographiques en mode Doppler pulsé et tissulaire permet de décrire trois profils distincts : l'altération de la relaxation, le profil de remplissage pseudo-normal, et le profil restrictif. Ces trois profils sont souvent décrits comme étant trois stades successifs, caractérisant l'évolution et la gravité de la dysfonction diastolique (Figure 10).

Au stade d'altération de la relaxation, le cœur atteint présente une altération de la dynamique de remplissage, avec une augmentation du temps de relaxation isovolumique (TRIV, reflétant le temps consacré la relaxation active), et une augmentation du temps de décélération de l'onde E (TDE, reflétant le temps consacré au remplissage passif du VG). A ce stade, la relaxation altérée du VG est encore compensée par la contraction auriculaire pour

maintenir un remplissage cardiaque correct. C'est ce qu'illustre la diminution du rapport E/A (ratio du remplissage passif et du remplissage dû à la contraction auriculaire) : la part du remplissage assurée par l'oreillette devient alors prépondérante par rapport au remplissage passif du VG. Dès ce stade, les pressions de remplissage du VG commencent à être augmentées, comme l'illustre l'élévation du ratio E/E' (rapport de la vitesse de remplissage sur la vitesse de l'anneau mitral pendant la phase précoce du remplissage). En effet, E/E' est un paramètre échographique proportionnel à la pression télédiastolique dans le VG (PTDVG, Figure 10).

Lorsque la dysfonction diastolique s'aggrave, on assiste alors à une aggravation de l'élévation des pressions de remplissage du VG et de l'oreille gauche. Ce phénomène adaptatif entraîne une augmentation des gradients de pression entre le VG et l'oreille gauche, tendant à normaliser la dynamique de remplissage mesurée en échographie en mode Doppler : c'est le profil pseudo-normal. Il est important de retenir qu'en dépit d'un ratio E/A, d'un TRIV et d'un TDE dans les valeurs usuelles, ces patients présentent une élévation pathologique des pressions de remplissages, et donc une altération majeure de la diastole (Figure 10).

Lorsque la dysfonction diastolique s'aggrave encore apparaît alors le stade de profil restrictif. A ce stade, le cœur pathologique présente une élévation extrêmement sévère des pressions de remplissages. Le TRIV et le TDE sont très abaissés, traduisant un défaut de compliance majeure. Le VG devenant très peu extensible en fin de diastole, la contraction auriculaire est peu efficace, et le ratio E/A est alors augmenté. Ces altérations sont le reflet d'une altération majeure de la compliance cardiaque (Figure 10).



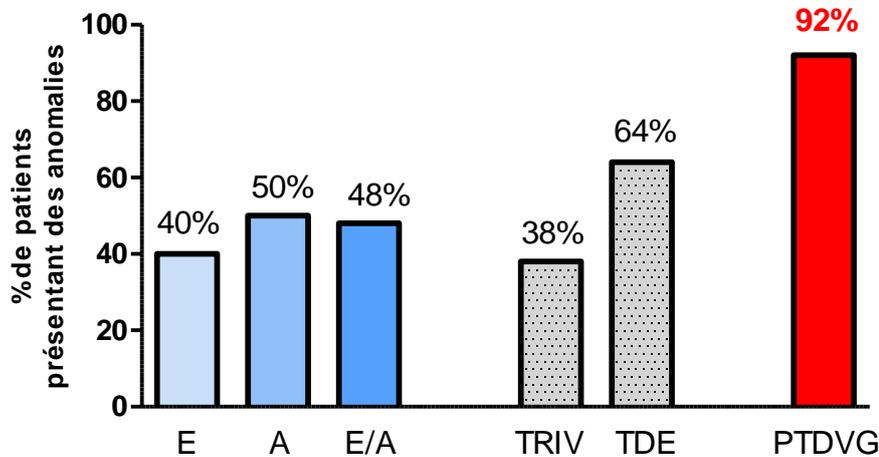
**Figure 10. Anomalies fonctionnelles cardiaques dans l'ICFEP.**

E/A : ratio de l'onde E sur l'onde A ; TDE : temps de décélération de l'onde E ; TRIV : temps de relaxation isovolumique ; E/E' : rapport de la vitesse de remplissage sur la vitesse de l'anneau mitral pendant la phase précoce du remplissage ; VG : ventricule gauche.

Adapté de Schober et al. 2015

Les patients atteints d'ICFEP, bien que souffrant tous d'anomalies de la diastole, présentent néanmoins des profils très divers. Ainsi, une étude de Zile et al. (2015) montre qu'en réalité, seulement la moitié des patients présentent une modification visible des ondes E et A à l'échographie, et que 38 et 64% des patients expriment respectivement des altérations du TRIV ou du TDE (Figure 11) [22]. Considérant ces données, il se pose alors la question de la détermination d'un paramètre fiable pour objectiver la dysfonction diastolique. Il apparaît que

l'anomalie la plus retrouvée chez les patients est l'élévation de la PTDVG, qui est retrouvée chez 92% des malades (Figure 11).



**Figure 11. Proportions des patients exprimant des anomalies fonctionnelles échographiques ou hémodynamiques.**

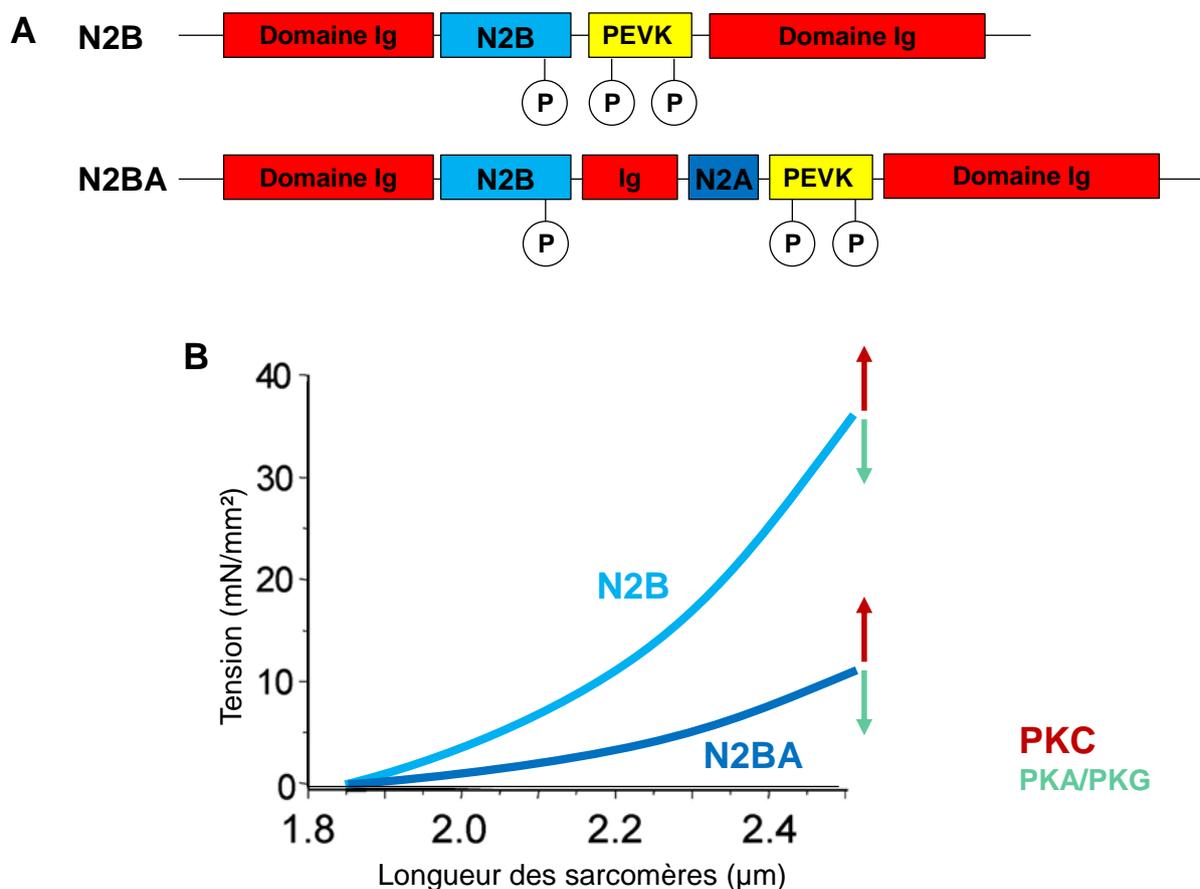
E/A : ratio de l'onde E sur l'onde A ; TDE : temps de décélération de l'onde E ; TRIV : temps de relaxation isovolumique ; PTDVG : pression télédiastolique du ventricule gauche.  
D'après Zile et al. 2015

Parallèlement aux anomalies de la diastole, la fonction systolique du cœur est en apparence peu altérée au cours de la maladie, comme en témoigne la fraction d'éjection, qui est peu ou pas diminuée (> 50 %) chez les patients souffrant d'ICFEP. Toutefois, la littérature rapporte dans l'ICFEP une déformation anormale du cœur pendant la phase de contraction, observable par échographie en mode *speckle tracking* [127, 128].

### **3.2.1.2. Anomalies des protéines sarcomériques**

Les cardiomyocytes présentent des modifications intrinsèques dans l'ICFEP. Il a été rapporté une hypertrophie cellulaire, notamment en relation avec les remodelages cardiaques de type hypertrophiques décrits dans le paragraphe précédent.

Au niveau des sarcomères, plusieurs anomalies ont également été relevées. La titine, protéine géante responsable de la compliance intrinsèque des cardiomyocytes, peut subir plusieurs modifications. Tout d'abord, l'expression relative des deux isoformes de la titine, N2BA et N2B, est modifiée chez les patients. En effet, l'isoforme la moins compliant (N2B) voit son expression augmentée chez les patients [129, 130]. De plus, la titine est une protéine phosphorylable. Il a été montré que l'hypophosphorylation du domaine N2B par la PKA et la PKG, et que l'hypophosphorylation du domaine PEVK par la PKC sont associées à une augmentation de la résistance passive des cardiomyocytes des patients (Figure 12) [22].



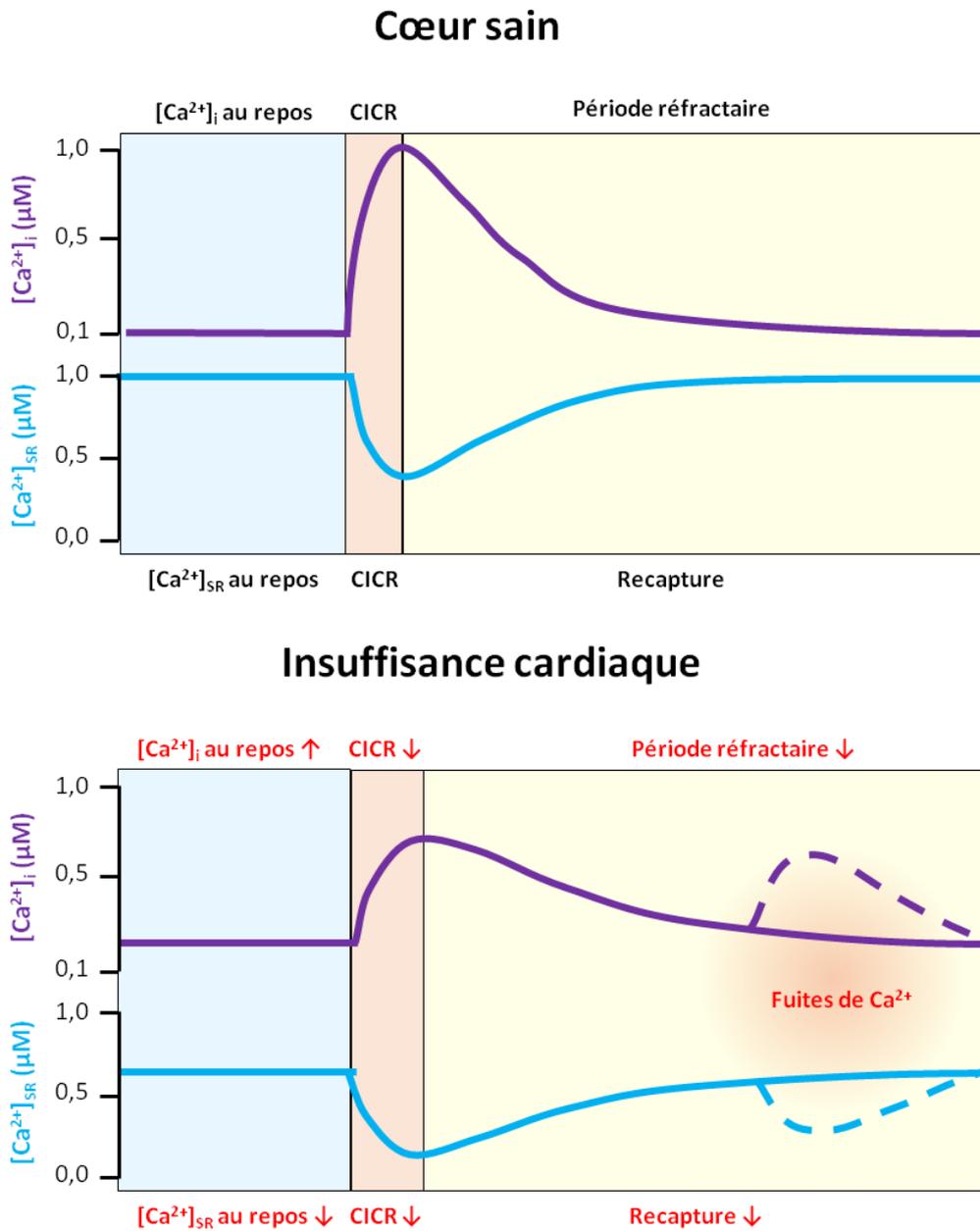
**Figure 12 : Effet de la phosphorylation sur les isoformes N2B et N2BA de la titine.** A. Sites de phosphorylation des domaines N2B et PEVK de la titine. B. Propriétés de compliance des deux isoformes de la titine, et effets de la phosphorylation. Une hyperphosphorylation des sites de la PKC, ainsi qu'une hypophosphorylation des sites de la PKA et PKG sont responsable d'une augmentation de la résistance passive à l'étirement.

L'implication d'autres protéines sarcomériques est également suspectée de réduire la compliance myocardique. Parmi elles, la MyBPC (myosin binding protein C) est une protéine candidate potentielle. La MyBPC se lie aux filaments épais de myosine, et possède un rôle structural en facilitant l'assemblage des molécules de myosine [131]. Elle possède également un rôle fonctionnel en restreignant les interactions entre les têtes de myosine et les filaments d'actine [132, 133]. Des mutations sur la MyBPC sont déjà connues pour être impliquées dans des formes familiales de cardiomyopathie hypertrophique chez l'homme [134] et certaines races de chats [135-137]. Récemment, une étude chez la souris a montré que l'état de phosphorylation de la MyBPC modifiait considérablement la fonction diastolique. Les auteurs ont montré qu'un déficit de phosphorylation sur les sites spécifiques de la PKA provoquaient une dysfonction diastolique sévère [138].

### **3.2.1.3. Anomalies du cycle du calcium**

Un mécanisme directement impliqué dans la relaxation du myocarde est la régulation du cycle du calcium. Chez l'homme, plusieurs études ont déjà montré l'implication d'une surcharge en  $[Ca^{2+}]_i$  dans l'IC [138, 139]. Ces anomalies peuvent résulter d'une diminution de sa recapture et d'une augmentation de sa libération, par exemple à cause de fuites du RS, (Figure 13). Plusieurs anomalies au niveau des protéines du cycle du calcium peuvent être impliquées dans l'apparition d'une surcharge calcique. Tout d'abord l'expression de SERCA2a peut être altérée, comme l'a montré une étude de Mercadier et al. (1990) [140]. L'activité de SERCA2a peut également être modifiée, du fait d'une diminution de la phosphorylation du PLB, sa protéine régulatrice [141]. Par ailleurs, l'échangeur  $Ca^{2+}/Na^+$  NCX peut voir son expression augmentée. Si l'augmentation de l'expression de NCX est probablement compensatrice en réponse à l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$ , il existe dans l'IC une augmentation de  $[Na^+]_i$  subsarcolemmale. Dans ces conditions, les mouvements d'ions transitant par NCX vont s'inverser, aggravant encore la surcharge calcique cytoplasmique [142]. De plus, RyR2 a été rapportée comme étant hyperphosphorylée dans l'insuffisance cardiaque. Cette hyperphosphorylation limite l'association de RyR2 avec FKBP12.6, une protéine qui stabilise le tétramère, et provoque l'apparition de fuites de calcium via le canal [143, 144]. Ces dysfonctions concourent pour élever le  $[Ca^{2+}]_i$  et à abaisser le  $[Ca^{2+}]_{SR}$ , provoquant une

relaxation incomplète durant la diastole, mais également une diminution de la force contractile pendant la systole (Figure 13).



**Figure 13 : La surcharge calcique dans l'insuffisance cardiaque.**

Adapté de Zima et al. 2014. CICR : Calcium induced-calcium release;  $[Ca^{2+}]_i$  : concentration en calcium cytosolique;  $[Ca^{2+}]_{SR}$  : concentration calcique dans le RS.

Ces études ont été conduites sur des patients en IC terminale, sans distinction entre l'ICFEP et ICFER. S'il n'existe à l'heure actuelle pas de données propres aux patients atteints d'ICFEP, l'utilisation de modèles animaux permet de souligner l'implication de tels mécanismes dans la physiopathologie de la maladie.

Plusieurs études menées sur des rats SHR (spontaneously hypertensive rat, une souche de rats hypertendus développant entre autre des troubles de la diastole), ont montré que ces animaux présentaient des altérations du cycle du calcium. Ces animaux présentent en effet une augmentation de l'activité et de l'expression de NCX, associé à une diminution de l'activité de SERCA2a. Ces modifications d'expression et d'activité sont associées à une augmentation des fuites de calcium, et, paradoxalement, à une cinétique de recapture plus courte [145]. Dans une étude élégante utilisant un modèle d'ICFEP par néphrectomie chez des rats Wistar, Primessnig et al. ont montré l'association de flux calciques altérés et de troubles fonctionnels de la diastole. En effet, dans ce modèle, les cardiomyocytes du VG présentaient une élévation de Tau (constante de relaxation), traduisant un déficit de la relaxation musculaire cardiaque, et une diminution de la  $[Ca^{2+}]_{RS}$ . De manière intéressante, cette étude montre également une élévation de l'expression de NCX, ainsi qu'un effet bénéfique d'un inhibiteur de NCX sur la fonction diastolique [146]. De plus, il est également intéressant de noter que des modifications de l'activité de NCX dans les fibroblastes sont potentiellement impliquées dans la production de collagène et le développement de la fibrose [147].

#### **3.2.1.4. Anomalies de la matrice extracellulaire**

Les anomalies de la matrice extracellulaires peuvent également être responsables de l'augmentation de la rigidité du myocarde. La fibrose, c'est à dire le dépôt excessif de collagène dans la matrice extracellulaire, est un mécanisme majeur dans l'ICFEP. Les patients présentent classiquement une fibrose diffuse du myocarde [22, 124, 148, 149]. L'imprégnation en collagène de la matrice extracellulaire est due à un déséquilibre entre la production et la dégradation du collagène [150]. Il a été observé chez les patients une diminution de l'expression de la matrix metalloproteinase 1 (MMP-1, responsable de la dégradation du collagène) et de la tissue inhibitor metalloproteinase 1 (TIMP-1), et une augmentation d'expression de la MMP-2

[124]. La surexpression de MMP-2 a été rapportée comme étant un facteur aggravant de la fibrose, car cette enzyme détruit la membrane basale des cellules dans le myocarde, facilitant alors la migration de cellules inflammatoires dans le tissu cardiaque et l'entretien de la fibrose [151]. En outre, il a été montré qu'un maillage entre les fibres de collagène existe également chez les patients atteints d'ICFEP, réduisant encore d'avantage la compliance du tissu cardiaque [148].

Si la fibrose myocardique est un élément majeur de la rigidité cardiaque, plus récemment, des études ont montré que les patients d'ICFEP présentaient de l'amyloïdose cardiaque. Le terme d'amyloïdose désigne un ensemble de maladies caractérisées par le dépôt extracellulaire sous forme fibrillaire d'un matériel protéique autologue devenu insoluble. Différentes protéines sont capables de former des dépôts amyloïdes, elles ont en commun une structure fibrillaire. Sous certaines conditions (stress oxydant, mutation ponctuelle, acidose...) ces protéines changent de conformation spatiale, deviennent insolubles et forment des dépôts dans la matrice extracellulaire [152]. La richesse en feuillettes  $\beta$ -plissés de ces structures rend ces dépôts extrêmement résistants à l'action des protéases. Dans l'ICFEP, il a été montré que la présence de dépôts amyloïdes de transthyréline (TTR, une protéine sérique synthétisée par le foie) participait à l'augmentation de la rigidité tissulaire cardiaque [153, 154].

### **3.2.2. La dysfonction endothéliale**

Une des caractéristiques retrouvées chez les patients est l'apparition d'une dysfonction endothéliale, c'est-à-dire une diminution des capacités de l'endothélium à induire une vasodilatation, due à une diminution de la biodisponibilité en  $\bullet$ NO [155]. Plusieurs études ont déjà montré la forte prévalence de la dysfonction endothéliale chez les patients [155, 156]. De plus, il a également été montré que la dysfonction endothéliale était un facteur de mauvais pronostic, comme le montre l'étude d'Akiyama et al. (2012), où les patients atteints présentaient un risque accru d'événements cardiovasculaires [157].

En pratique, les conséquences de la dysfonction endothéliale peuvent s'observer au niveau cardiaque et au niveau vasculaire. En effet, l'endothélium formant un revêtement

uniforme dans la lumière des vaisseaux, ainsi qu'à l'intérieur des cavités cardiaques, l'activité paracrine des cellules endothéliales s'exerce à la fois sur les cardiomyocytes et les cellules musculaires lisses des vaisseaux.

Les patients atteints d'ICFEP présentent une augmentation de l'élastance artérielle. L'élastance artérielle est la variation de pression induite par une variation de volume dans le lit artériel, et est un indicateur de la rigidité des artères. Les patients présentent également une diminution des capacités de vasodilatation des artères périphériques [158, 159].

### **3.3. La réponse au stress dans l'ICFEP**

Un élément majeur de la physiopathologie de l'ICFEP chez les patients est l'incapacité du système cardiovasculaire à s'adapter à des situations de stress. En situation physiologique, le système cardiovasculaire adapte son fonctionnement pour répondre à la demande accrue en O<sub>2</sub> et en nutriments de l'organisme [160]. Au niveau cardiaque, la stimulation par les catécholamines libérées suite à un stress va entraîner une amélioration de la relaxation et de l'effet de succion du VG pendant le remplissage (effet lusitrope positif), ainsi qu'une augmentation de la contractilité (effet inotrope positif). Conjointement à ces mécanismes neuro-hormonaux, le cœur est également soumis à la loi de Franck-Starling : plus le muscle cardiaque est étiré, plus celui-ci déploie une grande force de contraction. Le mécanisme sous-jacent est lié au fait lors d'un étirement, les éléments des sarcomères disposés en parallèle sont ainsi rapprochés les uns des autres, ce qui facilite les interactions actine – myosine et augmente l'affinité de la TnC pour le Ca<sup>2+</sup> [161].

#### **3.3.1. Inadaptation de la fonction systolique**

Chez les patients atteints d'ICFEP, la fonction systolique demeure préservée au repos. A l'effort, il apparait que la fraction d'éjection reste également peu modifiée chez les patients malades par rapport aux individus sains à l'effort [162]. Toutefois, les patients présentent une réduction majeure des capacités d'éjection du cœur en situation de stress, avec une réduction

drastique du débit cardiaque [162]. Il apparaît que les patients en ICFEP présentent une diminution de la réserve systolique, c'est à dire une incapacité à adapter la contractilité du cœur en réponse à un stress [159].

### **3.3.2. Inadaptation de la fonction diastolique**

Les anomalies de la diastole, déjà présentes au repos, sont également un point critique de la physiopathologie à l'effort. En situation de stress, la PTDVG devient extrêmement élevée par rapport à la situation de repos. L'élévation drastique des pressions de remplissages du VG va entraîner une élévation brutale de la pression dans les vaisseaux capillaires pulmonaires, et favoriser la survenue d'œdème pulmonaire, qui se caractérise chez les patients par de la toux à l'effort, des difficultés à respirer, et dans les cas les plus extrêmes une décompensation [163]. De plus, la dynamique de relaxation cardiaque est modifiée dans l'ICFEP. A l'effort, on observe que le temps consacré à la relaxation cardiaque est plus élevé chez les patients, et donc que le temps consacré au remplissage pendant la diastole se trouve réduit, détériorant encore d'avantage les capacités de remplissage dans les cœurs pathologiques [164].

### **3.3.3. Insuffisance chronotrope**

L'augmentation du rythme cardiaque à l'effort est un facteur majeur d'adaptation. Il apparaît que chez les patients atteints d'ICFEP, l'augmentation de la fréquence cardiaque est limitée, et contribue à l'incapacité du cœur à subvenir aux besoins de l'organisme [162, 163, 165]. Si aucune donnée concernant l'origine de l'insuffisance chronotrope n'a été récoltée chez les patients atteints d'ICFEP, des études antérieures menées sur les patients atteints d'ICFER suggèrent qu'une dysfonction sinusale et une altération de la signalisation  $\beta$ -AR sont des mécanismes potentiellement impliqués [166].

### **3.3.4. Anomalies vasculaires**

Conjointement aux anomalies cardiaques, les anomalies du système vasculaire jouent un rôle prépondérant dans l'inadaptation des patients aux situations de stress. Plusieurs études ont mis en évidence que les patients présentaient des altérations à plusieurs niveaux de l'arbre vasculaire, responsables d'une limitation de l'approvisionnement en O<sub>2</sub> de l'organisme.

Hundley et al. (2001) ont montré que les patients atteints d'ICFEP présentaient une réduction drastique de la distensibilité de l'aorte thoracique, impactant sévèrement la postcharge et donc le travail cardiaque [167]. Les auteurs ont également montré que ce paramètre était corrélé à la réduction de la consommation maximale d'O<sub>2</sub> (VO<sub>2max</sub>) chez les patients. Desai et al. (2009) ont également rapporté des données similaires en observant une augmentation de la vitesse de l'onde de pouls carotido-fémorale chez les patients, ce qui traduit une augmentation de la rigidité artérielle [168].

De plus, Haykowski et al. (2013) ont également montré chez les patients la présence d'une dysfonction endothéliale. Les auteurs ont mis en évidence une diminution de la dilatation médiée par le flux dans l'artère brachiale [169]. Ces résultats ont également été confirmés par tonométrie artérielle périphérique, une autre méthode de mesure de la fonction endothéliale et de la microcirculation [170]. La dysfonction endothéliale, en limitant les capacités de vasodilatation en réponses à un stress, est corrélée à l'intolérance à l'effort chez les patients [170].

## **3.4. Traitements de l'ICFEP**

### **3.4.1. Recommandations actuelles pour la prise en charge des patients**

Les dernières recommandations de l'*American College of Cardiology Foundation* (ACCF), de l'*American Heart Association* (AHA) et de l'*European Society of Cardiology* (ESC) s'accordent à préconiser de traiter les comorbidités présentes chez les patients, à savoir :

- la prise en charge de l'hypertension artérielle lorsqu'elle est présente, par l'utilisation de  $\beta$ -bloquants, d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion, ou des antagonistes de l'angiotensine
- l'usage de diurétiques en cas de surcharge en volume et d'œdèmes
- la revascularisation coronaire en cas de maladie coronaire associée à des signes d'ischémie cardiaque.
- la prise en charge du diabète, lorsque les patients en souffrent.

Hélas, à ce jour, aucun traitement spécifique n'est actuellement adapté pour la prise en charge des patients [171, 172].

### **3.4.2. Essais cliniques existants**

Ces dernières décennies ont vu beaucoup d'études cliniques se succéder, afin de tester les thérapies déjà utilisées dans l'ICFER, ou de nouvelles approches thérapeutiques. Parmi les nombreuses études qui ont été menées, un grand nombre ont tenté d'agir sur la modulation du système rénine-angiotensine-aldostérone, que cela soit par des antagonistes des récepteurs à l'angiotensine (CHARM-Preserved [173] ; I-PRESERVE [174]), à l'aldostérone (RAAM-PEF [175] ; ALDO-DHF [176] ; TOPCAT [113]) ou des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (PEP-CHF [177]). Hélas, aucune de ces études n'a démontré une réelle amélioration de l'état des patients, que cela soit par la mortalité, le nombre d'hospitalisations, ou l'amélioration de l'intolérance à l'effort. Suite à ces nombreux résultats décevants, des analyses à posteriori de ces études ont été initiées. Il est apparu dans l'étude TOPCAT, que les patients en ICFEP ayant le mieux répondu au traitement étaient également ceux qui présentaient la FE la plus faible, et pour qui la notion d'ICFEP était discutable. Une hypothèse pour expliquer ce phénomène serait que le système rénine-angiotensine-aldostérone n'est pas une cible pertinente pour la prise en charge de l'ICFEP, et il devient alors urgent de développer de nouvelles approches [178].

L'utilisation de  $\beta$ -bloquants a également été envisagée (ELANDD [179] ; J-DHF [180]), mais n'a pas montré d'intérêt thérapeutique pour traiter l'ICFEP. De même, l'emploi du Sildenafil, un inhibiteur de la phosphodiesterase 5 (PDE5) n'a pas démontré d'efficacité dans le traitement de l'ICFEP (RELAX [181]).

Parmi les essais cliniques les plus prometteurs, on retrouve les études ayant porté sur les statines, des inhibiteurs de la synthèse du cholestérol, qui contrairement aux études précédentes, ne ciblent pas spécifiquement le système cardiovasculaire. Plusieurs de ces études cliniques [182, 183], ainsi qu'une méta-analyse des données de la littérature [184] ont montré une diminution de la mortalité des patients.

Parallèlement à ces études à grandes échelles, plusieurs approches à plus petite échelle ont également été testées, sans qu'elles ne montrent de manière certaine un réel bénéfice pour les patients (Tableau 5).

**Tableau 5. Essais cliniques menés sur des cohortes de patients atteints d'ICFEP.**

Mode d'action	Molécule	Nom de la cohorte	Références	Conclusions	
Etudes majeures	Antagonistes des récepteurs à l'angiotensine	CHARM-Preserved	Yusuf et al. 2003	moins d'hospitalisations aucune amélioration de la mortalité	
		I-PRESERVE	Massie et al. 2008	aucune amélioration du nombre d'hospitalisation de la mortalité (cardiovasculaire ou non), ni de la qualité de vie	
	Antagonistes des récepteurs à l'aldostérone	eplerenone	RAAM-PEF	Deswal et al. 2011	réduction des marqueurs du turnover du collagène, amélioration de la fonction diastolique, sans amélioration de la capacité à l'exercice
		spironolactone	Aldo-DHF	Edelmann et al. 2013	amélioration de la fonction diastolique sans amélioration de la capacité à l'exercice
		spironolactone	TOPCAT	Pitt et al. 2014	aucune amélioration de la mortalité cardiovasculaire moins d'hospitalisations pour IC
		perindopril	PEP-CHF	Cleland et al. 2006	Amélioration des symptômes et de l'intolérance à l'effort, moins d'hospitalisations dans la première année d'étude. Pas assez de puissance statistique pour conclure à plus long-terme dans cette étude
	Inhibiteur de l'enzyme de conversion	statines		Ouzounian et al. 2009 Fukuta et al. 2005 Liu et al. 2016	Réduction de la mortalité à 5 ans Possible amélioration de la mortalité Réduction de la mortalité (méta-analyse)
				Redfield et al. 2013	Aucune amélioration de l'intolérance à l'effort, ni du statut clinique
	Inhibiteur de la PDES	sildenafil	RELAX	Redfield et al. 2013	Aucune amélioration de l'intolérance à l'effort, ni du statut clinique
		nebivolol	ELANDD	Conraads et al. 2012	Aucune amélioration de l'intolérance à l'effort
	β-bloquants	carvedilol	J-DHF	Yamamoto et al. 2013	Aucune amélioration du pronostic
		ranolazine	RALI-DHF	Maier et al. 2013	Améliore la pression capillaire pulmonaire et la PTDVG à l'administration. Aucune amélioration des paramètres de la relaxation, du NT-proBNP, et des capacités à l'effort à 14 jours
	Inhibition des courants sodique et calciques lent	Riociguat	DILATE-1	Bonderman et al. 2014	Testé chez des patients souffrant d'HTAP. Améliore le volume d'éjection et les résistances périphériques, sans modification de la pression capillaire pulmonaire.
Isosorbide mononitrate		NEAT-HFpEF	Redfield et al. 2015	Aucune amélioration de la capacité d'exercice, de la qualité de vie, et du NT-proBNP	
Activateur des sGC	ivabradine		Kosmala et al. 2013 Pal et al. 2015	Améliore l'intolérance à l'effort Aggrave l'intolérance à l'effort	
	if	PARAMOUNT	Solomon et al. 2012	Réduit le niveau de NT-proBNP	
Inhibiteur de la néprilysine	verapamil		Setaro et al. 1990	Améliore l'intolérance à l'effort, mais étude très réduite (20 patients)	
	Inhibiteur des canaux calciques	Digitalis Investigation Group	Ahmed et al. 2006	Aucune amélioration de la mortalité cardiovasculaire été du nombre d'hospitalisations	
Inhibiteur de la Na+K+ATPase membranaire	digoxine				
Etudes mineures, preuve de concept					

## **4. Les modèles animaux d'ICFEP**

Devant les échecs successifs des études cliniques réalisées par le passé, il devient alors urgent de mieux cerner la physiopathologie complexe de l'ICFEP. Du fait de l'âge avancé de la population atteintes, rares sont les patients éligibles à une biopsie myocardique, ou à une transplantation cardiaque. Au vu de la rareté d'échantillons humains, le recours à des modèles animaux restent à ce jour incontournable pour mieux comprendre la maladie, et explorer de nouvelles pistes thérapeutiques. C'est dans ce but que la communauté scientifique tente de sélectionner un modèle pertinent pour reproduire l'ICFEP. Plusieurs approches ont été décrites pour induire chez les animaux une dysfonction diastolique, notamment l'élévation de la post-charge, ou l'induction d'altérations métaboliques sévères.

### **4.1. Modèles d'ICFEP induite par une élévation de la post-charge**

Parmi les modèles utilisés pour étudier les anomalies de la diastole, une démarche couramment retrouvée dans la littérature est l'induction d'une hypertrophie cardiaque consécutivement à une augmentation de la post-charge [185]. Dans ces modèles, les animaux présentent une hypertrophie cardiaque importante, caractérisée par une augmentation du poids du cœur et de l'épaisseur des parois, associés avec une augmentation du volume en fin de diastole et une augmentation de la pression télédiastolique.

Plusieurs méthodes sont actuellement employées pour induire ces anomalies.

#### **4.1.1. Constriction aortique**

Une des méthodes retrouvée dans la littérature pour induire une élévation de la post-charge est la réduction du diamètre de l'aorte de manière chirurgicale. La réduction de diamètre est réalisée à l'aide d'un clip au diamètre standardisé, pouvant être placé au niveau de l'aorte thoracique [186, 187], ou abdominale [188]. La chirurgie est réalisée sur des animaux âgés de

4 semaines, et les anomalies diastoliques apparaissent dans les 4 à 6 semaines suivant la pose du clip, avec une fonction systolique conservée.

Toutefois, à plus long terme, ces animaux présentent un effondrement des capacités contractiles du cœur. En effet, une étude de Molina et al. (2009) portant sur des rats ayant subi une constriction de l'aorte thoracique montre que 20 semaines après la chirurgie, la fraction de raccourcissement de ces rats diminue drastiquement [187]. Dans une étude de Moens et al. (2008) portant sur des souris, les animaux présentaient dès 9 semaines après la chirurgie une diminution importante de la fraction d'éjection [186].

#### **4.1.2. Modèle DOCA-Salt**

Dans le modèle DOCA-Salt, l'élévation de la post charge est induite par une néphrectomie unilatérale, associée à une alimentation riche en sel et à l'administration d'acétate de deoxycorticostérone (DOCA), un précurseur de l'aldostérone. La réduction de la masse rénale, associée à un régime riche en sel conduit à une augmentation du volume sanguin. L'administration de DOCA provoque un déséquilibre dans la réabsorption de sodium, en favorisant sa réabsorption au niveau des tubules distaux. Une hypertension artérielle marquée apparaît alors rapidement chez ce modèle : une dizaine de jours pour les souris, contre 28 pour les rats [189].

Les protocoles décrits dans la littérature pour l'étude de l'ICFEP sont variés, et il est difficile de comparer entre elles les procédures. La fonction diastolique de ce modèle a été essentiellement décrite chez la souris, et, selon les auteurs, les âges d'expérimentations sont très divers, aboutissant à des phénotypes variés. Par exemple, Silberman et al. (2010) a montré sur des souris C57BL6 opérées à 7-8 semaines l'apparition d'une dysfonction diastolique par échographie 14 jours seulement après la chirurgie [190]. Mais, à ce stade, aucune fibrose n'était détectée, probablement du fait des temps d'observation très courts. A l'inverse, Gürgen et al. (2013), a quant à lui étudié des souris C57BL6 opérées à 7-8 semaines 42 jours après le début du protocole, et a effectivement montré l'apparition de fibrose cardiaque à ce stade [191].

Peu de données sur la fonction systolique des animaux existent dans ce modèle. Si l'on se rapporte à l'étude de Gürgen et al. (2013), la fonction systolique n'est pas altérée 42 jours après le début du protocole [191].

#### **4.1.3. Le rat Dahl/Salt sensitive**

La souche de rat Dahl/Salt sensitive (SS) est une souche de rat sélectionnée à partir de la souche Sprague-Dawley par le Dr. Dahl en 1962. Ces rats ont la particularité de développer une hypertension artérielle sévère lorsqu'ils sont nourris avec un aliment riche en sel. Une étude de Klotz et al. (2006) a montré que les rats Dahl/SS développaient à l'âge de 8 semaines des anomalies de la diastole [192]. Toutefois, à partir de 16 semaines, la fraction d'éjection de ces rats décroît drastiquement. De plus, l'hypertension artérielle sévère n'est pas une caractéristique retrouvée chez les patients.

#### **4.1.4. Le rat mRen2.Lewis**

Le rat mRen2.Lewis est un rat transgénique, dont la particularité est d'exprimer la rénine murine dans l'ensemble de ses tissus. Ces rats présentent naturellement une forte hypertension artérielle. Dans ce modèle, les rates mRen2.Lewis, lorsqu'elles sont ovariectomisées à l'âge de 4 semaines, présentent 11 semaines plus tard une hypertrophie cardiaque, une augmentation de E/E' (rapport de la vitesse de remplissage sur la vitesse de l'anneau mitral) caractérisant une diastole altérée, ainsi que de la fibrose [193]. La fonction systolique de ces rats ne semble pas altérée aux âges étudiés, toutefois, l'étude de Groban et al. ne porte que sur des rats génétiquement modifiés, et n'intègre pas de rats contrôles de la même souche, ce qui rend ces résultats délicats à interpréter.

## **4.2. Modèles spontanés d'ICFEP**

### **4.2.1. Le rat SHR**

La souche « Spontaneously Hypertensive Rat » (SHR) a été créée à partir de rats de souches Wistar en 1963. Ces rats présentent une élévation marquée de la pression artérielle, et constituent un modèle couramment utilisé pour étudier l'hypertension artérielle. Toutefois, d'après une étude de Dupont et al. (2012), les rats SHR développent spontanément une dysfonction diastolique dès l'âge de 3 semaines, avant l'apparition d'une hypertension qui a lieu à l'âge de 5 semaines [194]. De plus, une étude récente a montré, comme pour le modèle Dahl/SS, l'apparition d'une dysfonction systolique progressive avec l'âge, non concordante avec l'histoire naturelle de l'ICFEP [195].

### **4.2.2. La souris SAM**

La souche « Senescence Accelerated Mouse » (SAM) est une souche de souris dont la particularité est de vieillir prématurément. Ces souris ont une espérance de vie comprise entre 10 et 17 mois, et sont un modèle couramment utilisé pour l'étude d'affections gériatriques. Reed et al. ont montré en 2011 que ces souris, à l'âge de 6 mois en moyenne, présentaient une hypertrophie cardiaque, une dysfonction diastolique (avec une augmentation de E/E') et une fibrose cardiaque. Chez ces animaux, la fonction systolique n'est pas altérée [196].

## **4.3. Modèles d'ICFEP associant des altérations métaboliques**

Plus récemment, des modèles reposant sur des altérations métaboliques ont été proposés pour étudier l'ICFEP. Parmi eux, on peut retrouver les différentes souches de rat Zucker (Zucker fatty rat, Zucker diabetic rat...) et les souris diabétiques db/db. Ces différentes souches ont en commun une déficience du récepteur à la leptine, et développent précocement hyperphagie, résistance à l'insuline, hyperinsulinémie et obésité.

### **4.3.1. Le rat SHHF**

Le rat SHHF (Spontaneously hypertensive heart failure) a été obtenu dans les années 1980 par un croisement entre un rat d'une souche obèse (souche Koletski) et un rat SHR [197]. Ces rats développent rapidement une hypertension artérielle sévère (PAS > 200 mmHg), de l'obésité, une polyurie, une glycosurie, une hypercholestérolémie et une intolérance au glucose [198].

### **4.3.2. Zucker fatty rat (ZFR)**

Initialement décrit par Zucker et al. (1962), le Zucker fatty rat (ZFR) dérive d'une colonie de rat de souche 13M, où est apparu de manière spontanée une mutation sur le gène de la leptine [199]. Le rat ZFR présente de l'obésité et de l'hypercholestérolémie dès l'âge de 2 mois. Ces animaux présentent dès l'âge de 8 semaines une dysfonction diastolique, avec une augmentation du temps de relaxation, et une réduction du temps de remplissage diastolique, associé à de la fibrose [200]. A plus long terme, ces animaux présentent également des altérations de la fonction systolique. Dans son étude, Fang et al (2011) a en effet montré qu'à l'âge de 24 semaines, les rats présentaient une diminution significative de la fraction d'éjection associée à une dilatation du VG [201]. Ces animaux obèses ne présentent néanmoins pas de diabète, et ont été proposés comme modèle d'étude du prédiabète [202].

### **4.3.3. Zucker diabetic fatty rat (ZDF)**

Le ZDF, décrit par Clark et al. (1983) dérive d'une colonie de ZFR, dans laquelle est apparue une population de rat développant spontanément un diabète sucré [203]. Chez ces rats, l'hyperglycémie précoce est dû à une baisse drastique de l'expression de GLUT2 et GLUT4, transporteurs du glucose respectivement au niveau du foie, et du cœur, tissu adipeux, et muscle squelettique [204]. Ces animaux développent une dysfonction diastolique dès l'âge de 12 semaines, associant une élévation de la PTDVG, de la fibrose, et une hypertrophie cardiaque.

Toutefois, il est important de noter que ces animaux présentent une dysfonction rénale sévère [205].

#### **4.3.4. Rat Zucker diabétique et hypertendu (ZSF1)**

Apparu plus récemment, le rat ZSF1 est un rat issu d'un croisement entre une femelle ZDF et un rat mâle SHHF (Spontaneously Hypertensive Heart Failure). Ce modèle, décrit au niveau cardiaque par Hamdani et al. (2013), présente de l'obésité, du diabète, et une hypertension artérielle sévère [206]. Dans son étude, Hamdani et al. a décrit l'apparition d'une dysfonction diastolique dès l'âge de 14 semaines, avec une élévation du ratio E/E' associé à de la fibrose et une hypertrophie cardiaque. Toutefois, la protéinurie sévère observée chez les animaux suppose que ce modèle, particulièrement sévère, est associé à une insuffisance rénale majeure [206].

#### **4.3.5. Souris diabétique db/db**

La souris db/db, à l'instar des modèles Zucker, développe également précocement du diabète, de l'obésité, et une hypercholestérolémie. Chez ces souris, la dysfonction diastolique apparaît également très jeune, entre 7 et 11 semaines, associant une hypertrophie cardiaque et des anomalies de la relaxation et du remplissage cardiaque [207].

### **4.4. Modèles développés chez des gros animaux**

Il est important de relever qu'en plus des modèles de rongeurs qui sont les plus utilisés, il existe également des modèles de gros animaux comme les modèles de chien [208] et de porc [209]. Ces modèles, bien que coûteux, présentent l'avantage d'une physiologie cardiaque plus proche de celle humaine.

#### **4.4.1. Modèle canin**

Dans ce modèle, les chiens présentent une HTA, obtenue en enveloppant les reins dans du cellophane ou du papier de soie [210]. L'hypertension est observable 2 semaine après la procédure chirurgicale. Les analyses échocardiographiques réalisées 12 semaines après la chirurgie montrent une diminution du diamètre télédiastolique du VG, due à une hypertrophie associée au développement d'une fibrose myocardique chez ces animaux. A ce stade, il n'y a pas d'altération de la FE. L'hypertrophie cardiaque est associée au développement après 12 semaines d'une fibrose myocardique [210].

Des études invasives par boucles pression-volume ont également mis en évidence une élévation de la  $PTD_{VG}$  chez ces animaux ainsi qu'une élévation de l'élastance artérielle [210].

#### **4.4.2. Modèle porcin**

Dans ce modèle de truie développé par Rienzo et al. (2012), une hypertension artérielle est induite par infusion d'angiotensine de type II ( $30 \text{ ng.kg.min}^{-1}$ ) pendant 28 jours [209]. Préalablement à ce traitement, les animaux sont appareillés de façon à pouvoir suivre l'évolution de la fonction et de la morphologie cardiaques au cours du temps. Bien qu'aucune altération de la  $PTD_{VG}$  ne soit mise en évidence après 28 jours, une hypertrophie myocardique associée à de la fibrose est démontrée dans ce modèle. La caractérisation hémodynamique des animaux met en avant une modification de l'importance relative des différentes périodes du cycle cardiaque. Ainsi, les animaux présentent une augmentation des périodes de contraction et de relaxation isovolumique au dépend des périodes d'éjection systolique et de remplissage diastolique. Ces altérations du cycle cardiaque, bien qu'étant sans conséquence sur l'éjection cardiaque, sont le signe d'une incapacité du myocarde à s'adapter à des conditions de stress. En effet, il a été également montré qu'une augmentation de la FC n'induit aucune modification de la constante de relaxation  $\tau$  dans ce modèle alors qu'une augmentation de cette constante est observée chez les animaux contrôles.

Ce modèle est l'un des rares avec le modèle de rate mRen2.Lewis à prendre en compte l'importance du sexe dans le développement de l'ICFEP. Une analyse échocardiographique de ces animaux est nécessaire pour mieux caractériser les altérations possibles de la fonction diastolique. Malheureusement, comme dans la plupart des autres modèles d'ICFEP, ces animaux présentent une hypertension artérielle sévère qui n'est pas retrouvée chez les patients en ICFEP.

#### **4.5. Cardiomyopathie félines spontanées**

Parallèlement aux modèles expérimentaux couramment utilisés dans la littérature, il est intéressant de noter que les dysfonctions diastoliques concernent aussi fréquemment les chats domestiques. Dans l'espèce féline, la cardiomyopathie est une dominante pathologique majeure, et représente l'affection la plus retrouvée en cardiologie. En médecine vétérinaire, le terme de cardiomyopathie fait référence à la définition donnée en 1995 par l'OMS, qui désigne par ce terme "des affections du myocarde associées à une dysfonction cardiaque" [211]. En pratique, la classification vétérinaire distingue trois grands types de cardiomyopathies : les cardiomyopathies hypertrophique, restrictive, et dilatée. Certaines cardiomyopathies hypertrophiques ont un caractère héréditaire, et sont notamment dues à des mutations de la protéine C cardiaque de liaison à la myosine (Mybpc) identifiées chez les races Maine Coon, British Shorthair et Ragdoll [135-137]. Cependant, toutes ces affections ont en point commun d'associer des anomalies de la diastole à différents stades à une fonction systolique préservée et de la fibrose cardiaque [212-214]. De plus, mis à part les cardiomyopathies héréditaires, ces affections touchent des chats adultes ou âgés, entre 5 et 18 ans selon les études [212, 213, 215-218]. Il est également intéressant de remarquer que les populations de chats domestiques sont fréquemment atteints pas les comorbidités classiquement décrites chez les patients atteints d'ICFEP : hypertension artérielle, insuffisance rénale [219-221], obésité [222-225], diabète [226]. Si le lien entre l'hypertension artérielle et les cardiomyopathies hypertrophiques a clairement été établi [212, 227], à ce jour, aucune étude clinique de grande envergure n'a clairement démontré l'implication du diabète et de l'obésité dans la survenue des cardiomyopathies. Toutefois, des études rapportent une plus grande prévalence d'affections

cardiaques chez les chats diabétiques [228], stérilisés et en surpoids [229]. Malgré toutes ces similitudes entre les populations de chats domestiques et les patients, aucune étude n'a encore recherché des mécanismes physiopathologiques communs entre l'ICFEP et les cardiomyopathies félines. Les similitudes existant entre les patients humains et les chats domestiques ont fait l'objet d'un article de revue, présenté en annexe de ce manuscrit.

#### **4.6. Limites des modèles d'étude actuels**

Dans ces modèles, les troubles observés sont précoces (souvent avant 12 semaines), sévères, et pour certains conduisent rapidement à une altération de la fonction systolique (dans les 4-6 semaines), alors que ces caractéristiques ne sont pas présentes chez les patients souffrant d'ICFEP. De plus, ces études sont menées le plus souvent chez des mâles, qui présentent une hypertension artérielle sévère, alors que l'ICFEP touche entre 45 et 70 % de femmes selon les études, en absence ou en présence d'une hypertension artérielle modérée (Tableau 6).

La connaissance incomplète des mécanismes physiopathologiques et l'absence de traitement spécifique pour l'ICFEP humaine font de la création d'un modèle animal pertinent un enjeu de taille dans la compréhension et le traitement de cette maladie.

**Tableau 7. Comparaison des différents modèles d'ICFEP**

Les différences sont exprimées par rapport à la situation physiologique. = pas de différence ; + légèrement élevé ; +++ fortement élevé. FE : fraction d'éjection ; PTD<sub>VG</sub> pression télédiastolique du ventricule gauche ; E/E' : rapport de la vitesse de remplissage sur la vitesse de l'anneau mitral. F : femelle, M : mâle, Nd : non déterminé.

<sup>1</sup> Moens et al. 2008 ; <sup>2</sup> Silberman et al. 2010 ; <sup>3</sup> Reed et al. 2011 ; <sup>4</sup> Reil et al. 2013 ; <sup>5</sup> Litwin et al. 1995 ; <sup>6</sup> Groban et al. 2012 ; <sup>7</sup> Klotz et al. 2006 ; <sup>8</sup> Zhou et al. 2010 ; <sup>9</sup> Radovitz et al. 2015 ; <sup>10</sup> Hamdani et al. 2013 ; <sup>11</sup> Franssen et al. 2015 ; <sup>12</sup> Hart et al. 2001 ; <sup>13</sup> Rienzo et al. 2012

	Homme		Souris					Rat					Chien		Porc <sup>13</sup>
	HFpEF	TAC <sup>1</sup>	DOCA/salt <sup>2</sup>	SAM <sup>3</sup>	db/db <sup>4</sup>	TAC <sup>5</sup>	mRen2.Lewis <sup>6</sup>	Dahl/SS <sup>7</sup>	ZFR <sup>8</sup>	ZDF <sup>9</sup>	ZSF1 <sup>10,11</sup>	Renal banding <sup>12</sup>	angiotensine		
Âge	> 70 ans	12 sem.	10 sem.	6 mois	11 sem.	10 sem.	15 sem.	8 sem.	7 sem.	12 sem.	14 sem.	7-13 ans	nd		
Sexe	♀ > ♂	♂	♂	♂	♂	♂	♀	♂	♂	♂	♂	♂	♀		
FE	=	nd	=	=	nd	nd	=	-	=	=	=	=	nd		
PTDVG	↑	+	+	+	nd	+	+	+	nd	+/-	+	+	=		
Dysfonction diastolique	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+		
Fibrose	+	+	=	+	+	+	+	+	+	+	nd	+	+		
Hypertension artérielle	+	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++		
Diabète	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-		
Obésité	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-		

## 5. Objectifs de l'étude

Dans ce contexte, mon projet de thèse s'est concentré sur l'étude d'un nouveau modèle animal reproduisant fidèlement une ICFEP. Ce modèle qui a été généré dans l'équipe où j'ai réalisé ma thèse, est un rat transgénique, qui a la particularité de présenter une surexpression endothéliale du récepteur  $\beta_3$ -AR humain. Ainsi, l'étude menée pendant ces trois ans de thèse a pour but :

- de déterminer les conditions d'étude de l'ICFEP chez ces animaux, et ainsi d'identifier l'âge, le sexe, le statut hormonal, mais également les conditions d'élevage des animaux, afin d'identifier les conditions idéales pour étudier ce modèle,
- de caractériser précisément le phénotype de dysfonction diastolique de ces animaux, et de le comparer à la pathologie humaine, afin de déterminer son adéquation et sa pertinence afin de déterminer de nouveaux mécanismes physiopathologiques,
- d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pertinentes qui permettront, à plus long terme, d'élaborer des stratégies thérapeutiques efficaces pour les patients.

# MATERIEL ET METHODES

## 1. Modèle animal

Pour l'ensemble des expérimentations, les rats utilisés sont de souche Sprague-Dawley. Les animaux transgéniques ont été produits par la plateforme de transgénèse d'Ignacio Anegón, grâce au travail du Dr Séverine Ménoret. La transgénèse est réalisée par microinjection d'ADNc dans des embryons de rat. L'ADNc injecté code pour le récepteur  $\beta_3$ -AR humain ( $h\beta_3$ -AR) sous la dépendance du promoteur ICAM2. Initialement, 5 lignées de rats différentes ont été créées : les lignées F19, F20, F21, F22 et F23. Des échocardiographies réalisées sur chacune de ces lignées ont permis d'orienter le choix d'une lignée vers la lignée F20, qui présente un phénotype de dysfonction diastolique plus marqué.

Les reproducteurs transgéniques mâles sont accouplés avec des femelles sauvages (élevage JANVIER, France). A leur sevrage, les rats sont identifiés et génotypés. Les rates sont ovariectomisées à l'âge de 8 semaines et sont maintenues dans des conditions d'élevage standards (température 21-24°C, humidité 40-60%, et cycle diurne-nocturne de 12h, avec accès à la nourriture et à l'eau à volonté) jusqu'à l'âge de 45 semaines. A partir de l'âge de 8 semaines, tous les animaux reçoivent un aliment à teneur faible en soja et en phytoestrogènes (Harlan Global Rodent Diet, 2914C).

## 2. Génotypage

Pour le génotypage, un prélèvement d'oreille est réalisé, sur lequel est effectuée une extraction d'ADN. On réalise ensuite une PCR (Polymerase Chain Reaction) afin de détecter la présence du gène  $\beta_3$ -AR humain. Les animaux positifs sont des animaux transgéniques hétérozygotes pour le gène  $\beta_3$ -AR humain, tandis que les animaux négatifs sont sauvages.

### **3. Ovariectomie**

#### **Préparation et anesthésie des animaux**

L'intervention chirurgicale se déroule sous anesthésie générale. L'induction de l'anesthésie est réalisée en cage d'induction à l'isoflurane (0,6 L d'O<sub>2</sub>/min, 4% d'isoflurane, Forene, solution pour inhalation), puis l'entretien est assuré au masque (0,6 L d'O<sub>2</sub>/min, 2% d'isoflurane).

L'analgésie peropératoire est assurée par une injection de 1 mg/kg de nalbuphine (Nalbuphine MYLAN, solution injectable) par voie sous-cutanée. L'animal est tondu largement au niveau de la zone opératoire, entre la jonction thoraco-lombaire et le sacrum, sur les deux flancs de l'animal et la zone opératoire est désinfectée.

#### **Mode opératoire**

La peau est incisée au niveau du flanc, environ 0,5 cm caudalement à la dernière côte, sur 1 cm. Le tissu sous-cutané et les parois musculaires sont dilacérés délicatement jusqu'à la cavité abdominale. L'ovaire, qui est situé dans le tissu adipeux sous-jacent à l'incision, est extériorisé. Deux ligatures sont posées à l'aide de fil tressé résorbable (Vicryl® 3.0, Ethicon / Johnson & Johnson, Bruxelles), de part et d'autres de l'ovaire, et l'exérèse est réalisée. Les plans musculaires et sous-cutanés sont suturés avec du Vicryl® 3.0. La peau est suturée avec un monofil irrésorbable (Dafilon® 3.0, B.Braun, Melsungen, Allemagne) après infiltration par lidocaïne 1 % dans les plans musculaires. Le même protocole opératoire est réalisé pour l'ovaire controlatéral. Pour une opération Sham, les ovaires sont extériorisés de la paroi abdominale, puis replacés dans l'animal, avant de suturer les différents plans de la même manière que pour une ovariectomie.

## Suivi post-opératoire

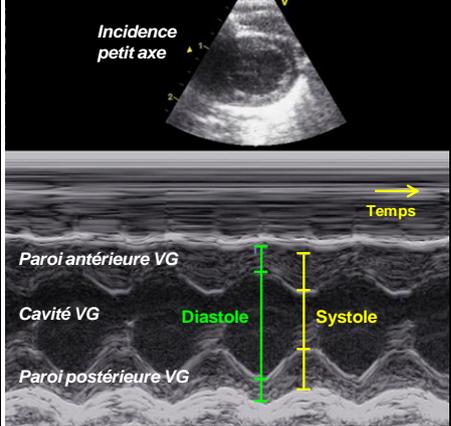
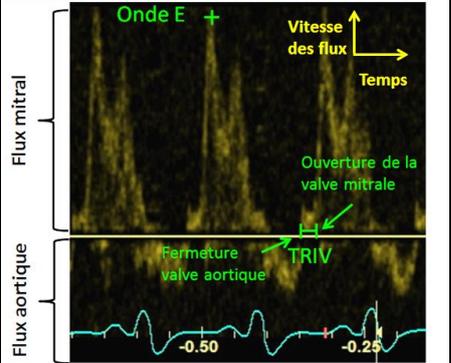
Pendant les 3 jours qui suivent l'opération, les rates opérées reçoivent  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  de nalbuphine par voie sous cutanée une fois par jour. Elles sont également traitées quotidiennement pendant une semaine avec de l'ibuprofène ( $35 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ , *per os*) : le traitement est dilué dans l'eau de boisson (eau distillée) à raison d'une consommation de 30 mL d'eau par rat et par jour associée à une nourriture sèche (soit une dose d'ibuprofène de  $0.35 \text{ mg.mL}^{-1}$ ).

## 4. Echocardiographie

Les mesures échographiques sont acquises par la plateforme Cardiex avec une station d'acquisition General Electric Vivid 7 (GE Healthcare, Horten, Norvège), équipée d'une sonde d'imagerie sectorielle 10 S (4 à 11,5 MHz), puis sont transférées vers une station d'analyse (Echopac TVI, GE-Vingmed Ultrasound, Etats-Unis) pour être exploitées.

L'animal est anesthésié par anesthésie volatile (induction en cage à induction, à l'aide d'un mélange air/isoflurane 4%, puis entretien au masque avec un mélange air/isoflurane 2%), il est placé en décubitus dorsal sur un tapis chauffant. Un enregistrement ECG est réalisé durant toute la durée de l'acquisition. Le thorax de l'animal est rasé et recouvert avec du gel ultrasons (Aquasonic® 100, Parker Laboratories, Fairfield, USA). Différentes mesures échocardiographiques sont réalisées selon une incidence parasternale (coupes petit axe et grand axe), en mode bidimensionnel puis en mode temps-mouvement. Ces mesures permettent de déterminer différents paramètres caractéristiques de la morphologie cardiaque (diamètres et épaisseurs des parois du VG) et de la fonction systolique (fraction d'éjection et fraction de raccourcissement du VG). La fonction diastolique est évaluée en Doppler pulsé et tissulaire. L'ensemble des paramètres étudiés lors des différentes acquisitions est résumé dans le tableau suivant (Tableau 7).

**Tableau 7. Paramètres échographiques du VG mesurés dans l'étude**

	Paramètres	Abrev.	Fonction analysée	Illustration
Echocardiographie	Épaisseurs des parois en télésystole et télédiastole (cm)	Paroi antérieure PATD PATS  Paroi postérieure PPTD PPTS	<b>Morphologie</b> et remodelage du VG  (par calcul, obtention des paramètres de la <b>fonction systolique</b> )	
	Diamètres télésystolique et télédiastolique (cm)	DTD DTS		
	Volumes télésystolique et télédiastolique (cm <sup>3</sup> )	VTD VTS		
Doppler pulsé	Vitesse de l'onde E (cm.s <sup>-1</sup> )	E	Remplissage passif VG ( <b>fonction diastolique</b> + pression de remplissage VG)	
	Temps de relaxation isovolumique (s)	TRIV	Délai entre la fermeture de la valve aortique et l'ouverture de la valve mitrale ( <b>fonction diastolique</b> )	

Fraction d'éjection (FE) = (VTD-VTS)/VTD

## 5. Mesure de la pression ventriculaire gauche

La mesure des pressions ventriculaires ont été réalisées *in vivo*. Sur un animal anesthésié à l'isoflurane comme décrit précédemment, un cathéter (SPR 838 taille 2F, *Millar Instruments*)

est introduit dans la carotide droite, puis poussé jusque dans le VG. L'évolution des pressions et des volumes du VG est alors enregistrée au cours du cycle cardiaque. Cette technique permet l'évaluation de nombreux paramètres cardiaques (pressions et volume) et vasculaires (pression) *in vivo*. Les paramètres mesurés dans l'étude sont présentés dans le Tableau 8.

**Tableau 8. Paramètres évalués par cathétérisme**

	Paramètres	Abréviation
Au niveau de l'artère carotide	Pression artérielle systolique (mmHg)	PAS
	Pression artérielle diastolique (mmHg)	PAD
	Pression artérielle moyenne (mmHg)	PAM *
Au niveau du VG	Pression télédiastolique du VG	PTDVG

$$* \text{ PAM} = \frac{2}{3}\text{PAD} + \frac{1}{3} \text{ PAS}$$

## 6. Cœur isolé perfusé en mode travaillant

Les rats sont préalablement anesthésiés au pentobarbital sodique (Dolethal®, Vetoquinol, Paris, France, 60 mg/kg) puis héparinés (1000UI/kg) par voie intrapéritonéale (IP), afin d'éviter la formation de microthrombi qui pourraient obstruer les artères coronaires et compromettre la viabilité du cœur ainsi isolé. Lorsque les rats ont atteint un niveau d'anesthésie suffisamment profonde, l'abdomen et le thorax sont badigeonnés d'alcool à 70%. La peau, puis les muscles de l'abdomen sont incisés sous la coupole diaphragmatique. Le diaphragme est percé, et, à compter du moment où le vide pleural est rompu, la cavité thoracique est aspergée de NaCl 0.09% refroidi à 4°C afin de ralentir le cœur, et de limiter les effets de l'ischémie cardiaque transitoire inhérente au prélèvement. Les côtes sont sectionnées, et le plastron thoracique est relevé. L'aorte est alors rapidement cannulée *in vivo* et le cœur perfusé de

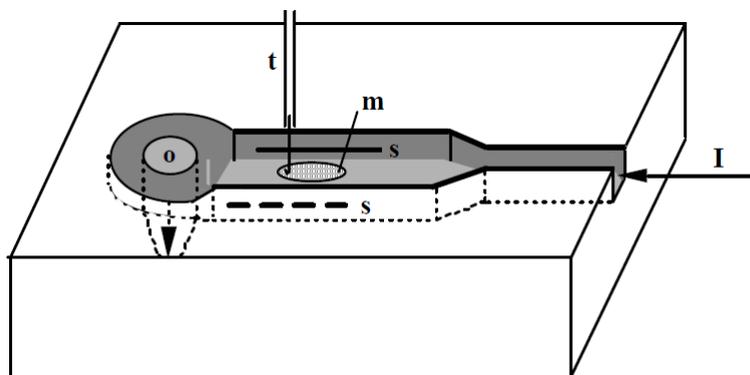
manière rétrograde avec du liquide cardioplégique (Celsior®), afin d'arrêter complètement les contractions cardiaques. Le cœur est alors excisé, et monté en mode Langendorff sur le montage, où il est perfusé à une pression de 80 mmHg avec une solution oxygénée de Krebs modifié (NaCl 116 mM, KCl 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.1 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.35 mM, NaHCO<sub>3</sub> 27 mM, Glucose 10 mM, Pyruvate 0.2 mM, Lactate 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM). Les éventuels tissus excédentaires prélevés en même temps que le cœur (tissu adipeux, poumon, trachée...) sont délicatement retirés, et les veines pulmonaires sont isolées. Une fois l'accès aux veines pulmonaires dégagé, un tuyau de polyéthylène (PE50) est inséré par celles-ci, introduit dans le VG sans léser les valves mitrales, et passé au travers de l'apex. Il est alors relié à un capteur de pression (ArgoTrans™ Transducers, Argon Medical Devices), permettant de suivre en temps réel l'évolution des pressions ventriculaires. Enfin, le tronc principal des veines pulmonaires est cannulé, et pour permettre une perfusion du cœur de manière physiologique : c'est-à-dire via les veines pulmonaires, avec une pression d'une valeur équivalente à la pression veineuse pulmonaire physiologique (12,5 mmHg). Dans cette conformation, le cœur doit également éjecter le liquide de perfusion contre une pression d'une valeur équivalente aux résistances périphériques physiologiques (80 mmHg). Pendant toute la durée des acquisitions, le débit cardiaque est mesuré par une sonde à l'entrée du cœur (T108 Transonic Volume Flow Meter, Transonic system) et le débit aortique par la pompe calibrée du montage. Le débit coronaire est calculé comme étant la différence entre le débit cardiaque et le débit aortique.

## **7. Contractilité des muscles papillaires**

L'ensemble des manipulations ont été réalisées en collaboration avec Morteza Erfanian, technicien dans l'équipe. Cette technique permet d'étudier la contractilité de muscles papillaires placés dans une cuve expérimentale (Figure 14). Après le prélèvement des deux muscles papillaires du VG, un prétraitement au Triton X-100 (*Sigma-Aldrich*) à 0,5% est appliqué pendant 3s, permettant l'abrasion de l'endothélium est réalisé dans certains protocoles. La cuve expérimentale consiste en une gouttière (20 x 8 x 8 mm) fraisée dans un bloc de Plexiglas où s'écoule une solution physiologique (Composition en mM : NaCl 116 ; KCl 5 ; MgCl<sub>2</sub> 1,1 ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,35 ; NaHCO<sub>3</sub> 27 ; glucose 5 ; CaCl<sub>2</sub> 2,7 ; Acide pyruvique 5 ; Acide fumarique 0,15 ; Acide glutamique 5). La préparation est fixée par l'une des extrémités au fond de la cuve, à

l'aide d'une minutie. L'autre extrémité est fixée par une autre minutie reliée à un transducteur mécano-électrique (*Akers, AE, Sen Sonor, Norvège*). La solution physiologique est carbogénée avec un mélange 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> et perfusée à 37±0,5°C à l'aide d'une pompe péristaltique à un débit de 5 mL/min (Figure 14).

Les préparations sont stimulées à l'aide d'un stimulateur cardiaque (*Medtronic inc., Minneapolis, USA*) par l'intermédiaire de deux électrodes de platine fixées sur les parois latérales de la cuve (stimulation de champ). La fréquence de stimulation est de 1 Hz. La durée des stimuli est de 2 à 4 ms et leur intensité fixée à deux fois celle du seuil de stimulation de la préparation. La contraction est mesurée à l'aide du transducteur mécano-électrique (*Ackes AE 801, SensoNor, Horten, Norvège*) qui transforme la réponse mécanique de la préparation en un phénomène électrique quantifiable. Elle est recueillie sur un enregistreur thermique (*Gould 8188, Les Ulis, France*) et sur un enregistreur numérique (*DTR-1200, Bio-Logic, Claix, France*). Les paramètres de contractions sont mesurés sur un oscilloscope numérique (*HMO1024, HAMEG Instruments, Mainhausen, Germany*).



**Figure 14. Représentation schématique de la cuve expérimentale.** D'après (Gauthier *et al.*, 1994). I : arrivée des solutions ; m : minutie ; o : évacuation des solutions ; s : électrode de stimulation ; t : transducteur mécano-électrique.

Chaque préparation est équilibrée avec la solution physiologique pendant 1 h avant le début de l'expérience. Une courbe tension-longueur est alors réalisée. Les expériences sont effectuées à 90% de la tension maximale. Les agents pharmacologiques testés sont ajoutés à la solution physiologique (Tableau 9). Des courbes concentrations-réponses cumulatives sont

réalisées en perfusant la préparation avec des concentrations croissantes d'agoniste. Après l'obtention d'un état stable, la concentration supérieure est perfusée.

L'amplitude de la contraction est mesurée au pic après l'obtention d'un état stable. Elle est exprimée en pourcentage de l'amplitude obtenue à l'état basal. Le temps au pic et la durée totale, contraction plus relaxation, sont exprimés en ms. Les temps de demi-contraction et de demi-relaxation sont également mesurés et les rapports amplitude de contraction/temps de demi-contraction et amplitude de contraction/temps de demi-relaxation donnent respectivement la vitesse de contraction et la vitesse relaxation. Elles sont exprimées en pourcentage de la vitesse obtenue à l'état basal.

**Tableau 9. Substances pharmacologiques employées dans les protocoles de contraction des muscles papillaires.**

Molécules	Propriétés pharmacologiques	Solvant	Temps de prétraitement	Fournisseur
Isoprénaline	Agoniste $\beta$ -AR non sélectif	Acide ascorbique 1%	-	Sigma-Aldrich
SR 58611A	Agoniste $\beta_3$ -AR	H <sub>2</sub> O	-	Sanofi Aventis
CGP 20712A	Antagoniste $\beta_1$ -AR	H <sub>2</sub> O	30 min	Sigma-Aldrich
ICI-118,551	Antagoniste $\beta_2$ -AR	H <sub>2</sub> O	30 min	Tocris Biosciences

## 8. Analyses histologiques

La réalisation et l'analyse des coupes ont été réalisées en collaboration avec Virginie Aillerie, technicienne dans l'équipe.

## **8.1.Fibrose cardiaque**

Après excision, les fragments de cœurs sont rincés dans une solution physiologique, inclus dans de la résine OCT (Tissue-Tek, Sakura), et immédiatement plongés dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide. Des coupes de 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont réalisées transversalement dans le cœur à l'aide d'un cryotome (HM530, Microm Microtech France, France), et fixées sur lame.

Les coupes sont alors fixées dans de l'acétone (Acetone, Sigma-Aldrich, #34850) refroidi à 4°C colorées 1h dans du rouge de picrosirius (20 g d'acide picrique + 1 g de Rouge Sirius dans 1 L d'eau distillée, pH 2,0). Puis elles sont décolorées pendant 2 minutes dans de l'acide chlorhydrique 0,01 N, et déshydratées dans des bains à concentrations d'éthanol croissantes, puis du xylène. Les sections de cœurs sont alors analysées par microscopie photonique (Nikon Eclipse E-600 microscope avec NIS-Elements BR v4.10 Software, Nikon, Japan), sous lumière polarisée (polariseur MBB75350, Nikon, Japan). Cette technique, décrite par Puchtler et al. (1973), permet de visualiser le collagène de type I en rouge, et le collagène de type III en vert.

Une évaluation de la quantité de fibrose sur les images obtenues est réalisée à l'aide du logiciel ImageJ software 1.45b (NIH Software) en double aveugle, sur 20 clichés par animal.

## **8.2.Glomérulosclérose rénale**

Le rein gauche, après avoir été prélevé, est fixé 24h minimum dans du formol 4% avant de réaliser l'inclusion dans la paraffine. L'inclusion est réalisée par un processeur de tissu STP120 (*Thermo scientific*, Asnières/Seine, France) selon le protocole indiqué dans le Tableau 10.

**Tableau 10. Protocole d'inclusion en paraffine des reins et des poumons de rat**

Étapes	Réactifs	Durée	Vitesse d'agitation
1-2	Formol	2 x 1h00	60
3	Alcool 70%	1h30	70
4	Alcool 80%	1h30	70
5	Alcool 95%	1h30	70
6-8	Alcool 100%	3 x 1h00	70
9-10	Xylol	2 x 1h30	70
11-12	Paraffine	2 x 2h00	60

Une fois inclus, des coupes de 7 µm d'épaisseur sont réalisées, et déposées sur des lames porte-objet. Les coupes sont déparaffinées avec du Tissue-clear (Sakura, Tissue-tek, #1466), et réhydratées par des bains successifs d'éthanol de 100% à 70%, pour enfin être rincées avec de l'eau distillée. Les lames sont alors colorées 5 minutes avec de l'acide périodique (Sigma-Aldrich, #395-1), puis 15 minutes avec du réactif de Schiff (Sigma-Aldrich, #395-2), et 30 minutes avec de l'hématoxyline (Gill n°3 hematoxylin). Après coloration, les coupes sont à nouveau déshydratées, rincées avec du TissueClear, et montées entre lame et lamelle.

Le score glomérulaire est calculé selon la méthode décrite par Raij et al. (1984) [230]. Pour chaque animal, 20 glomérules sont évalués selon des critères morphologiques, et notés avec une note entre 0 (glomérule sain) et 4 (glomérule non fonctionnel). L'ensemble de ces notes est compilée dans la formule suivante :

$$\text{Score glomérulaire} = \left( \frac{1 * \text{nombre de glomérules noté 1}}{20} + \frac{2 * \text{nombre de glomérules noté 2}}{20} + \dots \right) * 10$$

Le score ainsi obtenu évalue le degré de dommages glomérulaires pour chaque animal.

### 8.3. Hypertension artérielle pulmonaire

Le poumon gauche, après avoir été prélevé, et fixé en perfusant par la bronche principal une solution de formol 4%. Les poumons sont ensuite plongés 24h minimum dans du formol 4%, et inclus, et les sections coupées selon la méthode décrite au paragraphe 8.2. Les sections obtenues sont déparaffinées avec du Tissue-clear (Sakura, Tissue-tek, #1466), et réhydratées par des bains successifs d'éthanol de 100% à 70%, pour enfin être rincées avec de l'eau distillée. Les lames sont alors colorées 15 minutes avec de l'orcéine (Sigma-Aldrich, #395-1). Après coloration, les coupes sont à nouveau déshydratées, rincées avec du TissueClear, et montées entre lame et lamelle. Le remodelage des artérioles pulmonaires est évalué sur 20 artérioles de 60 µm de diamètre par rat. Pour chaque artériole sélectionnée, l'aire totale du vaisseau et l'aire de sa lumière sont quantifiées, afin de calculer le pourcentage d'aire de la média, selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'aire de la média} = 1 - \frac{\text{Aire de la lumière artériolaire}}{\text{Aire totale de l'artériole}}$$

## 9. RT-PCR quantitatives

Les RT-PCR quantitatives ont été réalisées sur des extraits de VG. Brièvement, après excision du cœur, le VG est séparé du reste du cœur, et plongé dans de l'azote liquide. Les morceaux de cœurs congelés sont ensuite réduits en poudre et les ARN totaux sont extraits dans une préparation à base de phénol/chloroforme (TRIzol® Reagent, Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) grâce au TissueLyser (Qiagen, Valencia, Canada). Pour éviter que les préparations soient contaminées avec de l'ADN génomique, une digestion avec une DNase est réalisée grâce aux kits RNase-Free DNase et RNeasy Fibrous Tissue kit (Qiagen, Valencia, Canada). Les extraits d'ARN sont ensuite convertis en ADNc grâce au kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, Foster City, Calif), puis la quantification des ARN des récepteurs  $\beta_1$ -AR,  $\beta_2$ -AR et  $\beta_3$ -AR est ensuite réalisée grâce à des sondes Taqman (rat

adrb1 : Rn00824536\_s1 ; rat adrb2 : Rn00560650\_s1 ; rat adrb3 : Rn00565393\_m1 ; human adbr3 : Hs00609046\_m1 ; ThermoFisher Scientific,

## 10. Western Blot

Pour étudier les variations d'expression des protéines du cycle du calcium, des western blot sont réalisés sur des extraits protéiques des VG. L'extraction protéique est réalisée par un broyage au TissueLyser®, à partir d'une poudre grossière de VG, dans un tampon Ripa à raison de 3 mL de Ripa pour 1 g de tissu, additionné de PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride, un inhibiteur de protéases à sérine, Interchim, Montluçon, France) et d'un mélange d'inhibiteur de protéases (Complete, Roche, Mannheim, Allemagne). Après 30 min sur glace, les broyats sont centrifugés à 20 000 g pendant 15 min à 4°C. Les surnageants sont récupérés et un dosage protéique est réalisé grâce au réactif BCA (BCA protein assay kit, Thermo Fisher Scientific, Rockford, Etats-Unis) par lecture en spectrophotométrie à une longueur d'onde de 560 nm. Les échantillons protéiques (25 µg/10 µL), en présence de tampon de Laemmli (bleu de charge ; 1/5 DTT) sont dénaturés selon différentes conditions en fonction de la protéine étudiée (Tableau 9) et sont ensuite déposés sur un gel d'électrophorèse (polyacrylamide/SDS) composé d'une partie de concentration à 4% d'acrylamide et d'une partie de résolution à pourcentage d'acrylamide variable selon la taille de la protéine étudiée. La migration se fait pendant environ 1h30 à voltage constant (100 V).

Les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose par la technologie de « transfert turbo » de Bio-Rad (2,5 A, 2,5 V, pendant 10 minutes). Les interactions protéines-protéines non spécifiques sont bloquées sur les membranes par une solution de lait écrémé 5 % dilué dans du TBS (Trizma base 200 mM ; NaCl 1,4 M ; pH = 7,5 ; Sigma-Aldrich) additionné de 0,1 % de Tween 20 (Sigma-Aldrich ; TBS-T) pendant 2 heures à température ambiante. L'anticorps primaire est incubé toute la nuit à 4°C. Après 3 lavages de 10 min avec du TBS-T, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Puis la membrane est lavée 2 fois pendant 10 minutes dans du TBS-T, puis une fois dans du TBS. Les caractéristiques et les conditions d'utilisation des différents anticorps sont présentées dans le Tableau 11. La révélation des blots est réalisée avec un processus de détection de chimiluminescence (Clarity™ Western ECL Substrate, Bio-Rad, Hercules, Etats-Unis). Le

signal est enregistré grâce à une caméra (Chemidoc Imager, Bio-Rad) et l'intensité des bandes est évaluée par densitométrie grâce au logiciel d'analyse Image Lab 3.0 (Bio Rad). La mise en évidence de la protéine de référence (GAPDH) est réalisée sur la même membrane que la protéine d'intérêt. Pour chaque puits, la densité de la bande de la protéine d'intérêt est rapportée à celle de la protéine de référence.

**Tableau 11 : Conditions de réalisation des western blot.**

Protéine étudiée	Température et durée de dénaturation	% Gel	Anticorps primaire	Conditions d'utilisation	Anticorps secondaire	Conditions d'utilisation
RyR2	60 °C 5 min	4-15%	Ab2817 (Abcam)	1/2500, TBS-T + lait 2,5% 12h à 4°C	Goat anti-mouse IgG-HRP sc2055 (Santa Cruz)	1/10 000, 1h à TA
RyR2 phosphorylé (sérine 2808)	Non dénaturée	4-15%	A010-30 (Badrilla)	1/5 000 TBS-T + lait 1% 12h à 4°C	Goat anti-rabbit IgG-HRP sc2054 (Santa-Cruz)	1/10 000, 1h à TA
SERCA2a	Non dénaturée	10%	Ab2868 (Abcam)	1/5000 TBS-T + lait 1% 12h à 4°C	Goat anti-mouse IgG-HRP sc2055 (Santa Cruz)	1/10 000, 1h à TA
PLB	Non dénaturée	15%	Ab2865 (Abcam)	1/50000 TBS-T + lait 1% 12h à 4°C	Goat anti-mouse IgG-HRP sc2055 (Santa Cruz)	1/15 000, 1h à TA
PLB phosphorylé (sérine 16)	Non dénaturée	15%	A010-12 (Badrilla)	1/5 000 TBS-T + lait 1% 12h à 4°C	Goat anti-rabbit IgG-HRP sc2054 (Santa-Cruz)	1/10 000, 1h à TA
GAPDH			6C5, sc32233 (Santa-Cruz)	1/1 000 000, TBS-T + lait 1% 30 min à TA	Goat anti-mouse IgG-HRP sc2055 (Santa Cruz)	1/20 000, 1h à TA

TA : température ambiante

## 11. Analyse des résultats

Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM de n expériences. L'analyse statistique de paramètres quantitatifs sur deux groupes de moins de 10 individus a été réalisée avec un test de Mann-Whitney. Cette analyse a été utilisée pour les mesures de la

pression ventriculaire gauche, les paramètres de la fonction cardiaque la quantification des transcrits des récepteurs  $\beta$ -adrénergique, et l'ensemble des résultats de biologie clinique.

L'analyse statistique de paramètres quantitatifs sur plus de 2 groupes de moins de 10 individus a été réalisée avec une analyse de variance ANOVA à une voie. Cette analyse a concerné les mesures de la fonction cardiaque par échographie à 15, 30 et 45 semaines.

L'analyse statistique de mesures répétées en cœur isolé travaillant et en muscle papillaire a été calculée à l'aide d'une analyse de variance ANOVA à deux voies pour mesures répétées suivie d'un test de Student-Newman-Keuls.

Une valeur de  $p < 0,05$  est considérée comme significative. Tous les calculs statistiques et les graphiques ont été réalisés à l'aide du logiciel *Graphpad PRISM 5*.

# RESULTATS

## **1. Détermination du phénotype du modèle dans des conditions standards d'hébergement**

La première partie de mon projet de thèse a consisté à déterminer les meilleures conditions d'étude du modèle de rat transgénique, c'est-à-dire l'âge et le sexe des animaux. Compte-tenu de l'épidémiologie particulière de l'ICFEP, qui touche une part non négligeable de femmes âgées après la ménopause, il convient également d'étudier l'impact du statut hormonal des femelles utilisées dans l'étude, en pratiquant sur une partie d'entre-elles une ovariectomie. Il est important de préciser que cette première étude a été réalisée dans des conditions d'hébergement standards, et notamment avec un aliment couramment utilisé en animalerie de laboratoire, et riche en soja : le RM1 de SDS Diet.

### **1.1. Détermination du phénotype des femelles ovariectomisées ou non jusqu'à l'âge de 30 semaines.**

Dans une première partie, nous nous sommes d'abord intéressés au phénotype des femelles transgéniques, ovariectomisées ou non. Il est important de mentionner pour la bonne compréhension des résultats que cette première étude a été menée dans les conditions d'hébergement habituelles de l'Unité de Thérapeutique Expérimentale de l'Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, et en particulier avec un aliment couramment utilisé dans les animaleries : l'aliment RM1 de SDS Diet. Cet aliment a été conçu pour couvrir les besoins d'entretiens de rongeurs de laboratoire au meilleur coût et a été formulé avec du soja, source courante de protéines dans l'alimentation animale.

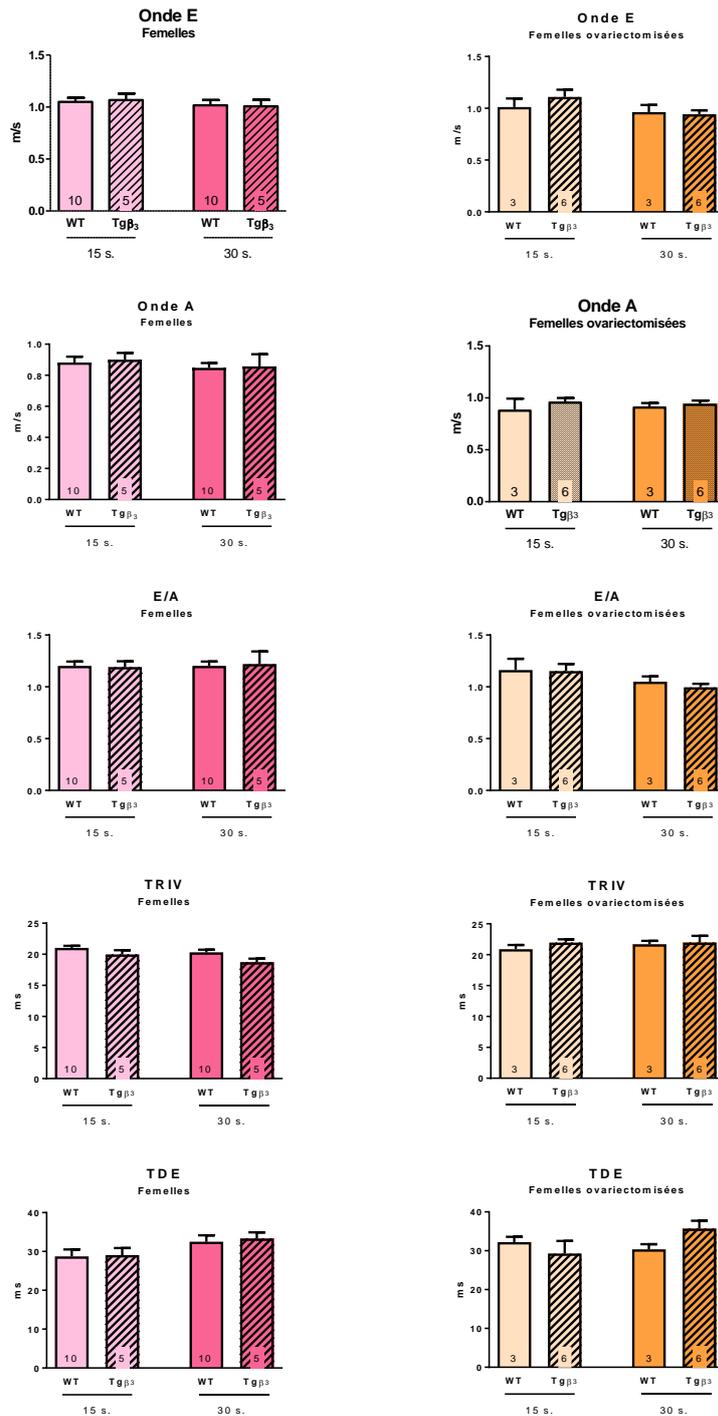
Dans cette première étude, l'âge limite d'observation des animaux a été fixé à 30 semaines. Au niveau du phénotype cardiaque, les échographies menées à 15 et 30 semaines ont montré que dans ces conditions, les animaux transgéniques ne présentaient pas de différence significative avec les animaux sauvages, que ce soit pour la morphologie cardiaque (Tableau

12), la fonction systolique (Tableau 12), ou la fonction diastolique (Figure 15). Toutefois, il convient de pondérer ces résultats par rapport à l'âge des animaux. En effet, l'ICFEP est une maladie de la personne âgée, et, dans notre étude, l'âge de 30 semaines est probablement insuffisant pour observer un effet.

On peut également observer que les femelles transgéniques non ovariectomisées ne présentent pas de différences morphologiques majeures avec les femelles sauvages, que ce soit au niveau du poids ou de la stature (mesure de la longueur du tibia). Cette absence de différence est aussi notée pour les femelles ovariectomisées (Tableau 12). Conformément à ce qui est déjà connu, les femelles ovariectomisées, transgéniques ou non, ont rapidement atteint un poids supérieur aux femelles sous imprégnation hormonale. En effet, les animaux étaient nourris *ad libitum*. Or, on sait que la perte de sécrétion en hormones sexuelles femelles induit chez les animaux une augmentation de la prise alimentaire, ainsi qu'une diminution du métabolisme de base [231], entraînant alors une prise de poids importante. Dans notre étude, les femelles transgéniques ovariectomisées n'ont pas montré de prise de poids significativement différente de celle des femelles sauvages après la perte de leurs hormones sexuelles. Dans la littérature, le  $\beta_3$ -AR est connu pour stimuler la lipolyse dans le tissu adipeux, et la stimulation chronique du récepteur limite le développement de masse grasse chez les rats [232-234]. Toutefois, contrairement à notre modèle qui fait intervenir des récepteurs endothéliaux, les mécanismes impliqués dans le métabolisme font intervenir des  $\beta_3$ -AR adipocytaires, via une inhibition de la libération de la leptine [235, 236]. Dans le cadre de notre étude, on observe en effet que la surexpression endothéliale du  $\beta_3$ -AR n'a aucun effet sur la corpulence des animaux, suggérant que l'endothélium a peu d'impact sur le remodelage du tissu adipeux. Toutefois, des investigations supplémentaires sont nécessaires pour affirmer avec certitude ce dernier point.

**Tableau 12. Paramètres échographiques morphologiques et fonction systolique des femelles WT et Tgβ<sub>3</sub>, ovarietomisées ou non, nourries avec de l'aliment standard, à 15 et 30 semaines.**  
 PPVGd : paroi postérieure du VG en diastole ; PPVGs : paroi postérieure du VG en systole ; PAVGd : paroi antérieure du VG en diastole ; PAVGs : paroi antérieure du VG en systole ; SIVd : septum interventriculaire en diastole ; SIVs : septum interventriculaire en systole ; VGd : diamètre du VG en diastole, VGs : diamètre du VG en systole.

Paramètres	Femelles				Femelles ovarietomisées			
	15 semaines		30 semaines		15 semaines		30 semaines	
	WT (n=10)	Tgβ <sub>3</sub> (n=5)	WT (n=10)	Tgβ <sub>3</sub> (n=5)	WT (n=3)	Tgβ <sub>3</sub> (n=6)	WT (n=3)	Tgβ <sub>3</sub> (n=6)
<b>Poids (g)</b>	319 ± 4	315 ± 10	362 ± 6	364 ± 14	411 ± 1 <sup>§</sup>	380 ± 11	498 ± 12 <sup>§</sup>	433 ± 16
<b>Tibia (mm)</b>	51,5 ± 0,2	51,9 ± 0,9	53,3 ± 0,4	53,3 ± 0,5	53,6 ± 1,0	52,9 ± 0,6	55,5 ± 0,9	53,8 ± 0,4
<b>Fréquence (bpm)</b>	395 ± 9	401 ± 13	393 ± 8	387 ± 18	358 ± 5	386 ± 16	378 ± 15	372 ± 9
<b>Morphologie cardiaque</b>								
<i>Parois du VG</i>								
PPVGd (mm)	1,559 ± 0,036	1,603 ± 0,033	1,557 ± 0,047	1,641 ± 0,031	1,646 ± 0,091	1,656 ± 0,070	1,594 ± 0,076	1,607 ± 0,111
PPVGs(mm)	2,666 ± 0,100	2,652 ± 0,092	2,593 ± 0,123	2,669 ± 0,157	2,713 ± 0,219	2,781 ± 0,070	2,332 ± 0,075	2,439 ± 0,112
PAVGd (mm)	1,574 ± 0,039	1,588 ± 0,048	1,578 ± 0,039	1,618 ± 0,038	1,622 ± 0,028	1,659 ± 0,054	1,562 ± 0,042	1,596 ± 0,062
PAVGs (mm)	2,254 ± 0,051	2,258 ± 0,023	2,198 ± 0,049	2,192 ± 0,037	2,408 ± 0,098	2,135 ± 0,051	2,269 ± 0,019	2,227 ± 0,049
SIVd (mm)	1,547 ± 0,028	1,614 ± 0,042	1,561 ± 0,031	1,565 ± 0,059	1,538 ± 0,079	1,569 ± 0,038	1,640 ± 0,025	1,462 ± 0,065
SIVs(mm)	2,236 ± 0,040	2,214 ± 0,032	2,158 ± 0,041	2,166 ± 0,074	2,236 ± 0,040	2,121 ± 0,057	2,330 ± 0,074	2,141 ± 0,070
<i>Diamètres du VG</i>								
VGd (mm)	6,484 ± 0,114	6,470 ± 0,290	6,865 ± 0,156	6,783 ± 0,164	7,382 ± 0,233	6,415 ± 0,141	7,389 ± 0,707	7,145 ± 0,069
VGs (mm)	3,154 ± 0,187	3,827 ± 0,202	3,779 ± 0,104	3,768 ± 0,142	4,118 ± 0,387	3,419 ± 0,172	4,732 ± 0,565	4,071 ± 0,084
<b>Fonction systolique</b>								
Fraction d'éjection (%)	81,8 ± 2,1	78,2 ± 1,8	80,9 ± 1,4	80,7 ± 1,9	80,4 ± 3,6	83,1 ± 1,8	71,7 ± 2,1	79,2 ± 1,4



**Figure 15. Paramètres échographiques diastoliques des femelles WT et Tgβ<sub>3</sub>, ovariectomisées ou non, nourries avec de l'aliment standard, à 15 et 30 semaines.**

Onde E : vitesse maximale de l'onde de remplissage précoce du VG ; Onde A : vitesse maximale de l'onde de remplissage atrial du VG ; E/A : ratio de l'onde E sur l'onde A ; TR IV : temps de relaxation isovolémique ; TDE : temps de décélération de l'onde E.

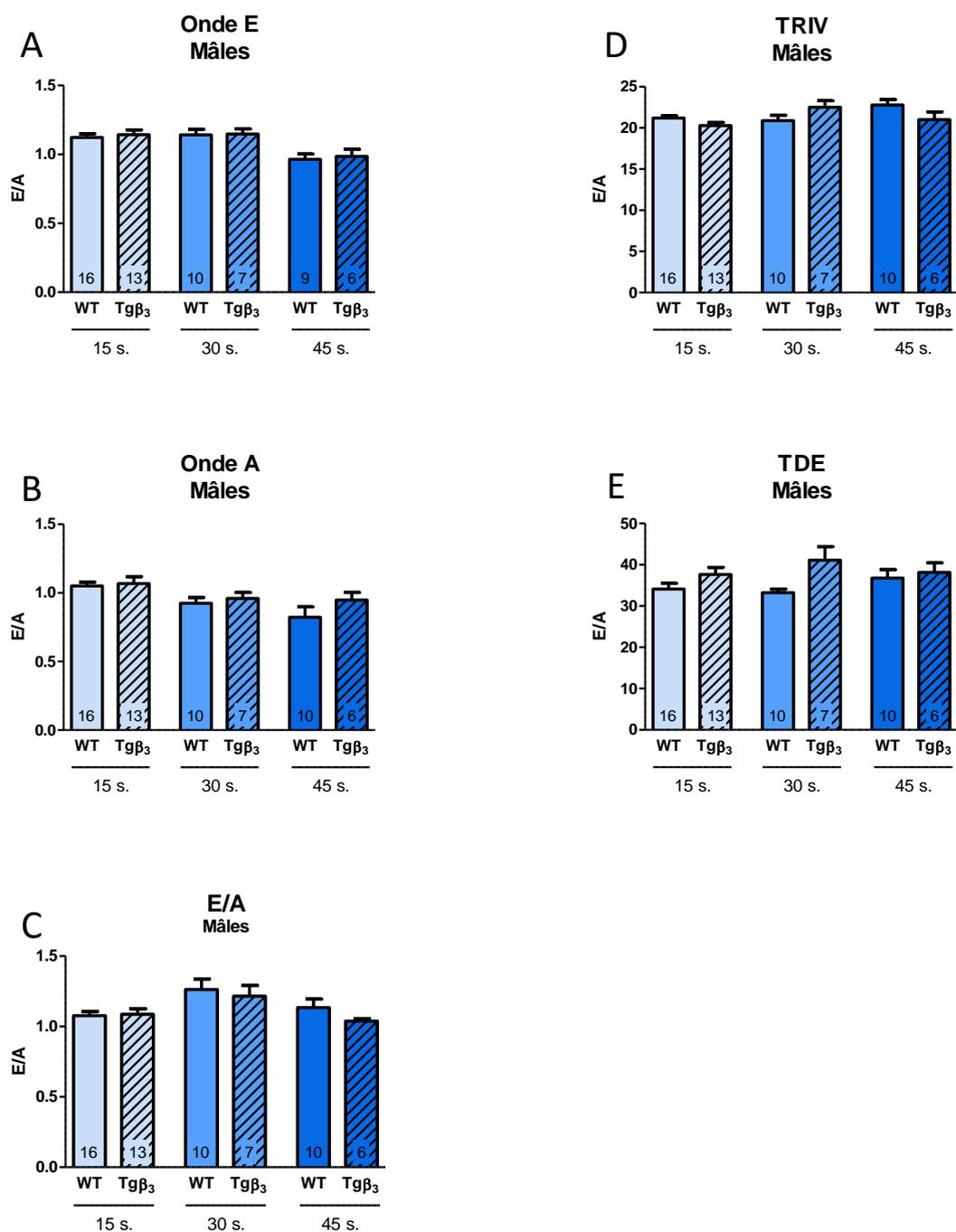
## 1.2. Détermination du phénotype des mâles jusqu'à l'âge de 45 semaines

Parallèlement aux études menées sur les femelles exposées dans le point précédent, les mêmes manipulations ont été réalisées sur les mâles sauvages et transgéniques. Au niveau du phénotype cardiaque, l'étude échocardiographique révèle que les rats transgéniques présentent une morphologie similaire aux rats sauvages, que cela soit en termes de paroi, ou de volume (Tableau 13). La fraction d'éjection, ainsi que les différents paramètres de la fonction diastolique ne sont pas significativement différents entre les animaux sauvages et transgéniques à 15, 30 et 45 semaines (Tableau 13, Figure 16). De plus, comme observé chez les femelles, les rats mâles sauvages et transgéniques ne présentent pas de morphologie significativement différente, tant au niveau du poids qu'au niveau de la taille.

**Tableau 13. Paramètres échographiques des mâles WT et Tgβ<sub>3</sub> nourris avec de l'aliment standard à 15, 30 et 45 semaines.**

PPVGd : paroi postérieure du VG en diastole ; PPVGs : paroi postérieure du VG en systole ; PAVGd : paroi antérieure du VG en diastole ; PAVGs : paroi antérieure du VG en systole ; SIVd : septum interventriculaire en diastole ; SIVs : septum interventriculaire en systole ; VGd : diamètre du VG en diastole, VGs : diamètre du VG en systole.

Paramètres	15 semaines		30 semaines		45 semaines	
	WT (n=16)	Tgβ <sub>3</sub> (n=13)	WT (n=10)	Tgβ <sub>3</sub> (n=7)	WT (n=12)	Tgβ <sub>3</sub> (n=7)
Poids (g)	520 ± 14	517 ± 9	643 ± 23	639 ± 16	732 ± 26	720 ± 17
Tibia (mm)	57,4 ± 0,5	55,9 ± 0,5	60,5 ± 0,4	60,8 ± 0,7	61,9 ± 1,2	62,3 ± 0,8
Fréquence (bpm)	378 ± 3	373 ± 8	359 ± 10	332 ± 11	339 ± 9	353 ± 7
<b>Morphologie cardiaque</b>						
<i>Parois du VG</i>						
PPVGd (mm)	1,704 ± 0,038	1,744 ± 0,06	1,779 ± 0,048	1,787 ± 0,05	2,032 ± 0,065	1,918 ± 0,089
PPVGs (mm)	2,678 ± 0,038	2,840 ± 0,107	2,841 ± 0,079	2,950 ± 0,111	2,901 ± 0,065	2,853 ± 0,089
PAVGd (mm)	1,803 ± 0,039	1,705 ± 0,022	1,817 ± 0,043	1,907 ± 0,099	1,789 ± 0,043	1,690 ± 0,067
PAVGs (mm)	2,477 ± 0,041	2,385 ± 0,033	2,446 ± 0,047	2,502 ± 0,047	3,093 ± 0,053	3,081 ± 0,086
SIVd (mm)	1,742 ± 0,029	1,680 ± 0,028	1,885 ± 0,807	1,807 ± 0,065	1,753 ± 0,062	1,664 ± 0,049
SIVs (mm)	2,413 ± 0,037	2,346 ± 0,046	2,491 ± 0,66	2,506 ± 0,057	2,918 ± 0,101	2,924 ± 0,105
<i>Diamètres du VG</i>						
VGd (mm)	7,604 ± 0,178	7,588 ± 0,146	8,061 ± 0,117	8,398 ± 0,166	8,387 ± 0,146	8,440 ± 0,218
VGs (mm)	4,456 ± 0,107	4,366 ± 0,121	4,657 ± 0,122	4,712 ± 0,199	5,119 ± 0,180	5,042 ± 0,203
<b>Fonction systolique</b>						
Fraction d'éjection (%)	78,4 ± 0,1	78,6 ± 0,1	78,1 ± 0,01	79,8 ± 0,02	74,3 ± 1,7	76,1 ± 1,5



**Figure 16. Paramètres échographiques diastoliques des mâles WT et Tgβ<sub>3</sub> nourris avec de l'aliment standard, à 15, 30 et 45 semaines.**

Onde E : vitesse maximale de l'onde de remplissage précoce du VG ; Onde A : vitesse maximale de l'onde de remplissage atrial du VG ; E/A : ratio de l'onde E sur l'onde A ; TRIV : temps de relaxation isovolumique ; TDE : temps de décélération de l'onde E.

### **1.3. Limites de l'étude des rats dans des conditions d'hébergement standard**

Ces premiers résultats sur les mâles et les femelles WT et Tg $\beta_3$ , ovariectomisées ou non, nous indiquent que les animaux transgéniques ont un phénotype tout à fait similaire aux animaux sauvages, indifféremment de leur sexe ou de leur statut hormonal. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène. Tout d'abord, il convient de considérer le fait que l'âge de 30 semaines pour les femelles, ou 45 semaines pour les mâles, est peut être un âge insuffisant, au regard du développement et de la physiopathologie de l'ICFEP.

De plus, une analyse des aliments consommés par les animaux a montré qu'ils contenaient une quantité non négligeable de daidzéine et de génistéine (40 et 60 ppm respectivement), deux phytoestrogènes naturellement présents dans le soja. Ce point en particulier s'est révélé critique, car les phytoestrogènes sont des analogues des estrogènes, et sont capables d'activer les récepteurs aux estrogènes au même titre que les hormones endogènes. L'effet protecteur des estrogènes sur le système cardiovasculaire est aujourd'hui très bien documenté [237]. De nombreuses études ont déjà montré que ces hormones produisent un effet anti-apoptotique et anti-nécrotique sur les cardiomyocytes et les cellules endothéliales, qu'elles inhibent la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, et réduisent le développement de la fibrose et de la réponse inflammatoire [238]. Dans plusieurs modèles, elles atténuent l'hypertrophie cardiaque et les lésions d'ischémie reperfusion [239]. Les œstrogènes exercent leur action protectrice cardiovasculaire par des effets génomiques, en régulant l'expression de nombreux gènes (fibronectine, MMP-9, NOS, TNF...) [238], et des effets non génomiques en augmentant par exemple l'activité d'eNOS [240].

Des études se sont également intéressées à l'effet protecteur des phytoestrogènes. Dans divers modèles de pathologies cardiovasculaires, la consommation de génistéine et de daidzéine s'est révélée bénéfique. En 2015, Qin et al. ont ainsi montré dans un modèle murin de TAC que l'administration de phytoestrogènes améliorait la fonction cardiaque des animaux, réduisait la fibrose cardiaque et le taux de TGF $\beta$  [241]. Dans cette étude, ces effets protecteurs résultaient de l'activation de la voie MTA3/TAK1/MKK4/JNK. De même, si le modèle TAC détériore en

premier lieu la fonction cardiaque gauche, les phytoestrogènes ont également montré un effet protecteur dans un modèle de dysfonction droite par induction par la monocrotaline d'une HTAP conduisant à une amélioration de la fonction cardiaque droite des animaux, une réduction de la fibrose, et une augmentation de la densité capillaire [242]. De plus, Gardner et al. (2008) ont montré un effet protecteur des phytoestrogènes dans un modèle de surcharge en volume, ainsi que l'existence d'une synergie entre les œstrogènes endogènes et les phytoestrogènes chez le rat [243].

## **2. Détermination du phénotype du modèle en l'absence de phytoestrogènes**

Au vu de ces éléments de la littérature et de nos résultats, la consommation quotidienne d'un aliment formulé à base de soja, et contenant une quantité non négligeable de phytoestrogènes est une limite majeure à notre étude. Ainsi, suite à cette première étude, une deuxième a été menée sur les mâles et les femelles (ovariectomisées ou non), mais cette fois-ci avec un aliment conçu pour être pauvre en phytoestrogènes. Dans notre cas, nous avons opté pour l'aliment 2914C de Harlan. L'âge limite d'étude des animaux étant également suspecté d'être insuffisant, nous avons également allongé l'âge d'observation des animaux jusqu'à 45 semaines. Pour des raisons pratiques, et pour ne pas modifier la croissance en début de vie des animaux, il a été choisi, dans notre colonie, de garder l'aliment standard de notre lieu d'hébergement pour les rates gestantes de notre élevage, et les ratons sevrés jusqu'à l'âge de 8 semaines.

Cette deuxième étude a fait l'objet d'un article scientifique, actuellement en cours de soumission, présenté en annexe.

# **Transgenic rat model overexpressing endothelial $\beta_3$ -adrenoceptor: a new relevant model for heart failure with preserved ejection fraction**

**Valentine PRAT**<sup>1</sup>, **Marine FERRON**<sup>1</sup>, **David ROUL**<sup>1</sup>, **Damien GUIJARRO**<sup>2</sup>, **Nicolas PIRIOU**<sup>2</sup>,  
**Virginie AILLERIE**<sup>1</sup>, **Angélique ERRAUD**<sup>1</sup>, **Gilles TOUMANIANTZ**<sup>1</sup>, **Amandine GRABHERR**<sup>1</sup>,  
**Séverine MENOIRET**<sup>3,4,5</sup>, **Ignacio ANEGON**<sup>3,4</sup>, **Jean-Noël TROCHU**<sup>2</sup>, **Bertrand ROZEC**<sup>1,2</sup>,  
**Benjamin LAUZIER**<sup>1</sup>, **Chantal GAUTHIER**<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France

<sup>2</sup> l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, Nantes, France

<sup>3</sup> Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR1064, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France

<sup>4</sup> Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), CHU Nantes, Nantes, France

<sup>5</sup> CNRS, SFR de Nantes, Nantes, France

VP performed most of the experimental work; MF and DR helped for experimental work; DG, NP and AG helped for echographical experiments; VA performed histology; AE performed RT-PCR assays; GT, SM and IA generated the transgenic strain of rat; JNT, BR, BL and CG participated in study conception and design as well as data analysis and interpretation; VP, BR, BL and CG drafted the manuscript; All co-authors revised the final manuscript version.

**Short title:** New relevant model of HFpEF

**Disclosures:** None.

## **Funding**

This study was supported by « Agence Nationale de la Recherche » (Paris, France), « Fédération Française de Cardiologie » (Paris, France), « Fondation de l'Avenir » (Paris, France), « Fondation de France » (Paris, France), « Fondation Genavie » (Nantes, France), the « Institut national de la santé et de la recherche médicale » (Paris, France) and Fondation Progreffe (Nantes, France).

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

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

Submitted at JACC Heart Failure.

## **Abstract**

### **OBJECTIVES AND BACKGROUND**

Heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) is a growing health burden worldwide. The absence of accurate treatment for this disease is partly due to the limitations of the currently used animal models, which often rely on drastic hemodynamic alterations. The aim of our project was to characterize a new transgenic rat model (Tg $\beta_3$ ), which overexpresses the  $\beta_3$ -adrenoceptor ( $\beta_3$ -AR) at the endothelial level.

### **METHODS AND RESULTS**

WT and Tg $\beta_3$  rats were studied until the age of 45 weeks. They showed diffuse myocardial fibrosis without remodelling of native  $\beta$ -AR subtypes expression. Echocardiographical measurements revealed a progressive diastolic dysfunction with ageing in Tg $\beta_3$  rats, illustrated by a significant increase in early-to-late filing ratio (WT:  $1.15\pm 0.01$  vs. Tg $\beta_3$ :  $1.33\pm 0.04$ ;  $p<0.05$ ), without any impact on ejection fraction (WT:  $78.0\pm 1.5$  vs. Tg $\beta_3$ :  $77.8\pm 0.9\%$ ). No cardiac remodelling or arterial hypertension was reported in our model. In working heart studies, high level of preload was applied on Tg $\beta_3$  hearts to mimic a stress condition. This led to a 25% decrease of cardiac output, illustrating an inability of the Tg $\beta_3$  rats to adapt to preload variations (WT:  $79.0\pm 2.2$  vs. Tg $\beta_3$ :  $69.2\pm 2.6$  mL/min;  $p<0.05$ ).

### **CONCLUSIONS**

Our Tg $\beta_3$  rat model displayed a diastolic dysfunction phenotype with ageing, closely resembling the human HFpEF phenotype. According to our results, the Tg $\beta_3$  rat is an accurate model to better understand the complex pathophysiology of HFpEF and to identify new therapeutic targets.

**Key words:** HFpEF, endothelium, diastolic function, working heart,  $\beta_3$ -adrenoceptor, rat model

## Abbreviations

EDP: end diastolic pressure

HFpEF: heart failure with preserved ejection fraction

h $\beta_3$ -AR: human  $\beta_3$ -adrenoceptor

LV: left ventricle

Tg $\beta_3$ : transgenic rat overexpressing the human  $\beta_3$ -adrenoceptor in the endothelium

WT: wild-type

$\beta$ -AR:  $\beta$ -adrenoceptor

E/A: early-to-late filing ratio

ICAM2: intercellular adhesion molecule 2

dP/dt<sub>max/min</sub>: contraction/relaxation rate

## **Introduction**

Heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) is a health burden, whose prevalence dramatically increased over the past decades reaching 54% of total heart failure cases [1]. Patients are classically elderly people, with various comorbidities such as moderate arterial pressure, diabetes, obesity, atrial fibrillation or renal failure. Women represent 45% to 73% of the patients [2, 3], suggesting sex hormone loss could be a critical factor in HFpEF pathophysiology. A diastolic dysfunction pattern has been identified with elevated left ventricle (LV) stiffness, prolonged isovolumic LV relaxation, slow LV filling and elevated LV end diastolic pressure. In addition, several studies report the presence of myocardial fibrosis [4, 5]. Interestingly, stress or exercise exacerbates cardiac abnormalities, with a decrease in systolic and diastolic reserve, leading to exercise intolerance and cardiac decompensation [6, 7]. Until now, no treatment improves the survival of HFpEF patients. This lack of effective treatment could be explained by the fact that underlying mechanisms of HFpEF development are still poorly understood. One of the reasons is the lack of relevant animal models. Many animal models of HFpEF have been studied but they present a severe hypertension, develop HFpEF over a short period, and generally concern only males [8, 9].

While exploring the impact of  $\beta_3$ -adrenoceptor ( $\beta_3$ -AR) imbalance on myocardial function in a rat model overexpressing the human  $\beta_3$ -AR in the endothelial cells (Tg $\beta_3$ ), we identified a new model of HFpEF, which appears really close to human HFpEF and might represent a new opportunity to understand this pathology.

## **Material and methods**

### **Animal model**

The animal model of HFpEF is a transgenic rat (Tg $\beta_3$ ) which overexpresses h $\beta_3$ -AR in endothelial cells. It has been generated by microinjection in rat Sprague-Dawley zygotes of a linearized plasmid containing the h $\beta_3$ -AR cDNA under the control of the promoter for the endothelial cell-specific intercellular adhesion molecule-2 (ICAM-2), as previously described in detail [10]. ICAM-2 promoter led to an endothelium-specific expression of  $\beta_3$ -AR in all

blood vessels. All animal protocols were approved by the ethics committee in charge of animal experimentation of Pays de la Loire and were performed in accordance with French law on animal welfare, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, and the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Pub. No. 85-23, revised 2011). In function of protocols, male and/or female were investigated.

### **Echocardiography**

Echocardiography was performed on anesthetized rats at 15, 30 and 45 weeks of age, using a Vingmed-General Electric ultrasound system (VIVID 7, Horten, Norway) equipped with a 10 MHz imaging probe and off-line cine loop analysis software (Echopac TVI, GE-Vingmed Ultrasound) on the Therassay platform, as previously described [11].

### **Pressure measurements**

Rats were anaesthetized with isoflurane and O<sub>2</sub> under spontaneous ventilation (O<sub>2</sub> 1 L/min, 2%). Arterial and LV end diastolic pressure (EDP) were recorded using a pressure probe SPR 838 size 2F (Millar Instruments Inc., Houston, Texas) with IOX1.5.7 software (EMKA Technologies, Paris, France), as previously described [12].

### **Working heart studies**

Isolated working heart were perfused as described previously [13]. To mimic stress, two approaches were developed. Systolic function was challenged during increase in afterload from 60 to 140 mmHg, by 10 mmHg intervals. Diastolic function was challenged by increasing preload from 5 to 25 mmHg, by 5 mmHg intervals. Functional parameters were monitored continuously during the perfusion: 1) cardiac output and aortic flow, using calibrated electromagnetic flow probe (T108 Transonic Volume Flow Meter, Transonic system), 2) left ventricular contractile functions, using a pressure transducer (ArgoTrans™ Transducers, Argon Medical Devices) connected to a polyethylene (PE-50) catheter.

### **Tissue collection**

Rats were euthanized after LV pressure measurement. Hearts were divided transversally in two pieces. Apexes were embedded in OCT Compound (Tissue-Tek, Sakura) and immediately frozen in cold isopentane to perform histological analyses. LV, RV and septum of

heart bases were dissected and frozen in liquid nitrogen for further analysis. Aortas were gently removed and divided into two parts to study endothelial transcription of h $\beta$ <sub>3</sub>-AR gene: one part was directly snap-frozen in liquid nitrogen, the second part was snap-frozen after removal of the endothelium. Kidneys were harvested and fixed in 10% neutral buffered formalin. Right lung was harvested and fixed by infusion of formalin through the bronchi, prior to immersion in formalin solution.

### **Cardiomyocyte isolation**

Cardiomyocytes were isolated according to the technique described by Baudet et al. [14].

### **$\beta$ <sub>3</sub>-AR RT-qPCR**

Total RNA was extracted from heart powder and isolated cells of RT-PCR as previously describe [15]. To validate the endothelial expression of h $\beta$ <sub>3</sub>-AR, transcripts were detected using primers targeting human sequence (Supplemental data, Table 1) in aortas with or without endothelium. In order to verify the absence of h $\beta$ <sub>3</sub>-AR expression in cardiomyocytes, RT-PCR was also performed on isolated cardiomyocytes versus whole heart extracts. In heart extracts,  $\beta$ <sub>1</sub>-AR,  $\beta$ <sub>2</sub>-AR, and human and rat  $\beta$ <sub>3</sub>-AR transcripts were quantified by qRT-PCR using Taqman technology (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA).

### **Histology**

Fibrosis quantification has been done as previously described [16]. 40 and 20 images of the LV and septum respectively were taken at 200X magnification per animal and analysed by a blinded manipulator. The percent area of type I and type III collagen fibres were determined for each animal.

### **Statistical analysis**

Data are presented as mean  $\pm$ SEM. For the comparisons involving two groups of animals with n<10, group significance was defined using a Mann-Whitney test. For groups of 10 or more animals, a Student test was applied. In ex vivo studies, differences between repeated measurements were evaluated using a two way ANOVA with repeated measurements. P<0.05 was considered significant.

## Results

### **$\beta_3$ -AR is overexpressed in Tg $\beta_3$ rat endothelial cells without any modification of $\beta_1$ -AR and $\beta_2$ -AR**

The human  $\beta_3$ -AR cDNA was placed under the control of the ICAM2 promoter to ensure endothelial-specific expression and the DNA construct was microinjected in rat zygotes. Two newborns harboured the intact transgene and one of them served to generate the rat line used here. To confirm cardiac h $\beta_3$ -AR expression in our model, RT-qPCR analysis was conducted on h $\beta_3$ -AR transcripts in whole heart extract samples. Our assay showed a high level of mRNA of the inserted gene in Tg $\beta_3$  whole hearts, and absence of expression in WT hearts (Fig. 1A). Fig.

The presence of human  $\beta_3$ -AR transcripts was confirmed in entire Tg $\beta_3$  aortas (Fig. 1B), while it was not detected in WT aortic tissue nor in the desendothelialized aorta of Tg $\beta_3$  rats. These results indicate that human  $\beta_3$ -AR mRNA was specifically expressed in the endothelial cells of Tg $\beta_3$  rats. Evaluation in whole heart and in isolated cardiomyocytes (Fig. 1B) confirmed the presence of h $\beta_3$ -AR transcripts in Tg $\beta_3$  whole heart extracts, while they were not present in isolated cardiomyocytes. The ventricular native  $\beta_1$ -AR,  $\beta_2$ -AR and  $\beta_3$ -AR subtypes gene levels were not significantly modified between WT and Tg $\beta_3$  rats (Fig. 1C).

### **Phenotype of Tg $\beta_3$ rats with ageing**

#### *General characteristics*

For echocardiographic analysis, care has been taken to verify that similar heart rate was obtained both in WT and Tg $\beta_3$  rats (Table 1). For all functional in vivo evaluations of cardiac function (echocardiography, AP and LVEDP), WT and Tg $\beta_3$  female rats presented a similar phenotype, even in the absence of sex hormone (Table 2, Fig. 1 Supplemental data) while males did not. Thus, data on male rats will only be discussed below.

Additionally, at 45 weeks of age, WT (n=11) and Tg $\beta_3$  (n=12) male rats presented similar weight and tibia length (Table 1). Blood pressure assessment revealed that transgenic animals did not show any increase in systolic (WT: 136.3±4.0 vs. Tg $\beta_3$ : 133.4±4.6 mmHg),

diastolic (WT:  $95.29 \pm 2.0$  vs.  $Tg\beta_3$ :  $92.75 \pm 3.1$  mmHg), or mean AP (WT:  $109.0 \pm 2.6$  vs.  $Tg\beta_3$ :  $106.3 \pm 3.5$  mmHg) (Table 2).

#### *In vivo investigation of cardiac function in male rats*

$Tg\beta_3$  rats showed an increase of end diastolic LV pressure (WT:  $5.57 \pm 1.23$  vs.  $Tg\beta_3$ :  $11.68 \pm 1.11$  mmHg,  $p < 0.05$ , Fig. 2A). No morphological differences were reported in  $Tg\beta_3$  rat hearts at the age of 15, 30 and 45 weeks (Table 3, supplemental data).

Systolic function evaluated by the calculated ejection fraction remained normal in both WT and  $Tg\beta_3$  rats regardless of age (15 weeks, WT:  $84.4 \pm 1.4$  vs.  $Tg\beta_3$ :  $80.9 \pm 2.1\%$ , N.S.; 30 weeks, WT:  $81.7 \pm 1.7$  vs.  $Tg\beta_3$ :  $81.3 \pm 1.5\%$ , N.S.; 45 weeks, WT:  $78.0 \pm 1.5$  vs.  $Tg\beta_3$ :  $77.8 \pm 0.9\%$ , N.S.) (Fig. 2B).

Since the main pathological process in HFpEF appears to be diastolic dysfunction, we assessed cardiac filling capacities in Doppler mode. Repeated measurements over time of early-to-late filing ratios (E/A) revealed that diastolic dysfunction is exacerbated with a restrictive filling pattern over age. Indeed, at 15 weeks of age, WT and  $Tg\beta_3$  rats displayed a similar filling pattern (WT:  $1.10 \pm 0.03$  vs.  $Tg\beta_3$ :  $1.16 \pm 0.04$ ). At the age of 30 weeks, the E/A ratio was significantly increased in  $Tg\beta_3$  rats (WT:  $1.08 \pm 0.04$  vs.  $Tg\beta_3$ :  $1.26 \pm 0.05$ ;  $p < 0.05$ ), and trended to worsen between 30 and 45 weeks (WT:  $1.15 \pm 0.01$  vs.  $Tg\beta_3$ :  $1.33 \pm 0.04$ ;  $p < 0.05$ ) (Fig. 2C). Relaxation parameters, such as isovolumic relaxation time and E-wave deceleration time, were not modified at 15, 30 and 45 weeks between WT and  $Tg\beta_3$  rats (Table 3, supplemental data).

#### *Diffuse myocardial fibrosis in $Tg\beta_3$ rats*

Collagen deposition quantification was performed in 45 weeks old  $Tg\beta_3$  and WT hearts.  $Tg\beta_3$  myocardium (in LV and septum) was characterized by a higher amount of fibrosis in the whole cardiac muscle, due to an increase in both collagen I (WT:  $2.08 \pm 0.16$  vs.  $Tg\beta_3$ :  $2.91 \pm 0.17\%$ ,  $p < 0.05$ ) and III (WT:  $0.96 \pm 0.12$  vs.  $Tg\beta_3$ :  $1.35 \pm 0.08\%$ ,  $p < 0.05$ ) in a diffuse manner (Fig. 3).

## **Ex vivo cardiac function of Tg $\beta$ <sub>3</sub> rats**

Intrinsic heart function was evaluated using isolated working heart. This approach allowed us to finely define cardiac function under precise load conditions without any hormonal regulation.

### *Cardiac function in basal conditions*

Under physiological conditions, Tg $\beta$ <sub>3</sub> hearts showed a significantly higher LVEDP, an increase in heart rate and a decrease in systolic pressure, associated with a significantly higher minimal pressure. Diastolic function of Tg $\beta$ <sub>3</sub> hearts was altered, as illustrated by the increase in dP/dt<sub>min</sub>, in relaxation time and the decrease in diastolic filling period. The systolic function, systolic ejection period and contraction time were not statistically different between WT and Tg $\beta$ <sub>3</sub> hearts, but dP/dt<sub>max</sub> was decreased in Tg $\beta$ <sub>3</sub> hearts. Altogether these modifications were not associated with modification of the cardiac output and coronary flow in Tg $\beta$ <sub>3</sub> hearts (Table 3).

### *Cardiac function under stress conditions*

An increase in afterload was applied to hearts to reproduce ex vivo increase in peripheral resistance, to stimulate the systolic adaptation. From 100 mmHg, adaptation in contractility of Tg $\beta$ <sub>3</sub> hearts was impaired (dP/dt<sub>max</sub>; at 140 mmHg, WT: 9167 $\pm$ 510 mmHg/s vs. Tg $\beta$ <sub>3</sub>: 7234 $\pm$ 263 mmHg/s; p<0.05) (Fig. 4A). Cardiac output, aortic and coronary flow were similar between WT and Tg $\beta$ <sub>3</sub> hearts (Fig. 4B, C, D).

In a second protocol, a diastolic stress was applied by gradually increasing the preload, in order to mimic an increase in pulmonary arterial pressure or in venous return. The increase in preload induced a significant elevation of dP/dt<sub>min</sub> in both genotypes, but, at higher preload diastolic filling period was significantly decreased in the Tg $\beta$ <sub>3</sub> rats (Fig. 5H) without any modification of the relaxation time. Yet, WT hearts showed a significant higher contractility while Tg $\beta$ <sub>3</sub> hearts impaired to adapt (Fig. 5G). In the presence of a high preload (25 mmHg), the pumping function of Tg $\beta$ <sub>3</sub> hearts was dramatically decreased compared to WT hearts, with a 25% decrease in cardiac output (WT: 79.0 $\pm$ 2.2 vs. Tg $\beta$ <sub>3</sub>: 69.2 $\pm$ 2.6 mL/min; p<0.05), and a 21% decrease in stroke volume (WT: 0.291 $\pm$ 0.016 vs. Tg $\beta$ <sub>3</sub>: 0.229 $\pm$ 0.017 mL/min; p<0.05)

(Fig. 5A, B, E). This impairment was associated with a significant alteration of cardiac power (Tg $\beta$ <sub>3</sub>: 10 mmHg:  $1.06 \times 10^7 \pm 0.04 \times 10^7$  vs. 25 mmHg:  $0.91 \times 10^7 \pm 0.05 \times 10^7$  mWatt;  $p < 0.05$ ), which was not observed in WT (10 mmHg:  $1.26 \times 10^7 \pm 0.07 \times 10^7$  vs. 25 mmHg:  $1.19 \times 10^7 \pm 0.05 \times 10^7$  mWatt) (Fig. 5F). These results revealed that, diastole duration and heart capacity to work was blunted at higher level of preload in Tg $\beta$ <sub>3</sub> hearts. This was associated with a dramatic impairment of filling capacities of the hearts (cardiac filling period: WT  $92.73 \pm 32.08$  vs. Tg $\beta$ <sub>3</sub>  $58.57 \pm 17.83$  ms).

## **Discussion**

Surprisingly, over expression of h $\beta$ <sub>3</sub>-AR in endothelial cells in our model was associated with alteration of diastolic function mimicking the human HFpEF phenotype. Interestingly in our study, Tg $\beta$ <sub>3</sub> rats were studied until 45 weeks, a quite advanced age in comparison to other animal models of HFpEF. With ageing, Tg $\beta$ <sub>3</sub> rats developed a progressive diastolic dysfunction with an impaired filling pattern, associated with a slight collagen deposition, two main characteristics found in HFpEF patients. The subtle cardiac impairment observed at rest was increased during stress conditions, especially when the diastolic function is challenged. Our data suggest that this animal model with endothelial alteration, shares several main characteristics of HFpEF patients: a long-term disease, developing with ageing and associated with an inability to adapt to stress conditions.

### **HFpEF phenotype of Tg $\beta$ <sub>3</sub> rats**

In our study, Tg $\beta$ <sub>3</sub> rats display a progressive diastolic dysfunction, illustrated by the elevation of their E/A ratio with advancing age, associated with an increase in LVEDP. These alterations, which were significantly different at the age of 30 weeks trended to worsen until the age of 45 weeks, suggesting that our model slowly develops a filling alteration, as for elderly human patients. The absence of cardiac remodelling in Tg $\beta$ <sub>3</sub> male rats could be surprising. However, a study conducted by Shah et al. [17] showed that only half of HFpEF patients display cardiac hypertrophy, and pointed out that cardiac hypertrophy is not a critical step for the diastolic impairment. Furthermore, this phenomenon could be explained, at least in part, by the  $\beta$ <sub>3</sub>-AR antihypertrophic properties as previously reported by Belge et al. [18].

In the literature, diastolic dysfunction is induced in rodents using a strong elevation of afterload, either by using specific rodent strains [8, 19], or by chemical [20] or surgical [21] procedures, or by more complex procedures (deoxycortisone acetate-salt procedure [9], Dahl/SS strain fed with high-salt diet [22]). As a consequence of these drastic conditions, rodents showed strong phenotypic differences compared to the human pathology. As Borlaug et al. [23] noticed in the TOPCAT trial, patients who had the best outcome with aldosterone treatment were those with the lowest EF, and with ambiguous HFpEF pointing out that alteration of renin-angiotensin-aldosterone system in rodent might not be that pertinent. The use of a model developing the disease independently of renin-angiotensin-aldosterone system dysregulation, such as our Tg $\beta_3$  rat model, seems more accurate for a better understanding of HFpEF pathophysiology.

Tg $\beta_3$  also presents a moderate collagen deposition, as it has been observed in HFpEF patients. Patients develop diffuse cardiac fibrosis over time responsible for an increase in cardiac stiffness [24]. As for human patients, the relative low amount of collagen deposition observed in our model suggested that other parameters are implicated in LV stiffness and diastolic dysfunction (e.g. calcium cycling alterations, other extracellular matrix lesions, or sarcomeric proteins alterations) [25, 26].

### **Stress adaptation: a key process of HFpEF pathophysiology**

In our study, isolated working heart technique made possible to study stress conditions separately to the systolic and the diastolic function of the rat hearts; the increase in afterload stimulated more specifically the contractile capacities, whereas the increase in preload affected the diastolic reserve.

Interestingly, Tg $\beta_3$  hearts displayed an alteration in contractility when submitted to a high level of afterload. However, no alteration of the cardiac work capacities was reported in this condition. In both patients and Tg $\beta_3$  rats, systolic dysfunction is not the major keyplayer of the exercise intolerance. In our model, after an increase in preload, Tg $\beta_3$  hearts exhibit contractility and relaxation impairment, associated with a significant alteration of cardiac work. During exercise intolerance tests, HFpEF patients classically develop a dramatic increase in LVEDP [27], and a decrease in stroke volume [28], indicating that diastolic function is severely

worsened under stress conditions. This results are in accordance with John et al. showing that diastolic function of patients is particularly sensitive to preload variations [29].

### **Effects of endothelial $\beta_3$ -AR overexpression in our model**

The overexpression of  $\beta_3$ -AR in endothelial cells of Tg $\beta_3$  rats is not associated with significant modification of endogenous  $\beta$ -AR subtypes. Our results raise the question concerning the involvement of overexpressed endothelial  $\beta_3$ -AR in HFpEF development. Several studies have reported a beneficial effect of  $\beta_3$ -AR stimulation. In acute disorders, such as ischemia/reperfusion injury,  $\beta_3$ -AR stimulation decreased myocardial damage by decreasing mPTP opening in cardiomyocytes [30, 31]. An antihypertrophic effect induced by  $\beta_3$ -AR stimulation has also been described at an early stage of HF [30]. Conversely, at end-stage of HF,  $\beta_3$ -AR overexpression is associated with cardiac dysfunction [32-34]. The cardiac dysfunction induced by the  $\beta_3$ -AR overexpression in our model suggests that cardiac effects of  $\beta_3$ -AR are much more complex than initially thought and probably involved an endothelial dysfunction. Further studies will be needed to decipher the cellular mechanisms involved in HFpEF development associated with endothelial  $\beta_3$ -AR overexpression.

### **Limitations of our study**

We showed that Tg $\beta_3$  rats display diastolic dysfunction with ageing. The cardiovascular alterations were subtle, and no alterations were observed in renal or pulmonary vascular beds at the age of 45 weeks (Fig. 2, supplemental data). However, when considering a rodent life span, a 45 weeks-old rat cannot be qualified as "elderly". Considering how the disease evolved over time with ageing, our results suggest that this model is potentially a suitable model to explore the early phase of HFpEF. In addition, the absence of cardiac dysfunction in females, even with sex hormone loss, raises questions regarding the implication of gender in HFpEF pathophysiology. In human populations, older post-menopausal women represent an important proportion of patients. The absence of any diastolic dysfunction in females in our model may indicate a distinct pathological process according to gender.

## **Conclusion**

In conclusion, the Tg $\beta_3$  rat is an animal model that presents a phenotype close to HFpEF: it developed with ageing a spontaneously progressive filling impairment at rest, associated with diffuse fibrosis, but without pulmonary and renal vascular damage. Moreover, our data demonstrated a similar cardiac response of Tg $\beta_3$  rats and HFpEF patients when submitted to a stretch stress, illustrating a profoundly altered adaptation to stress conditions. This new model will allow us to better understand the complex pathophysiology of HFpEF, and to identify new therapeutic targets for patient management.

## **Clinical Perspectives**

Pathophysiological mechanisms involved in HFpEF still remain poorly understood, and no accurate treatment is available. The use of our model could lead to a better knowledge of the underlying mechanisms of diastolic dysfunction, in order to identify new therapeutic targets and therapeutic strategies for the patients.

## **Acknowledgments**

We thank Therassay platform for their technical assistance, Marja Steenman for careful English revision, and Corinne Mandin for secretarial assistance.

## References

1. Lloyd, G., Heart failure is in need of a diagnosis. *BMJ*, 2009. 338: p. b961.
2. Hamaguchi, S., et al., Mode of death in patients with heart failure and reduced vs. preserved ejection fraction: report from the registry of hospitalized heart failure patients. *Circ J*, 2012. 76(7): p. 1662-9.
3. Klapholz, M., et al., Hospitalization for heart failure in the presence of a normal left ventricular ejection fraction: results of the New York Heart Failure Registry. *J Am Coll Cardiol*, 2004. 43(8): p. 1432-8.
4. Maurer, M.S., I. Kronzon, and D. Burkhoff, Ventricular pump function in heart failure with normal ejection fraction: insights from pressure-volume measurements. *Prog Cardiovasc Dis*, 2006. 49(3): p. 182-95.
5. Westermann, D., et al., Role of left ventricular stiffness in heart failure with normal ejection fraction. *Circulation*, 2008. 117(16): p. 2051-60.
6. Tan, Y.T., et al., The pathophysiology of heart failure with normal ejection fraction: exercise echocardiography reveals complex abnormalities of both systolic and diastolic ventricular function involving torsion, untwist, and longitudinal motion. *J Am Coll Cardiol*, 2009. 54(1): p. 36-46.
7. Borlaug, B.A. and W.J. Paulus, Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Eur Heart J*, 2011. 32(6): p. 670-9.
8. LeGrice, I.J., et al., Progression of myocardial remodeling and mechanical dysfunction in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012. 303(11): p. H1353-65.
9. Silberman, G.A., et al., Uncoupled cardiac nitric oxide synthase mediates diastolic dysfunction. *Circulation*, 2010. 121(4): p. 519-28.
10. Charreau, B., et al., Protection against hyperacute xenograft rejection of transgenic rat hearts expressing human decay accelerating factor (DAF) transplanted into primates. *Mol Med*, 1999. 5(9): p. 617-30.
11. Merlet, N., et al., Increased beta2-adrenoceptors in doxorubicin-induced cardiomyopathy in rat. *PLoS One*, 2013. 8(5): p. e64711.
12. Slavic, S., et al., Cannabinoid receptor 1 inhibition improves cardiac function and remodelling after myocardial infarction and in experimental metabolic syndrome. *J Mol Med (Berl)*, 2013. 91(7): p. 811-23.
13. Lauzier, B., et al., Ivabradine reduces heart rate while preserving metabolic fluxes and energy status of healthy normoxic working hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. 300(3): p. H845-52.

14. Baudet, S., et al., Increased basal contractility of cardiomyocytes overexpressing protein kinase C epsilon and blunted positive inotropic response to endothelin-1. *Cardiovasc Res*, 2001. 50(3): p. 486-94.
15. Roul, D., et al., Increased beta2-adrenergic vasorelaxation at the early phase of endotoxemic shock in rats. *Vascul Pharmacol*, 2015. 72: p. 181-9.
16. Junqueira, L.C., W. Cossermelli, and R. Brentani, Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn*, 1978. 41(3): p. 267-74.
17. Shah, A.M., et al., Cardiac structure and function in heart failure with preserved ejection fraction: baseline findings from the echocardiographic study of the Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure with an Aldosterone Antagonist trial. *Circ Heart Fail*, 2014. 7(1): p. 104-15.
18. Belge, C., et al., Enhanced expression of beta3-adrenoceptors in cardiac myocytes attenuates neurohormone-induced hypertrophic remodeling through nitric oxide synthase. *Circulation*, 2014. 129(4): p. 451-62.
19. Youcef, G., et al., Simultaneous characterization of metabolic, cardiac, vascular and renal phenotypes of lean and obese SHHF rats. *PLoS One*, 2014. 9(5): p. e96452.
20. Regan, J.A., et al., A mouse model of heart failure with preserved ejection fraction due to chronic infusion of a low subpressor dose of angiotensin II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015. 309(5): p. H771-8.
21. Hudson, B., et al., Hyperphosphorylation of mouse cardiac titin contributes to transverse aortic constriction-induced diastolic dysfunction. *Circ Res*, 2011. 109(8): p. 858-66.
22. Klotz, S., et al., Development of heart failure in chronic hypertensive Dahl rats: focus on heart failure with preserved ejection fraction. *Hypertension*, 2006. 47(5): p. 901-11.
23. Borlaug, B.A., et al., Response to Letter Regarding Article, "Effects of Sildenafil on Ventricular and Vascular Function in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction". *Circ Heart Fail*, 2015. 8(4): p. 840.
24. Mohammed, S.F., et al., Coronary microvascular rarefaction and myocardial fibrosis in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation*, 2015. 131(6): p. 550-9.
25. Hamdani, N., et al., Myocardial titin hypophosphorylation importantly contributes to heart failure with preserved ejection fraction in a rat metabolic risk model. *Circ Heart Fail*, 2013. 6(6): p. 1239-49.
26. Zile, M.R., et al., Myocardial stiffness in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: contributions of collagen and titin. *Circulation*, 2015. 131(14): p. 1247-59.
27. Borlaug, B.A., et al., Exercise hemodynamics enhance diagnosis of early heart failure with preserved ejection fraction. *Circ Heart Fail*, 2010. 3(5): p. 588-95.

28. Kasner, M., et al., Heterogeneous responses of systolic and diastolic left ventricular function to exercise in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *ESC Heart Fail*, 2015. 2(3): p. 121-132.
29. John, J.M., et al., Decreased left ventricular distensibility in response to postural change in older patients with heart failure and preserved ejection fraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. 299(3): p. H883-9.
30. Garcia-Prieto, J., et al., beta3 adrenergic receptor selective stimulation during ischemia/reperfusion improves cardiac function in translational models through inhibition of mPTP opening in cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol*, 2014. 109(4): p. 422.
31. Niu, X., et al., Cardioprotective effect of beta-3 adrenergic receptor agonism: role of neuronal nitric oxide synthase. *J Am Coll Cardiol*, 2012. 59(22): p. 1979-87.
32. Cheng, H.J., et al., Upregulation of functional beta(3)-adrenergic receptor in the failing canine myocardium. *Circ Res*, 2001. 89(7): p. 599-606.
33. Moniotte, S., et al., Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation*, 2001. 103(12): p. 1649-55.
34. Morimoto, A., et al., Endogenous beta3-adrenoreceptor activation contributes to left ventricular and cardiomyocyte dysfunction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. 286(6): p. H2425-33.

## Figure legends

**Figure 1:** Localization and expression of  $\beta_3$ -AR. A: transcriptional level of human  $\beta_3$ -AR mRNA in whole heart. B: RT-PCR assays were performed on desendothelialized or intact aorta, whole heart tissue extract and isolated cardiomyocytes from WT and Tg $\beta_3$  rats. C: rat  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , and  $\beta_3$ -AR mRNA levels. The quantification of transcripts was normalized using Gapdh mRNA levels.

**Figure 2:** Cardiac function of WT and Tg $\beta_3$  rats. A: Diastolic function was measured at 45 weeks by catheterism: LV pressure measurements of 45 weeks old WT (n=8) and Tg $\beta_3$  (n=9) rats. LV pressure was evaluated on anaesthetized animals, using a millar pressure probe. B: Evolution of systolic function between 15 and 45 weeks measured by echography. C: Evolution of diastolic function between 15 and 45 weeks measured by echography. Representative recordings from WT and Tg $\beta_3$  were presented for each measurement. Data were expressed as mean $\pm$ SEM \*: p<0.05.

**Figure 3:** Fibrosis quantification. Cryosections were stained with picrosirius red and viewed under polarized light to distinguish type I (red) from type III (green) collagen. Representative views from WT and Tg $\beta_3$  samples are presented. Data are expressed as mean $\pm$ SEM \*: p<0.05.

**Figure 4:** Effect of an increase in afterload in isolated working heart at 45 weeks. Data were recorded in WT (■, n=8) and Tg $\beta_3$  (□, n=8) after a 7 min stabilization period under physiological condition (afterload 80 mmHg, preload 12.5 mmHg), and heart function was evaluated from 60 to 140 mmHg with 10 mmHg intervals. A: Contractility (dP/dtmax) and relaxation rate (dP/dtmin). B: Cardiac output. C: Aortic flow. D: Coronary flow. Data are expressed as mean $\pm$ SEM \*: p<0.05 WT vs. Tg $\beta_3$ . #: p<0.05 vs. physiological condition of the same genotype.

**Figure 5:** Effect of an increase in preload in isolated working heart at 45 weeks. Data were recorded in WT (□, n=13) and Tg $\beta_3$  (■, n=12) after a 7 min stabilization period under physiological condition (afterload 80 mmHg, preload 12.5 mmHg), and heart function was evaluated from 5 to 25 mmHg with 5 mmHg intervals. A: cardiac output. B: Aortic flow. C: coronary flow. D: heart rate. E: stroke volume. F: cardiac power. G: contraction (dP/dtmax) and relaxation rate (dP/dtmin). H: diastolic filling period. I: total diastole duration. J: relaxation

time. Data are expressed as mean±SEM, \*: p<0.05 WT vs. Tgβ<sub>3</sub>. #: p<0.05 vs. physiological condition of the same genotype.

**Table 1.** Physiological and cardiovascular parameters recording in WT and Tgβ<sub>3</sub> rats at 45 weeks. Data are mean±SEM. LV morphological parameters were measured by echography on short axis parasternal view, except for interventricular septal wall thickness in long axis parasternal view, in diastole and in systole. Data are expressed as mean±SEM, \*: p<0.05.

**Table 2.** Arterial blood pressure values measured in WT and Tgβ<sub>3</sub> male rats at 45 weeks. Data are expressed as mean±SEM.

**Table 3.** Characteristics of perfused isolated working hearts under physiological condition in WT and Tgβ<sub>3</sub> rats at 45 weeks of age. Data are expressed as mean±SEM. Afterload was set at 80 mmHg and preload at 12.5 mmHg.

## Supplementary data

**Figure 1.** Vascular injuries on lung and kidneys from WT (n=8) and Tg $\beta_3$  (n=9) rats. (A) Small pulmonary arteriole remodelling was assessed by histology. Sections were stained with orcein and the percentage of media area of small arterioles was quantified. (B) Renal injuries were evaluated using the glomerular score. 20 glomeruli per rat were rated with a score from 0 (0% injured glomeruli) to 4 (100% injured glomeruli), in order to calculate the glomerular score, reflecting glomerular damage of the whole kidney.

**Figure 2.** Cardiac function from WT and Tg $\beta_3$  female rats, ovariectomized or not. A: Diastolic function at 45 weeks measured by catheterism: LV pressure measurements of 45 weeks old WT (n=8) and Tg $\beta_3$  (n=9) rats. LV pressure was evaluated on anaesthetized animals, using a millar pressure probe. B: Evolution of diastolic function between 15 and 45 weeks measured by echography: LV filling pattern was recorded using pulsed Doppler mode. Representative views from WT and Tg $\beta_3$  are presented for each measurement. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

**Table 1.** Primers used for identification and quantification of  $\beta_3$ -AR mRNAs with RT-PCR.

**Table 2.** Cardiovascular parameters from WT and Tg $\beta_3$  females at 15 and 30 and 45 weeks of age. LV morphological parameters were measured by echography on short axis parasternal view, except for IVSWT in long axis parasternal view, in diastole and in systole. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

**Table 3.** Arterial blood pressure values measured in WT and Tg $\beta_3$  female rats at 45 weeks. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

**Table 4.** Cardiovascular parameters from WT and Tg $\beta_3$  males at 15 and 30 weeks of age. LV morphological parameters were measured by echography on short axis parasternal view, except for interventricular septal wall thickness in long axis parasternal view, in diastole and in systole. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

Figure 1.

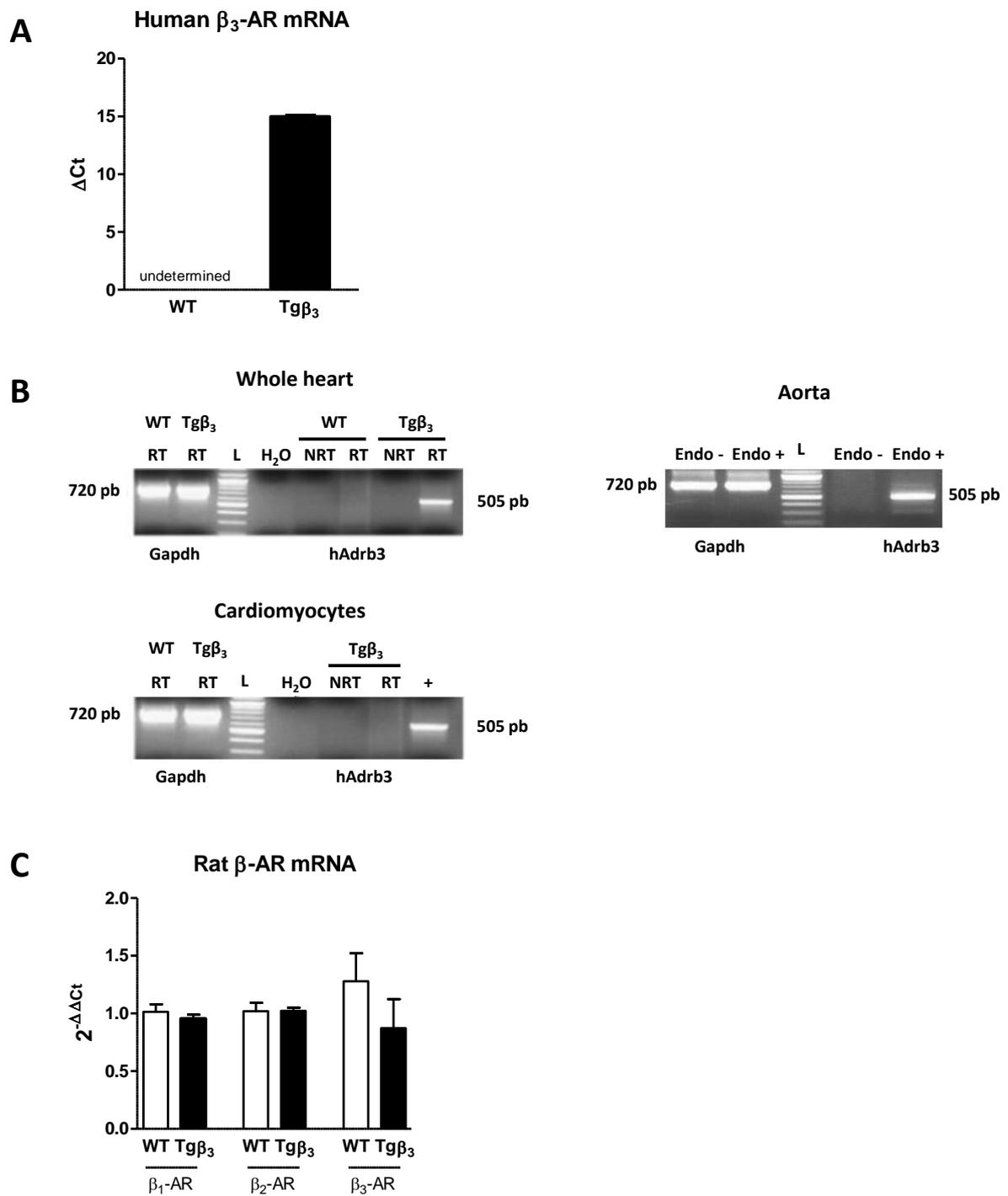


Figure 2.

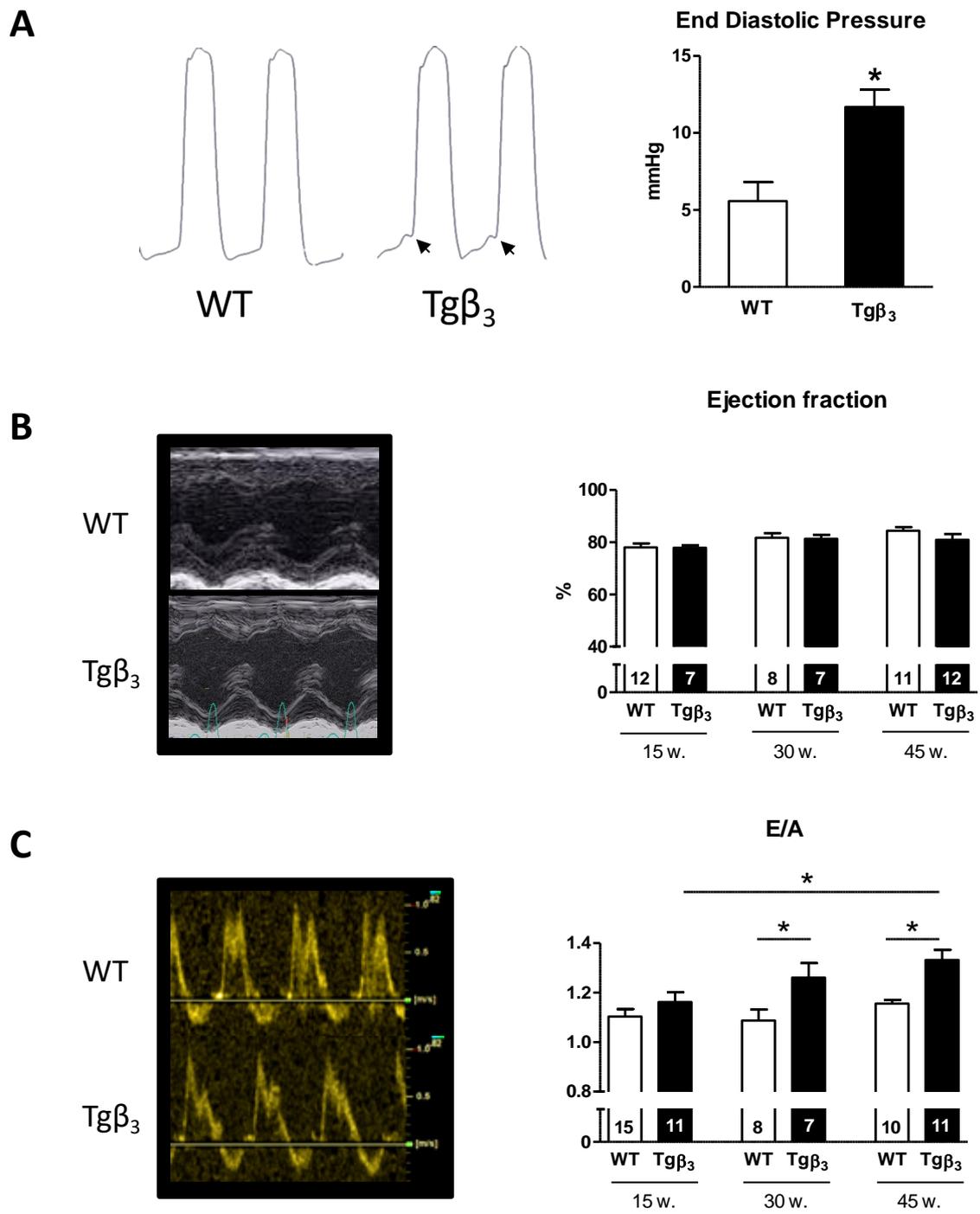


Figure 3.

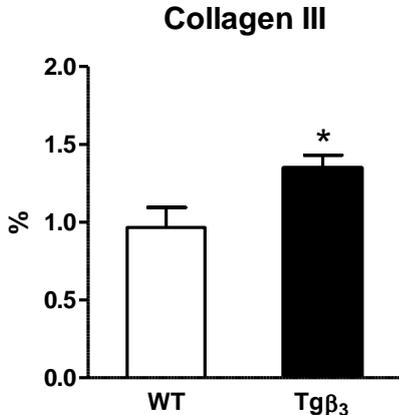
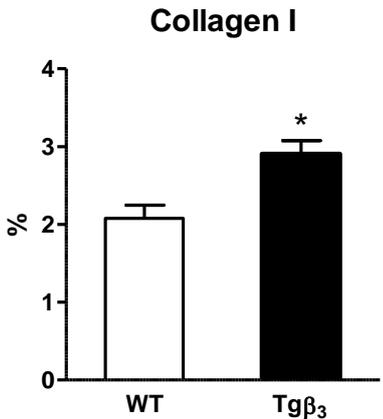
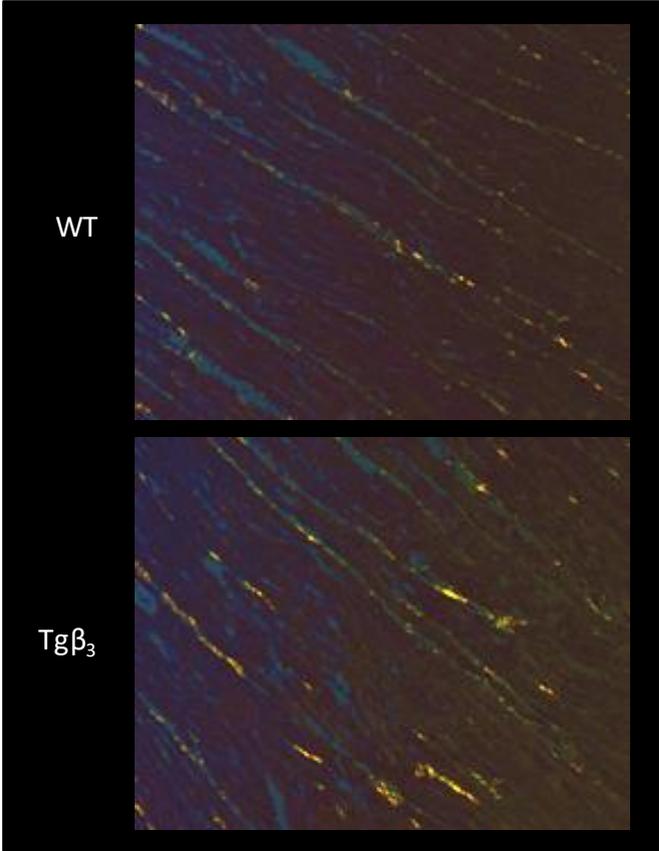
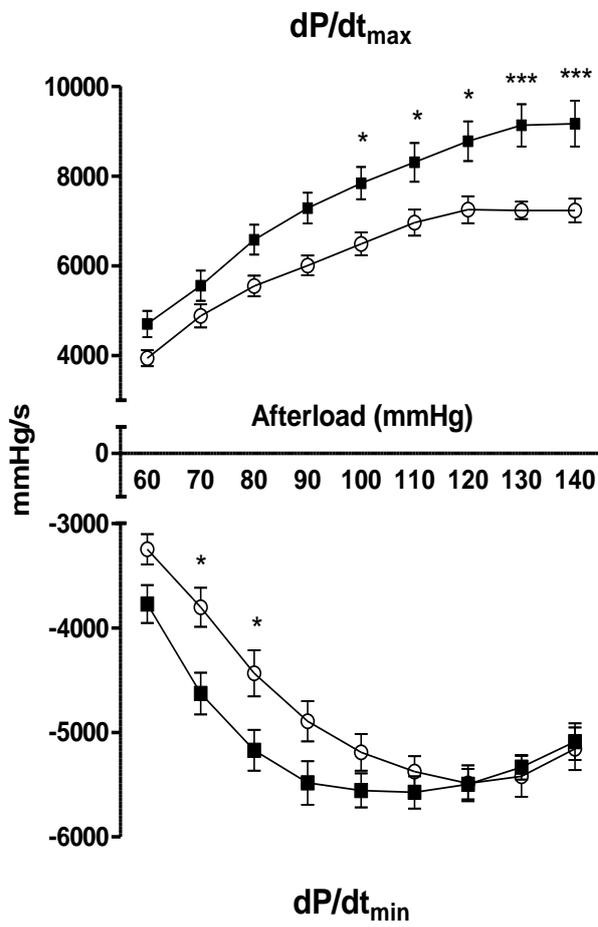


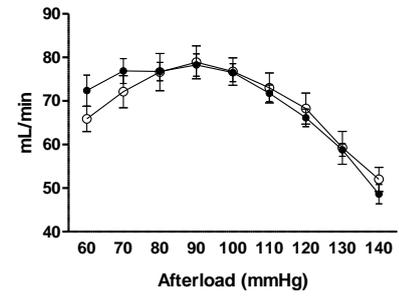
Figure 4.

**A**



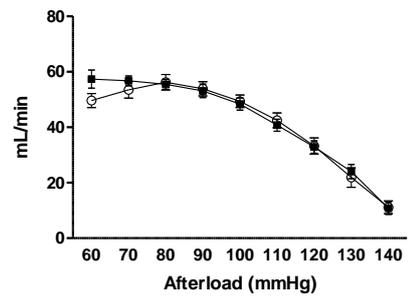
**B**

Cardiac Output



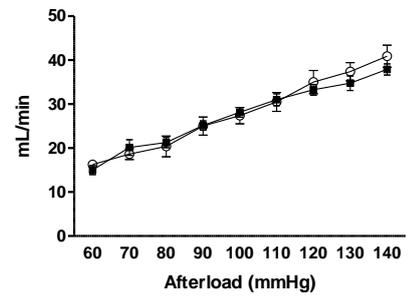
**C**

Aortic flow

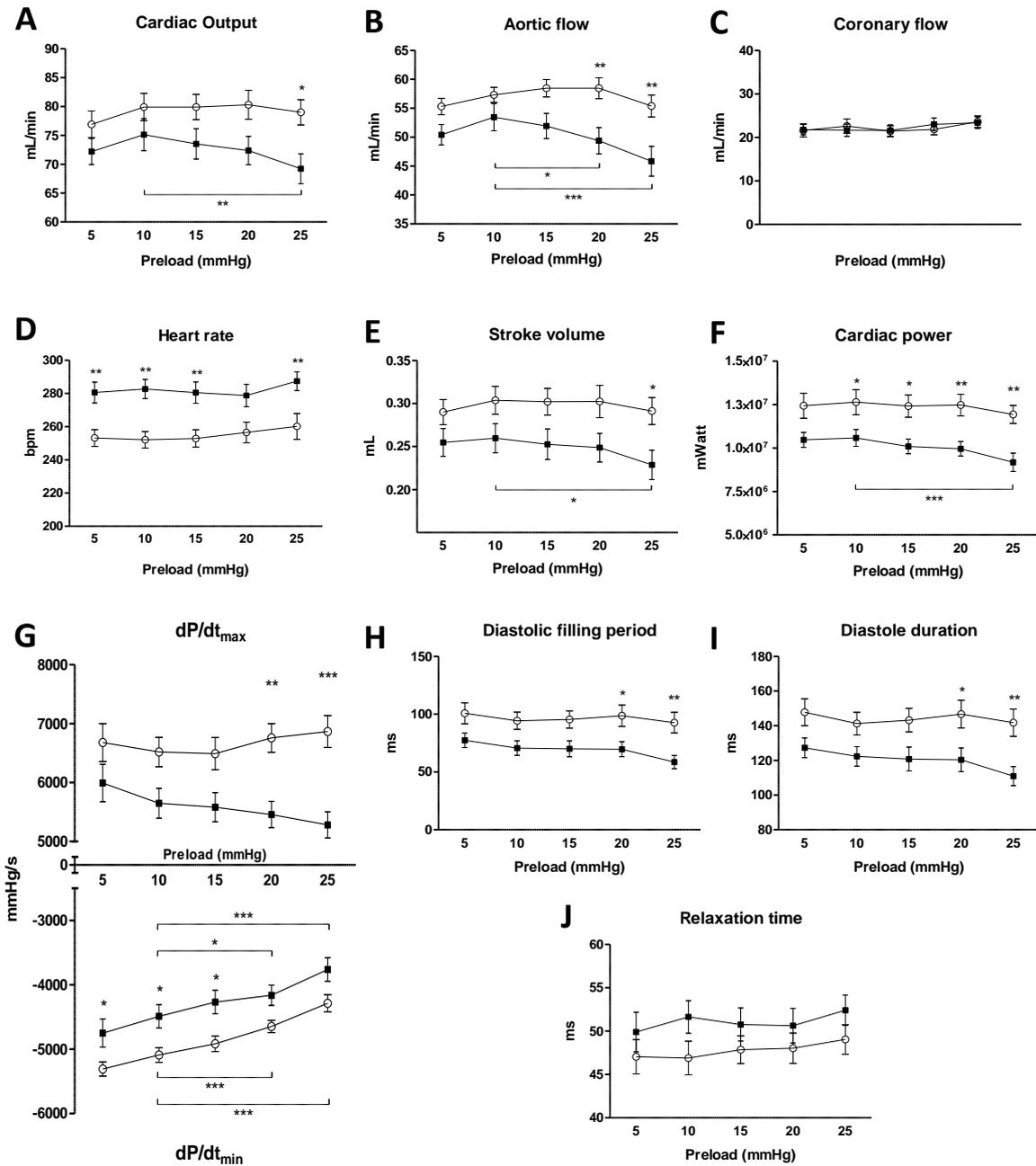


**D**

Coronary flow



**Figure 5.**



**Table 1.**

Parameters	WT (n=11)	Tgβ <sub>3</sub> (n=12)
<b>Body Weight (g)</b>	599 ± 63	622 ± 36
<b>Tibia length (mm)</b>	59.58 ± 1.03	60.75 ± 0.75
<b>Heart rate (bpm)</b>	337 ± 6	336 ± 7
<b>LV morphological parameters</b>		
Posterior wall thickness in diastole (mm)	1.83 ± 0.05	1.82 ± 0.04
Posterior wall thickness in systole (mm)	2.85 ± 0.05	2.76 ± 0.12
Anterior wall thickness in diastole (mm)	1.73 ± 0.06	1.59 ± 0.06
Anterior wall thickness in systole (mm)	3.27 ± 0.17	2.09 ± 0.08
Interventricular septal wall thickness in diastole (mm)	1.75 ± 0.08	1.67 ± 0.06
Interventricular septal wall thickness in systole (mm)	2.95 ± 0.09	2.87 ± 0.09
LV diameter in diastole (mm)	8.51 ± 0.14	8.86 ± 0.14
LV diameter in systole (mm)	4.93 ± 0.17	5.24 ± 0.21
<b>LV diastolic parameters</b>		
E-wave (m/s)	1,150 ± 0,039	1,139 ± 0,051
<b>A-wave (m/s)</b>	<b>0,990 ± 0,031</b>	<b>0,862 ± 0,037 *</b>
E/A ratio	<b>1,155 ± 0,015</b>	<b>1,332 ± 0,041 *</b>
E-wave deceleration time (ms)	43,37 ± 1,853	43,80 ± 2,239
Isovolumic relaxation time (ms)	22,30 ± 1,324	21,76 ± 0,887

**Table 2.**

Parameters	WT (n=11)	Tgβ <sub>3</sub> (n=12)
Systolic blood pressure (mmHg)	136.3 ± 4.0	133.4 ± 4.6
Diastolic blood pressure (mmHg)	95.29 ± 2.0	92.75 ± 3.1
Mean blood pressure (mmHg)	109.0 ± 2.6	106.3 ± 3.5

**Table 3.**

Parameter	WT (n=26)	Tg $\beta_3$ (n=23)	P-value
<b>Heart rate (bpm)</b>	<b>255 <math>\pm</math> 4</b>	<b>275 <math>\pm</math> 5 *</b>	<b>0.0073</b>
<b>Maximal pressure (mmHg)</b>	<b>150.0 <math>\pm</math> 2.3</b>	<b>137.9 <math>\pm</math> 2.0 *</b>	<b>0.0004</b>
<b>Minimal pressure (mmHg)</b>	<b>-4.9 <math>\pm</math> 1.5</b>	<b>-0.5 <math>\pm</math> 0.8 *</b>	<b>0.0150</b>
<b>EDP (mmHg)</b>	<b>8.8 <math>\pm</math> 0.8</b>	<b>12.5 <math>\pm</math> 1.5 *</b>	<b>0.0350</b>
Systolic ejection period (ms)	70.1 $\pm$ 2.5	70.5 $\pm$ 1.2	0.8891
Contraction time (ms)	33.3 $\pm$ 3.1	26.5 $\pm$ 3.3	0.1383
<b>Diastolic filling period (ms)</b>	<b>90.4 <math>\pm</math> 5.8</b>	<b>64.9 <math>\pm</math> 5.5 *</b>	<b>0.0031</b>
<b>Relaxation time (ms)</b>	<b>46.5 <math>\pm</math> 1.2</b>	<b>53.4 <math>\pm</math> 1.2 *</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>dP/dtmax (mmHg/s)</b>	<b>6,211 <math>\pm</math> 184</b>	<b>5,569 <math>\pm</math> 194 *</b>	<b>0.0206</b>
<b>dP/dtmin (mmHg/s)</b>	<b>-4,936 <math>\pm</math> 109</b>	<b>-4,453 <math>\pm</math> 109 *</b>	<b>0.0116</b>
Cardiac output (mL/min)	77.7 $\pm$ 1.7	74.1 $\pm$ 2.4	0.2207
Aortic flow (mL/min)	54.7 $\pm$ 1.4	53.1 $\pm$ 2.7	0.6084
Coronary flow (mL/min)	22.7 $\pm$ 1.0	22.0 $\pm$ 1.0	0.6349

## Supplementary data -

**Figure 1.** Vascular injuries on lung and kidneys of WT (n=8) and Tg $\beta_3$  (n=9) rats. (A) Small pulmonary arteriole remodelling was assessed by histology. Sections were stained with orcein and % media area of small arterioles were quantified. (B) Renal injuries were evaluated by glomerular score. 20 glomeruli per rat were rated with a score from 0 (0% injured glomeruli) to 4 (100% injured glomeruli), in order to calculate the glomerular score, reflecting glomerular damage of the whole kidney.

**Figure 2.** Cardiac function of WT and Tg $\beta_3$  female rats, ovariectomized or not. A: Diastolic function at 45 weeks measured by catheterism: LV pressure measurements of 45 weeks old WT (n=8) and Tg $\beta_3$  (n=9) rats. LV pressure was evaluated on anaesthetized animals, using a millar pressure probe. B: Evolution of diastolic function between 15 and 45 weeks measured by echography: LV filling pattern was recorded using pulsed Doppler mode. Representative view of the WT and Tg $\beta_3$  recordings are presented for each measurement. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

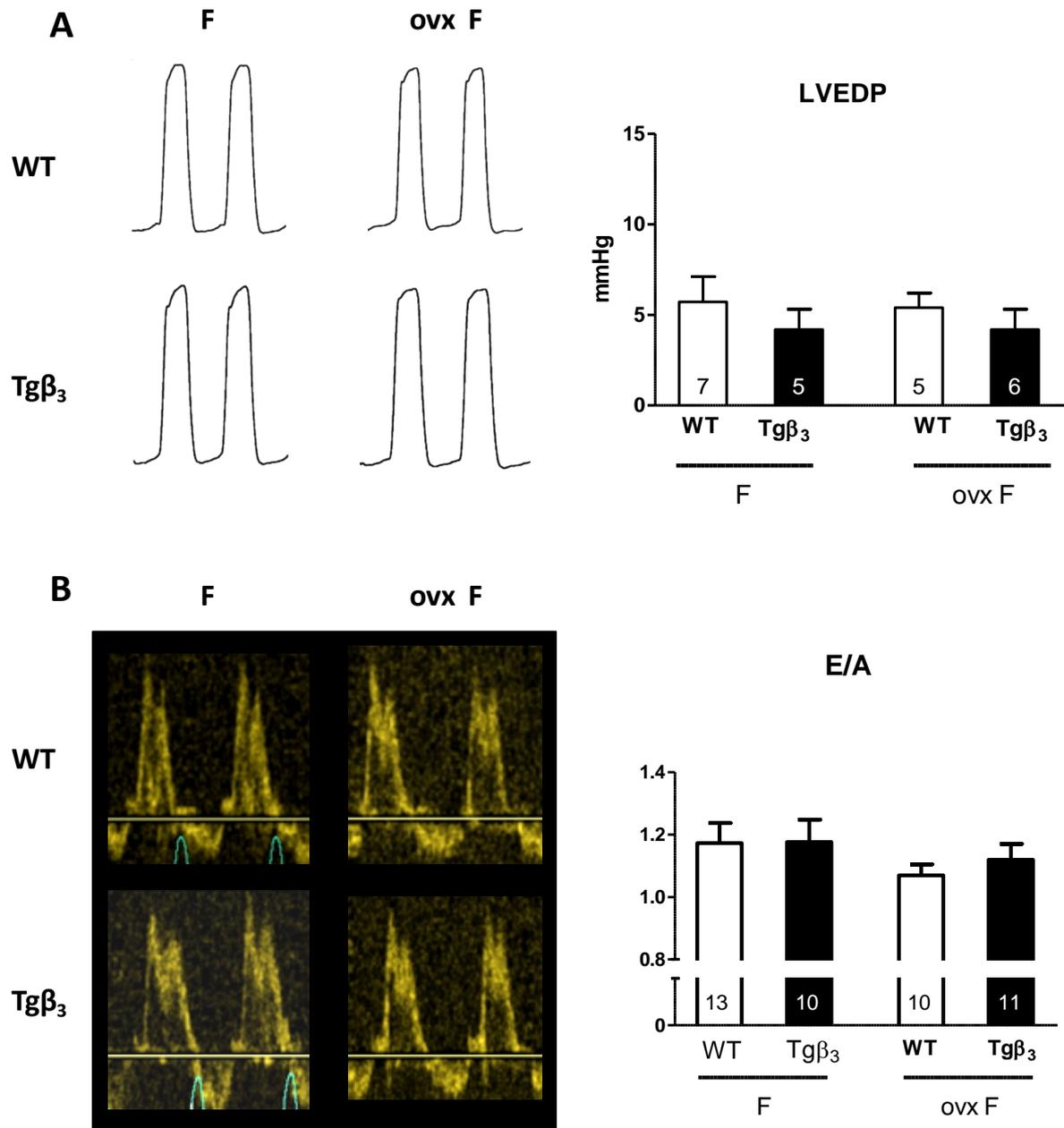
**Table 1.** Primers used for identification and quantification of  $\beta_3$ -AR mRNAs with RT-PCR.

**Table 2.** Cardiovascular parameters of WT and Tg $\beta_3$  female rats at 15 and 30 and 45 weeks of age. LV morphological parameters were measured by echography on short axis parasternal view, except for IVSWT in long axis parasternal view, in diastole (d) and in systole (s). Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

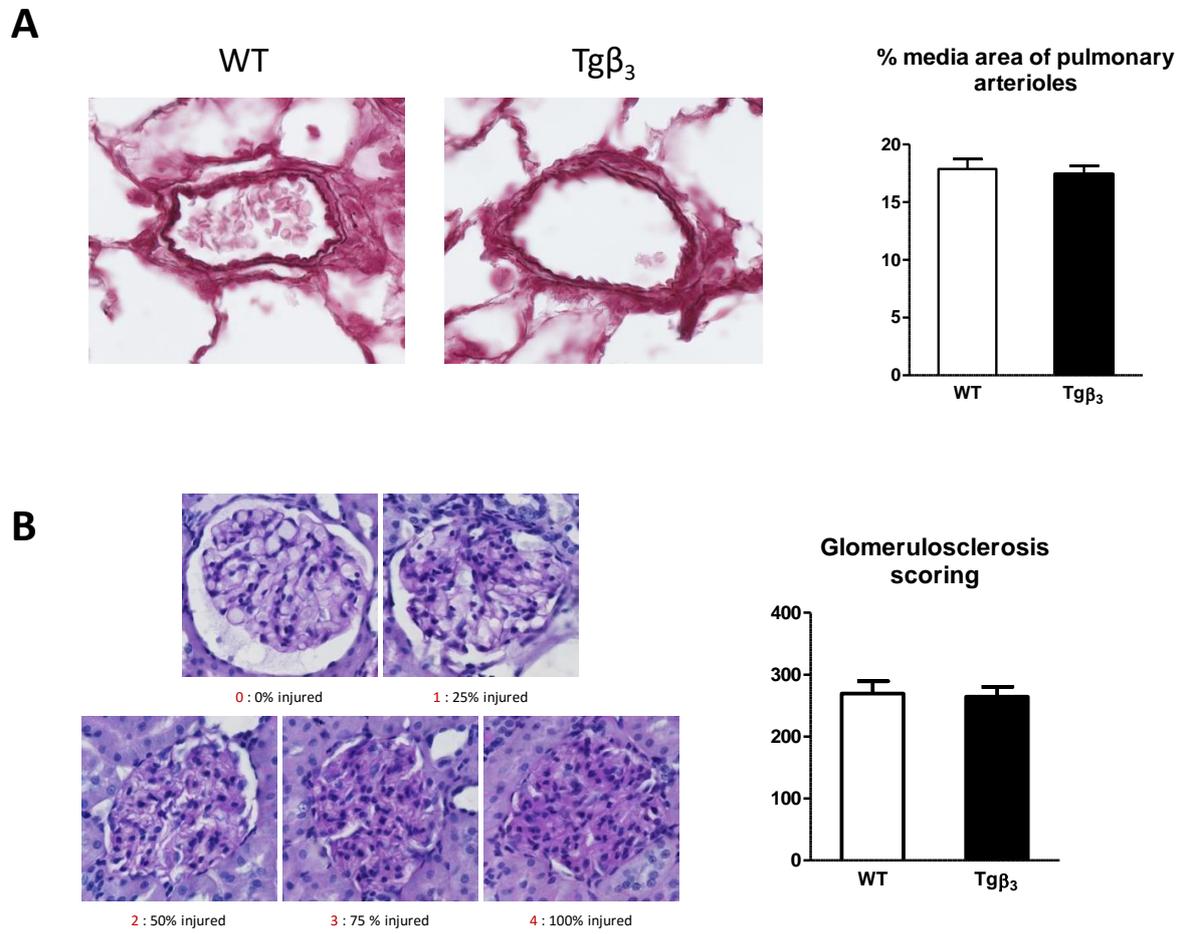
**Table 3.** Cardiovascular parameters of WT and Tg $\beta_3$  male rats at 15 and 30 weeks of age. LV morphological parameters were measured by echography on short axis parasternal view, except for IVSWT in long axis parasternal view, in diastole (d) and in systole (s). Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

# Supplementary data

## Figure 1.



**Figure 2.**



**Table 1.**

mRNA	Lenght (pb)	Sequence	Product Lenght
hAdrb3 (S)	17	5' AGCTCTCTTGCCCATG 3'	505
hAdrb3 (AS)	19	5' ACTGGCTCATGATGGGCGC 3'	
Gapdh (S)	30	5' ACTGGCGTCTTCACCACCATGGAGAAGGCT 3'	700
Gapdh (AS)	30	5' CTCCTTGGAGGCCATGTAGGCCATGAGGTC 3'	

**Table 2.**

Parameters	Females (F)		Ovariectomized females (ovx F)	
	WT (n=13)	Tg $\beta_3$ (n=13)	WT (n=12)	Tg $\beta_3$ (n=10)
<b>LV morphological parameters</b>				
<i>Wall thickness</i>				
PWTd (mm)	1.70 ± 0.04	1.75 ± 0.07	1.75 ± 0.07	1.76 ± 0.07
PWTs (mm)	2.73 ± 0.06	2.79 ± 0.14	2.75 ± 0.01	2.70 ± 0.09
AWTd (mm)	1.63 ± 0.06	1.50 ± 0.05	1.54 ± 0.05	1.46 ± 0.03
AWTs (mm)	2.87 ± 0.10	2.87 ± 0.12	2.78 ± 0.08	2.65 ± 0.06
IVSWTd (mm)	1.59 ± 0.04	1.54 ± 0.05	1.59 ± 0.07	1.56 ± 0.05
IVSWTs (mm)	2.97 ± 0.08	2.79 ± 0.10	2.82 ± 0.09	2.71 ± 0.08
<i>LV diameter</i>				
VDd (mm)	7.29 ± 0.13	7.09 ± 0.22	7.18 ± 0.12	7.13 ± 0.19
LVDs (mm)	3.86 ± 0.17	3.43 ± 0.23	3.81 ± 0.21	3.93 ± 0.24
<i>LV volumes</i>				
EDV (mL)	0.87 ± 0.04	0.82 ± 0.06	0.83 ± 0.06	0.83 ± 0.06
ESV (mL)	0.15 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.03

**Table 3.**

Parameters	Females (F)		Ovariectomized females (ovx F)	
	WT (n=9)	Tg $\beta_3$ (n=5)	WT (n=5)	Tg $\beta_3$ (n=5)
<b>Blood pressure</b>				
Systolic blood pressure (mmHg)	143.8 $\pm$ 5.2	148.4.4 $\pm$ 7.0	134.6 $\pm$ 5.0	124.5 $\pm$ 7.83
Diastolic blood pressure (mmHg)	99.6 $\pm$ 2.7	104.2 $\pm$ 4.7	101.2 $\pm$ 2.95	91.25 $\pm$ 7.6
Mean blood pressure (mmHg)	114.3 $\pm$ 3.5	118.9 $\pm$ 5.5	112.3 $\pm$ 3.5	102.3 $\pm$ 7.6

**Table 4.**

Parameters	15 weeks		30 weeks	
	WT (n=13)	Tg $\beta_3$ (n=13)	WT (n=12)	Tg $\beta_3$ (n=10)
<b>LV morphological parameters</b>				
<i>Wall thickness</i>				
PWTd (mm)	1,684 $\pm$ 0,070	1,613 $\pm$ 0,063	1,882 $\pm$ 0,181	1,804 $\pm$ 0,176
PWTs (mm)	2,413 $\pm$ 0,090	2,391 $\pm$ 0,042	3,078 $\pm$ 0,176	2,838 $\pm$ 0,145
AWTd (mm)	1,526 $\pm$ 0,044	1,536 $\pm$ 0,106	1,617 $\pm$ 0,081	1,628 $\pm$ 0,064
AWTs (mm)	2,433 $\pm$ 0,174	2,131 $\pm$ 0,134	2,852 $\pm$ 0,167	2,968 $\pm$ 0,116
IVSWTd (mm)	1,505 $\pm$ 0,038	1,531 $\pm$ 0,049	1,913 $\pm$ 0,126	1,772 $\pm$ 0,103
IVSWTs (mm)	2,246 $\pm$ 0,121	2,199 $\pm$ 0,094	3,226 $\pm$ 0,140	3,150 $\pm$ 0,111
<i>LV diameter</i>				
VDd (mm)	7,232 $\pm$ 0,191	7,750 $\pm$ 0,179	7,843 $\pm$ 0,205	7,878 $\pm$ 0,204
LVDs (mm)	4,332 $\pm$ 0,196	4,659 $\pm$ 0,230	4,035 $\pm$ 0,302	4,205 $\pm$ 0,164

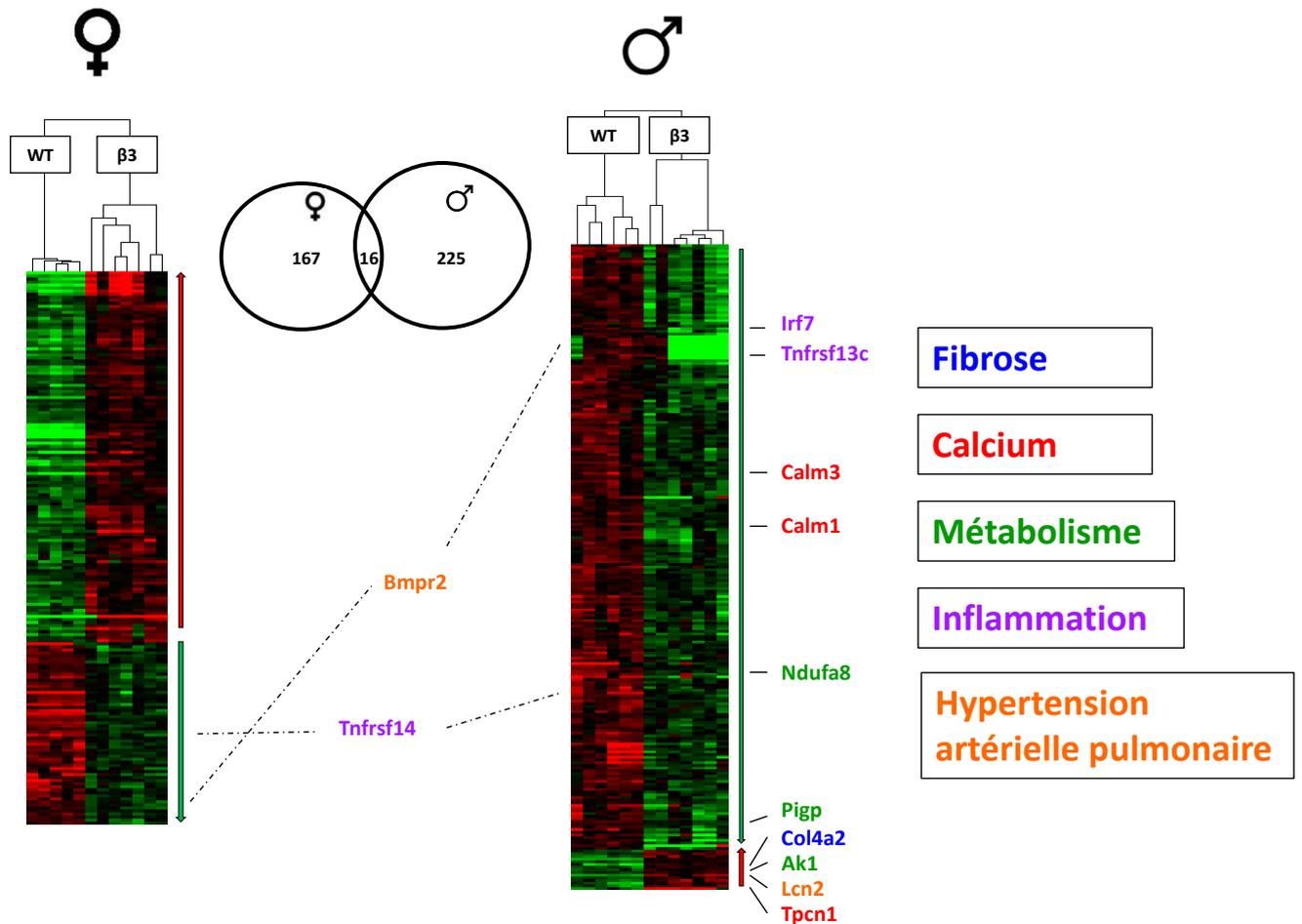
# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

A ce stade du projet, l'ensemble des résultats permet de conclure que les rats mâles  $Tg\beta_3$  partagent avec les patients atteints d'ICFEP des éléments communs de physiopathologie, à savoir l'apparition progressive d'une dysfonction diastolique au cours du vieillissement, laissant supposer qu'une étude approfondie de ce modèle permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et d'élaborer de nouveaux traitements pour les patients. Cette étude descriptive ne permet pas encore de conclure sur les mécanismes impliqués dans la dysfonction diastolique de notre souche de rats transgéniques. Toutefois, différentes études préliminaires permettent d'envisager différentes perspectives d'étude pour notre modèle.

## 1. Etude du transcriptome des rats $Tg\beta_3$

Parallèlement à l'étude phénotypique du modèle, une première approche de transcriptomique a été réalisée au laboratoire, par Marja Steenman, chercheur de l'équipe. Une technique de puce à ADN a été menée sur les rats transgéniques, mâles et femelles, à l'âge de 45 semaines. Les résultats, présentés sous forme d'un clustering hiérarchisé, montrent l'expression différentielle des gènes entre les animaux WT et  $Tg\beta_3$ , où chaque ligne représente un gène, et chaque colonne un échantillon.

On observe tout d'abord que les animaux mâles et femelles ont deux profils d'expression bien distincts. Chez les femelles, 183 gènes sont exprimés de manière différentielle entre les rats WT et  $Tg\beta_3$ , contre 241 pour les mâles. De plus, on peut noter que mâles et femelles partagent seulement 16 gènes dont l'expression est modifiée chez les animaux transgéniques. Cette étude confirme le fort dimorphisme sexuel existant dans notre modèle (Figure 17).



**Figure 17 : Expression des gènes au niveau cardiaque des rats  $Tg\beta 3$  mâles et femelles à l'âge de 45 semaines.**

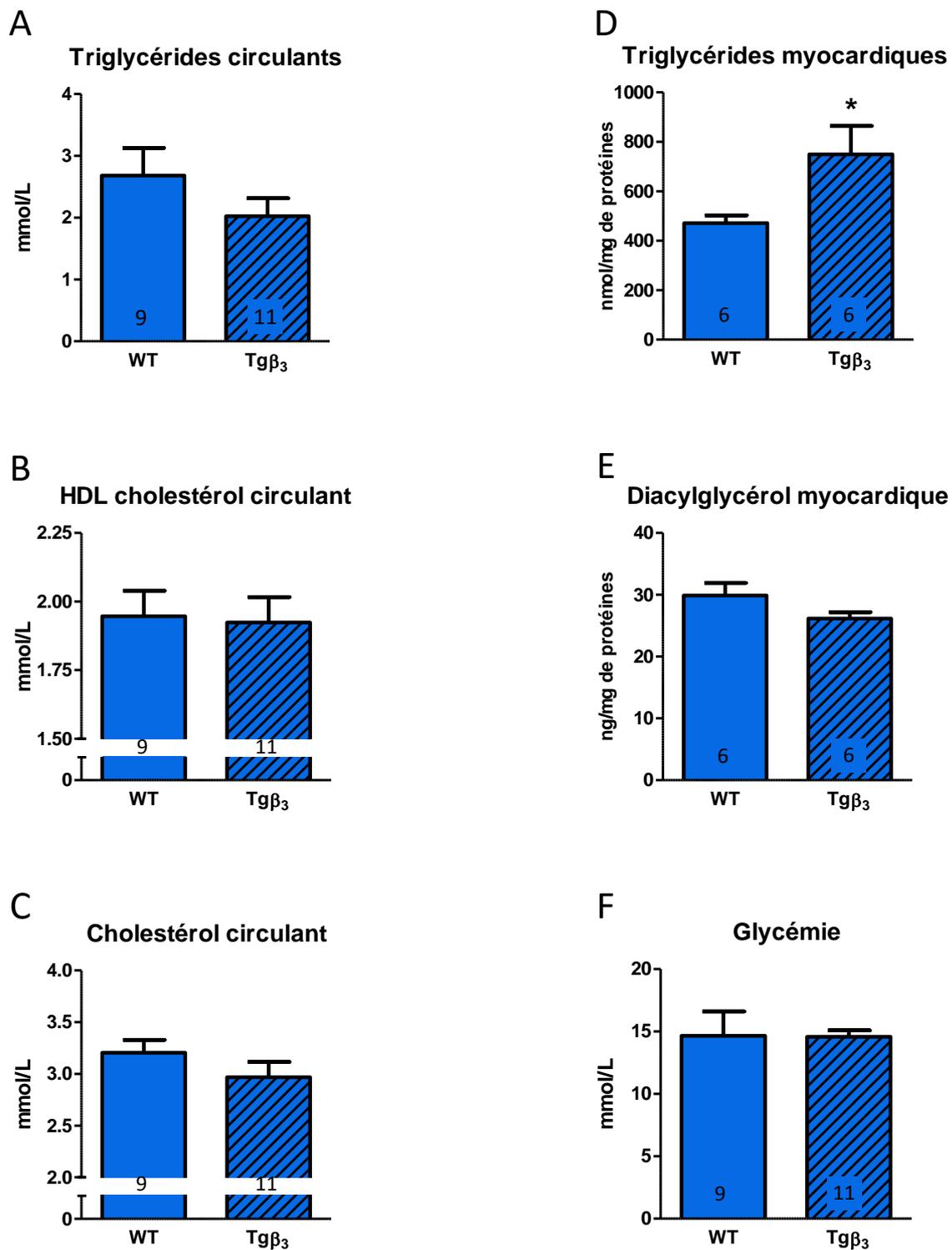
Les couleurs vertes, noires et rouges correspondent respectivement à une sous-expression, une expression non modifiée ou une surexpression par rapport aux WT. Les gènes impliqués dans des grandes fonctions ont été indiqués avec un code couleur sur la droite de la figure. Un diagramme de Venn illustre les gènes communs entre les rats mâles et les rats femelles.

Parmi les gènes potentiellement impliqués dans l'apparition de la dysfonction diastolique, nous pouvons noter la présence de gènes impliqués dans le développement de la fibrose, de l'hypertension artérielle pulmonaire, du métabolisme, de l'inflammation et dans la régulation du cycle du calcium (Figure 17).

Comme nous l'avons vu dans la caractérisation du modèle, le développement de fibrose est un élément déjà observé dans notre modèle à l'âge de 45 semaines, ce qui concorde avec l'analyse transcriptomique. D'un autre côté, nous avons vu qu'à cet âge, les rats ne présentent pas de remodelage des artérioles pulmonaires visibles à l'histologie permettant d'objectiver le développement d'une HTAP, alors que les résultats de l'analyse transcriptomique montrent différents niveaux d'expression de gènes associés à l'HTAP. Ces résultats suggèrent que l'étude a été menée à un stade trop précoce, justifiant l'étude des lésions à un âge plus avancé. De plus, une exploration fonctionnelle par mesure de la pression du VD à 45 semaines serait plus pertinente. Dans la suite de ce manuscrit, il sera abordé la première exploration des anomalies métaboliques, de l'inflammation, et du cycle du calcium, trois grandes fonctions dont l'implication a été suggérée par l'analyse transcriptomique.

## **2. Les anomalies métaboliques**

Il est connu que les patients atteints d'ICFEP présentent fréquemment des anomalies métaboliques, comme du diabète, de l'obésité ou un syndrome métabolique. Une première approche du statut métabolique des animaux a consisté en une analyse sanguine des taux de glucose et lipides circulants. Grâce à cette première analyse, il apparaît que la glycémie, la triglycémie et la cholestérolémie (dont le taux de HDL cholestérol) sont similaires entre les rats sauvages et  $Tg\beta_3$  (Figure 18A, B, C, F). Pour compléter cette première approche, les taux de triglycérides (TG) et de diacylglycérol (DAG) ont été dosés dans le myocarde (Figure 18D). Les rats  $Tg\beta_3$  présentent une augmentation du taux de TG dans le muscle cardiaque, sans modifications du taux de DAG (Figure 18E).



**Figure 18. Paramètres métaboliques des rats Tgβ<sub>3</sub> à 45 semaines.**

A. Triglycérides circulants ; B. HDL cholestérol circulant ; C. Cholestérol total circulant ; D. Triglycérides myocardiques ; E. Diacylglycérol myocardique. F. Glycémie.

Ces données sont particulièrement intéressantes car l'augmentation de TG dans le tissu cardiaque (ou stéatose cardiaque) est une lésion associée au développement de la dysfonction diastolique. Chez les patients diabétiques, la stéatose cardiaque est en effet prédictive de l'apparition d'anomalies de la diastole à long terme [244]. Chez les patients atteints d'ICFEP, plusieurs études ont déjà montré la présence de stéatose dans le myocarde [245, 246], suggérant l'implication des dépôts de tissu adipeux ectopique dans le développement de la dysfonction diastolique. En particulier, l'accumulation de TG a déjà été associée à une diminution des capacités mitochondriales via une dérégulation des voies de signalisation liées à PPAR $\alpha$  [247].

Si les mécanismes exacts reliant la stéatose et la dysfonction diastolique ne sont pas entièrement connus, plusieurs études ont déjà montré qu'il existait un lien étroit avec le métabolisme lipidique cardiaque. Dans un cœur sain, environ 70% de l'ATP est produit via l'utilisation des lipides. Or, dans le cas de l'insuffisance cardiaque, plusieurs études ont déjà montré une diminution de l'utilisation des lipides, et une augmentation relative de l'utilisation des glucides. A terme, les anomalies métaboliques ont alors pour conséquence une diminution des stocks d'ATP, participant alors à la dysfonction cardiaque [248]. Dans notre étude, le dosage des TG et DAG ne permet pas à lui seul d'affirmer la présence d'anomalies métaboliques chez les rats transgéniques. En effet, une accumulation des TG peut être dû à une augmentation de l'entrée des TG dans les cardiomyocytes, une diminution de la  $\beta$ -oxydation, mais également à une diminution d'activité de la CPT1, enzyme responsable du transport des acides gras libres dans la matrice mitochondriale, lieu de la  $\beta$ -oxydation.

Compte-tenu du rôle connu des  $\beta_3$ -AR dans le métabolisme des lipides, une recherche plus approfondie devra être réalisée pour déterminer l'implication du  $\beta_3$ -AR endothélial sur le métabolisme cardiaque [249]. Pour compléter cette première approche, une approche métabolique fonctionnelle à l'aide d'isotopes radioactifs par tomographie à émission de positron (TEP) est en cours avec le Dr Bertrand Collin du Centre Georges François Leclerc. Par ailleurs, il sera nécessaire d'évaluer les différents niveaux du métabolisme lipidique, en dosant notamment les taux de chaque composé intermédiaire.

De plus, l'exploration de cibles dans le métabolisme a été initiée par Justine Dhot, étudiante en Master 2. Son projet de Master consiste à confirmer l'expression de cibles identifiées par l'analyse transcriptomique et d'étudier les voies de signalisation associées. Son projet porte sur l'adénylate kinase 1 (AK1) dont l'expression est augmentée chez les rats Tg $\beta$ <sub>3</sub>. AK1 catalyse le transfert réversible d'un phosphate entre l'ATP et l'AMP selon cette réaction :  $2 \text{ ADP} \leftrightarrow \text{AMP} + \text{ATP}$ , et joue ainsi un rôle important dans la régulation du taux d'AMPc. Décrite comme senseur d'un déséquilibre énergétique, AK1 est impliquée dans la régulation du métabolisme cardiaque, ainsi que dans de nombreuses voies de signalisation impliquant l'AMPc [250].

### **3. L'anémie et l'état proinflammatoire**

L'étude des paramètres hématologiques des rats WT et Tg $\beta$ <sub>3</sub> révèle un profil tout à fait similaire entre les rats sauvages et transgéniques (Tableau 14). Au niveau de la lignée érythrocytaire, les rats Tg $\beta$ <sub>3</sub> ne présentent aucune anémie, et ont un taux d'hémoglobine similaire aux rats sauvages. De plus, aucune anomalie du nombre ou de la qualité des hématies n'a été relevée. Dans notre modèle, les troubles de la diastole ne sont donc pas associés à la présence d'une anémie.

Au niveau des paramètres de la lignée leucocytaire, les rats Tg $\beta$ <sub>3</sub> possèdent une numération/formule leucocytaire similaire aux rats sauvages. Le nombre total de leucocytes n'est pas modifié, ainsi que les différentes populations de leucocytes circulants. Le nombre de plaquettes est également similaire entre les rats sauvages et Tg $\beta$ <sub>3</sub>, avec une tendance à une diminution de la taille des plaquettes, bien que non statistiquement significatif.

**Tableau 14. Paramètres hématologiques des rats WT (n=8) et Tgβ<sub>3</sub> (n=5) à l'âge de 45 semaines.**

Paramètres	45 semaines	
	WT (n=8)	Tgβ <sub>3</sub> (n=5)
<b>Paramètres hématologiques de la lignée rouge</b>		
Hématies (Téra/L)	8,624 ± 0,157	8,858 ± 0,116
Hémoglobine (g/dL)	14,138 ± 0,254	14,700 ± 0,314
Hématocrite (%)	46,925 ± 1,211	48,460 ± 1,240
Volume globulaire moyen (fL)	54,450 ± 1,079	54,720 ± 1,261
Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (g/dL)	30,388 ± 0,531	30,340 ± 0,410
<b>Numération-Formule leucocytaire</b>		
Leucocytes (L/μL)	8,810 ± 0,617	8,832 ± 0,797
Granulocytes neutrophiles (K/μL)	2,915 ± 0,260	2,722 ± 0,366
Lymphocytes (K/μL)	5,357 ± 0,463	5,672 ± 0,627
Monocytes (K/μL)	0,493 ± 0,044	0,364 ± 0,062
Granulocytes éosinophiles (K/μL)	0,030 ± 0,010	0,056 ± 0,008
Granulocytes basophiles (K/μL)	0,010 ± 0,007	0,018 ± 0,018
<b>Plaquettes</b>		
Plaquettes (K/μL)	687,75 ± 50,88	651,75 ± 125,88
Volume plaquettaire moyen (fl)	6,475 ± 0,301	5,475 ± 0,332

Il était important de vérifier les paramètres hématologiques des rats, compte-tenu de la localisation particulière du transgène chez les rats transgéniques, à savoir au niveau de l'endothélium. En effet, les cellules endothéliales tapissent également les niches de la moelle osseuse dans laquelle se déroule la différenciation des lignées sanguines [251]. La modification endothéliale de notre modèle pouvait potentiellement induire des différences hématologiques et, sachant que l'anémie et l'état pro-inflammatoire chronique sont fortement associés au développement de l'ICFEP, il était donc nécessaire de vérifier ces données.

En revanche, ces premiers résultats concernant le nombre de leucocytes circulants totaux ne permettent pas d'écarter des différences dans les sous-populations de chaque leucocyte. Tout d'abord, il est connu que les monocytes, une fois différenciés en macrophages, peuvent s'orienter vers une réponse de type M1 (spécialisés dans la réponse pro-inflammatoire et l'élimination de pathogènes) ou de type M2 (produisant une réponse anti-inflammatoire favorisant la cicatrisation). Chez les patients atteints d'ICFEP, les macrophages sont majoritaires de type M2, favorisant donc des phénomènes fibrotiques [252].

De plus, ces données sont complétées dans cette étude par l'analyse des profils des monocytes circulants. Les monocytes peuvent être classés en fonction de leur expression du CD14 et du CD16, on en distingue alors trois types. Les monocytes dits classiques représentent 85% des monocytes totaux et expriment uniquement le CD14. Les monocytes dits intermédiaires expriment majoritairement le CD14, et une petite proportion de CD16. Enfin, les monocytes atypiques expriment en proportion similaire les CD14 et CD16 [252]. Chaque sous-population de monocyte possède des propriétés qui leur sont propres, qui sont résumées dans le Tableau 15.

**Tableau 15. Sous-populations des monocytes et leurs fonctions.**

	Monocyte classique	Monocyte intermédiaire	Monocytes atypiques
Profil d'expression	CD14++ CD16-	CD14++ CD16+	CD14+ CD16++
Distribution	85%	5%	10%
Cytokines produites	IL1, MCP1, IL6, IL10, TNF $\alpha$	Faible sécrétion de cytokines	IL10, TNF $\alpha$ , IL1, IL6, MCP1
Fonction	Phagocytose, production de ROS et MMP, sécrétion de cytokines	Phagocytose, angiogénèse, action anti-inflammatoire	Action pro-fibrotique, action anti-inflammatoire

Adapté de Glezeva et al. 2015

De manière intéressante, les monocytes intermédiaires et atypiques ont été associés au développement de diverses maladies, telles que l'athérosclérose, le sepsis, ou l'arthrite rhumatoïde. Une étude de Glezeva et al. (2015) a pu mettre en évidence que, parallèlement à l'augmentation du nombre total de cellules inflammatoires, chacune de ces trois populations de monocytes était augmentée chez les malades atteints d'ICFEP.

Il convient également de considérer que nous n'avons investigué que les cellules sanguines circulantes. Or, il est important de noter que chez les malades atteints d'ICFEP, les

cellules immunitaires infiltrent le myocarde. Westerman et al (2011) a ainsi pu montrer la présence d'une infiltration leucocytaire dans des biopsies myocardiques de patients, composée de macrophages et de lymphocytes. Cette infiltration était associée à la sécrétion de TGF $\beta$  et au développement de fibrose [124]. De manière intéressante, une étude de Nevers et al. (2015), a montré que les lymphocytes T des patients atteints d'ICFEP possédaient un pouvoir d'adhésion à l'endothélium supérieur à ceux de patients sains [253]. Dans un modèle de TAC sur souris, cette même étude a montré que l'infiltration lymphocytaire était également associée à une sécrétion *in situ* de TGF $\beta$  et de fibrose cardiaque. Compte tenu de la localisation endothéliale du transgène dans notre modèle, l'étude des populations de cellules immunitaires dans le myocarde revêt un aspect particulièrement important. Quelques études se sont penchées sur l'effet de la stimulation  $\beta_3$ -adrénergique sur le système immunitaire. D'après Roth Flack et al. (2013), la stimulation  $\beta_3$ -adrénergique par un agoniste (CL 316243) promeut l'infiltration neutrophilique et l'inflammation du tissu adipeux chez la souris [254]. Dans une autre étude, Calvani et al. (2015) a montré dans un modèle de mélanome que la stimulation du  $\beta_3$ -AR était associée à la sécrétion de cytokines proinflammatoires, et à une plus grande agressivité de la tumeur [255]. Mais d'un autre côté, Vasina et al. (2008) a montré un effet anti-inflammatoire de la stimulation  $\beta_3$ -adrénergique au niveau intestinal dans un modèle de colite hémorragique [256].

A ce jour, il n'existe pas de données sur l'effet de la stimulation  $\beta_3$ -adrénergique sur l'inflammation au niveau du myocarde dans l'insuffisance cardiaque, et à plus forte raison au niveau endothélial. Au vu du manque de données dans la littérature, le rôle du  $\beta_3$ -AR dans l'inflammation reste encore à déterminer, et cet aspect de la physiopathologie est un point à investiguer dans notre modèle.

#### **4. Les anomalies du cycle du Ca<sup>2+</sup> des rats Tg $\beta_3$**

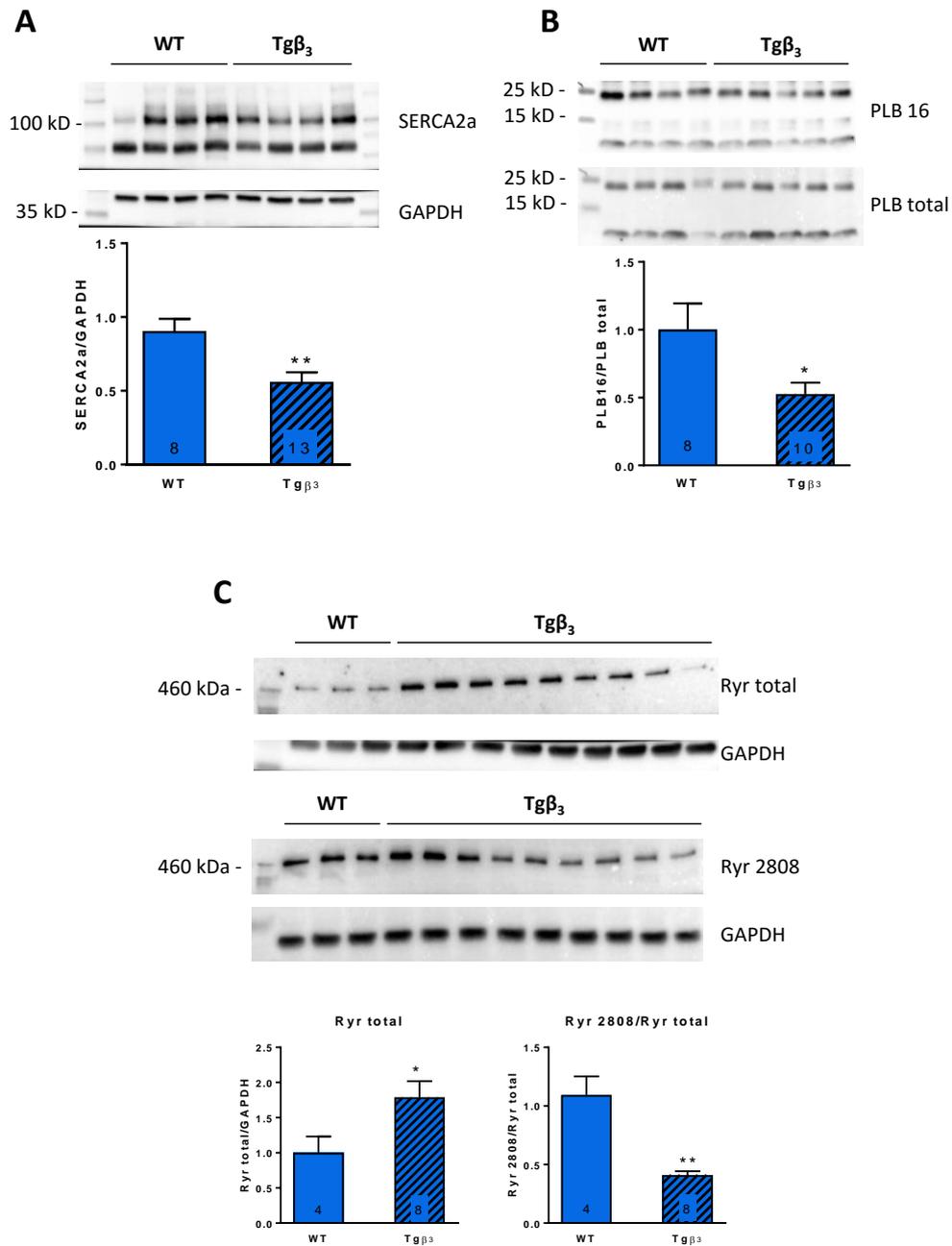
Les anomalies du cycle du Ca<sup>2+</sup> étant un mécanisme physiopathologique majeur des dysfonctions diastoliques, une première approche pour évaluer de putatives anomalies du cycle du calcium des rats Tg $\beta_3$  a été d'étudier l'expression des principales protéines impliquées dans

le relargage et la recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS. Pour cela, des western blot ont été réalisés pour étudier l'expression du PLB, de SERCA2a et de RyR2, ainsi que leur état de phosphorylation.

Chez les rats  $\text{Tg}\beta_3$ , l'expression de SERCA2a (Figure 19A), protéine chargée de la recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS est significativement diminuée de manière significative par rapport aux rats sauvages. De plus, le niveau de phosphorylation du PLB est diminuée traduisant une diminution d'activation de SERCA2a (Figure 19B). De plus, une augmentation significative de l'expression du RyR2 total est associée à une diminution significative de la fraction phosphorylée de RyR2, suggérant une diminution de l'activité de RyR2 (Figure 19C).

La diminution de l'expression de SERCA ainsi que de son activité via la diminution de phosphorylation du PLB sont deux éléments associés à des surcharges calciques et à la survenue d'une dysfonction diastolique [140, 141]. Concernant les modifications d'expression et de fonction du RyR, il est plus délicat de conclure par rapport aux données de la littérature. En effet, peu de données existent sur les anomalies du cycle du calcium des patients en ICFEP. Les données existantes chez les patients atteints d'ICFER montrent une hyperphosphorylation de RyR2, sans modification de son niveau d'expression total [143]. La proportion de RyR2 phosphorylée par rapport au RyR2 total chez les rats transgéniques suggère de moindres capacités de libération du  $\text{Ca}^{2+}$ , ce qui pourrait donner des pistes d'explications de la diminution de la pression développée observée chez les cœurs *ex vivo*.

Ces données seront complétées par des expériences fonctionnelles permettant d'analyser les flux calciques dans les différents groupes d'animaux par la technique IonOptix utilisant la sonde calcique FURA2. Cette approche permettra d'identifier clairement les anomalies du cycle du calcium des rats  $\text{Tg}\beta_3$ , et d'objectiver la présence d'une surcharge en  $\text{Ca}^{2+}$ , qui est un élément critique pour le développement d'une dysfonction diastolique, mais encore trop peu investigué dans la littérature récente.

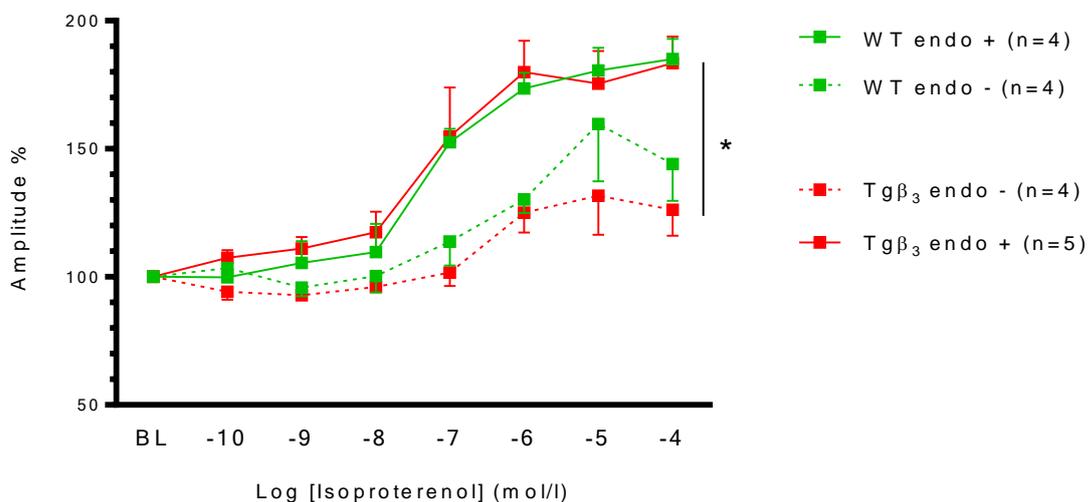


**Figure 19 : Expression des protéines du calcium dans le myocarde de rats WT et Tgβ<sub>3</sub> à l'âge de 45 semaines.**

A. Expression de SERCA2a. B. Expression du PLB et PLB phosphorylé sur la sérine 16. C. Expression de RyR et de RyR phosphorylée sur la sérine 2808. SERCA2a : pompe Ca<sup>2+</sup>-ATPase du réticulum sarcoplasmique PLB : phospholamban, RyR : récepteur à la ryanodine. La quantité de protéine totale est exprimée par un ratio par rapport à la GAPDH. \* : p<0,05

## 5. Le rôle de l'endothélium et du $\beta_3$ -AR chez les rats $Tg\beta_3$

Afin d'étudier l'effet de l'endothélium sur la contractilité myocardique dans notre modèle, des courbes concentrations-réponses ont été réalisées sur les muscles papillaires de rat, en présence et en absence d'endothélium. Une courbe concentration-réponse à l'isoprénaline, un agoniste non sélectif des récepteurs  $\beta$ -AR, a été réalisée. Chez les rats WT, et en présence d'endothélium, l'isoprénaline provoque une augmentation concentration-dépendante de l'amplitude de contraction. Après abrasion de l'endothélium, présentent une diminution similaire de l'amplitude maximale de contraction (Figure 20). Chez les  $Tg\beta_3$ , la réponse à l'isoprénaline est similaire à celle observée chez les WT, en présence et en absence d'endothélium.

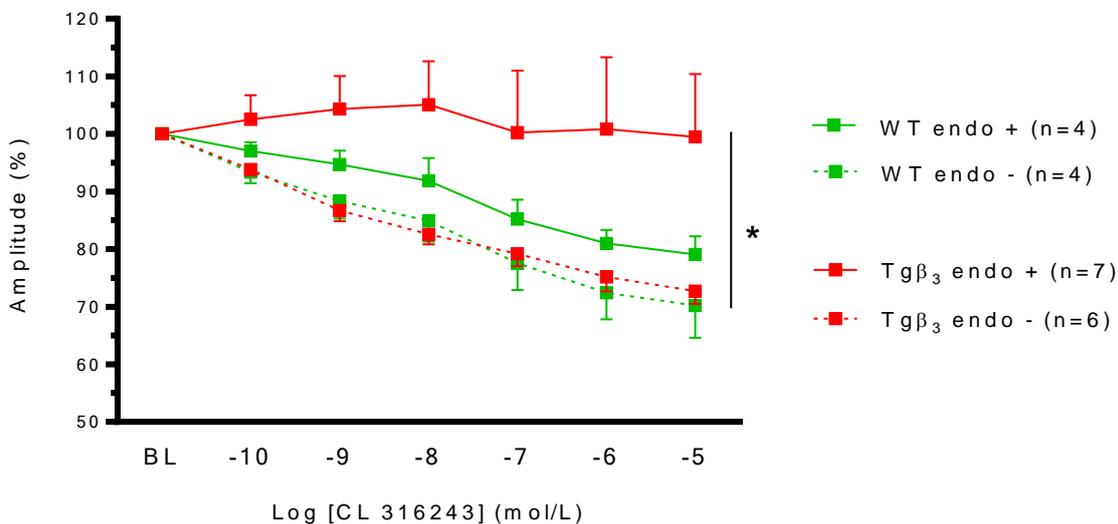


**Figure 20. Mesure de la contractilité des muscles papillaires en présence et en absence d'endothélium suite à l'administration de doses croissantes d'isoprotérénol, chez les rats sauvages et transgéniques âgés de 45 semaines.**

BL : Baseline ; \* :  $p < 0,05$  vs endo +

Ces résultats sont concordants avec l'étude de l'expression des différents sous-types de  $\beta$ -AR par qRT-PCR. En effet, comme montré précédemment dans ce manuscrit, l'expression des  $\beta_1$ -AR et  $\beta_2$ -AR n'est pas modifiée chez les rat  $Tg\beta_3$ , or, l'isoprénaline est un agoniste non sélectif des  $\beta$ -AR.

Pour étudier plus spécifiquement l'effet d'une stimulation  $\beta_3$ -adrénergique, des courbes concentration-réponse à un agoniste  $\beta_3$ -AR, le CL 316243, ont été réalisées. Afin de s'assurer de la stimulation spécifique des  $\beta_3$ -AR, la manipulation est réalisée en présence d'inhibiteurs relatifs des  $\beta_1$ -AR (CGP 20712A) et des  $\beta_2$ -AR (ICI 118,551). Chez les rats sauvages, l'ajout de CL 316243 provoque une diminution concentration-dépendante de l'amplitude de contraction. L'abrasion de l'endothélium n'entraîne pas de modification de la réponse  $\beta_3$ -AR sur l'amplitude de contraction. Chez les rats transgéniques, l'effet inotrope négatif induit par la stimulation des  $\beta_3$ -AR est aboli en présence de l'endothélium. En revanche, en absence d'endothélium, le CL 316243 produit un effet inotrope négatif concentration-dépendant (Figure 21).



**Figure 21. Mesure de la contractilité des muscles papillaires en présence et en absence d'endothélium suite à l'administration de doses croissantes de CL 316243, chez les rats sauvages et transgéniques âgés de 45 semaines.**

BL : Baseline ; \* :  $p < 0,05$  vs Tg $\beta_3$  endo +

Ces observations soulèvent plusieurs points de réflexion. Une hypothèse est le couplage des récepteurs avec différentes protéines G. En effet, si l'action du  $\beta_3$ -AR localisé dans les ventricules décrit classiquement un couplage avec une protéine  $G_i$  et la stimulation de la voie du NO/sGC/GMPc, plusieurs études ont rapporté un couplage possible avec une protéine  $G_s$  dans différents tissus et types cellulaires.

Dans des modèles cellulaires, Bronnikov et al. (1999) ont montré dans les cellules des tissus adipeux brun différents couplages du  $\beta_3$ -AR : alors que récepteurs des adipocytes immatures se couplent préférentiellement avec une protéine Gi, dans des adipocytes matures les  $\beta_3$ -AR sont couplés avec une protéine Gs, entraînant la formation d'AMPc [257]. Plus récemment, Hatanaka et al. (2013), ont également montré sur des cellules CHO transfectées avec le gène du  $\beta_3$ -AR que la stimulation de ces récepteurs était associée à une augmentation de la production d'AMPc [258]. Chez la souris, Sato et al. (2005) ont également décrit un couplage différentiel des  $\beta_3$ -AR en fonction de leur épissage alternatif. En effet, dans cette espèce, le  $\beta_3$ -AR existe sous deux isoformes :  $\beta_{3a}$ -AR et  $\beta_{3b}$ -AR. L'épissage différentiel de ces deux isoformes affecte l'extrémité C-terminale des récepteurs, et conditionne leur affinité pour une protéine Gi ou Gs. Le  $\beta_{3b}$ -AR peut être couplé à une protéine Gs ou Gi tandis que le  $\beta_{3a}$ -AR, à l'extrémité C-terminale tronquée, est capable de se coupler à une protéine Gs [259].

A l'heure actuelle, aucune donnée n'existe ni chez le rat, ni dans les cellules endothéliales. Au vu de nos données obtenues les muscles papillaires de notre modèle, l'étude du couplage des  $\beta_3$ -AR endothéliaux revêt un aspect important. Il est intéressant de noter qu'une augmentation du couplage des  $\beta_3$ -AR avec une protéine Gi est associée avec des effets cardioprotecteurs, comme Trappanese et al. (2013) l'ont montré dans le cas de l'ischémie reperfusion [51].

De plus, ces observations soulèvent un deuxième point : celui de la localisation des  $\beta_3$ -AR. Dans notre modèle, les effets de la surexpression  $\beta_3$ -adrénergique sur la contraction des muscles papillaires sont dus aux récepteurs endothéliaux spécifiquement, et non à un remodelage  $\beta$ -adrénergique au niveau des cardiomyocytes. Ainsi, notre modèle soutient fortement les récentes théories impliquant un dysfonctionnement endothélial dans le développement de l'ICFEP. Il est d'ailleurs intéressant d'observer que dans un autre modèle de surexpression du  $\beta_3$ -AR, où le récepteur est exprimé spécifiquement dans les cardiomyocytes, le phénotype est animaux est totalement différent. En effet, dans ce modèle, il apparaît que la surexpression a un effet protecteur, et avec l'implication des eNOS et nNOS [44].

De plus, les comorbidités associées à l'ICFEP sont connues pour être associée à une dysfonction endothéliale, et dernièrement, une hypothèse avancée pour expliquer la survenue de la dysfonction diastolique chez les patients implique l'établissement d'un état pro-inflammatoire chronique, altérant progressivement les fonctions endothéliales [260]. Ces processus sont soupçonnés d'entraîner une diminution de la biodisponibilité du NO, et une perturbation de la voie NO-GMPc-PKG dans les cardiomyocytes, entraînant alors des anomalies responsables de la dysfonction diastolique (remodelage cardiaque, augmentation de la rigidité cardiaque, fibrose...). Le rat Tg $\beta_3$  étant caractérisé par une atteinte spécifique de l'endothélium, l'usage de ce modèle permettra de mieux définir les liens existants entre ces différents éléments. L'étude de la voie du NO de notre modèle sera réalisée en collaboration avec le Pr. Jean-Luc Balligand de l'Université Catholique de Louvain.

## **6. L'impact des comorbidités sur les rats Tg $\beta_3$**

Comme présenté en introduction de ce manuscrit, les comorbidités jouent un rôle prépondérant dans le développement de l'ICFEP. Notre modèle a quant à lui été caractérisé dans des conditions basales, et son étude a montré qu'il ne développait aucune des comorbidités classiquement décrites spontanément. Il présente, comme les patients, des différences de phénotype en fonction du sexe, mais à ce jour, nous ne sommes pas en mesure d'expliquer l'absence de dysfonction cardiaque chez les femelles.

Dans la suite de ce projet, le modèle sera utilisé pour étudier l'impact des comorbidités sur l'apparition de la dysfonction diastolique. Dans ce but, une comorbidité majeure de l'ICFEP a été choisie : l'obésité. Dans ce nouveau protocole, une obésité sera induite chez les rats grâce à l'emploi d'un régime hyperlipidique et hyperglucidique (régime dit "western diet"). Les conditions expérimentales de ce nouveau protocole ne sont pas sans rappeler le profil des rats obèses Zucker. Cette souche, qui présente une mutation sur le gène de la leptine, présente une obésité et précoce, induisant dès l'âge de 8 semaines les premiers signes d'une dysfonction diastolique, sans toutefois présenter de diabète ou d'hypertension artérielle.

En collaboration avec les Dr Paul Mulder et Antoine Ouvrard-Pascaud de l'Université de Rouen, nous comparerons le phénotype de notre modèle dans un contexte d'obésité avec le modèle de rat Zucker. Au cours de ce protocole, les animaux mâles et femelles seront suivis jusqu'à l'âge de 45 semaines. Une étude au cours du temps de la fonction cardiaque sera réalisée par échographie, et au terme de ce protocole, la fibrose myocardique, ainsi que le remodelage de la vascularisation pulmonaire et des glomérules rénaux seront investigués, afin de déterminer l'effet de l'obésité sur la précocité et la sévérité des dysfonctions décrites dans notre modèle.

## CONCLUSION GENERALE

Au terme de nos travaux de caractérisation, de nombreux arguments physiologiques et physiopathologiques indiquent que le modèle du rat Tg $\beta_3$  partage avec les patients souffrant d'ICFEP de nombreux points communs. Il est particulièrement intéressant d'observer que ces rats présentent avec le vieillissement, et de manière chronique, des altérations du remplissage qui ont été objectivées *in vivo* par échographie. L'augmentation progressive du ratio E/A révèle l'apparition progressive d'une restriction du remplissage par l'oreillette gauche, et est associée à une élévation des pressions de remplissage, deux points essentiels retrouvés classiquement chez les patients. La caractérisation *in vivo* a également été confirmée par les données obtenues *ex vivo* par la méthode du cœur isolé travaillant. En effet, l'élévation de la pression du VG en fin de diastole, la diminution de la vitesse de relaxation et l'altération de la dynamique de remplissage observée *ex vivo* confirme la dysfonction diastolique observée *in vivo*. Par ailleurs, l'utilisation de la technique du cœur isolé a permis de mettre en lumière une apparente fonction d'éjection préservée dans des conditions de repos, mais qui n'est pas conservée dans des conditions de stress. L'augmentation de la précharge des cœurs Tg $\beta_3$  induit chez ces derniers une détérioration de la fonction cardiaque, et une diminution drastique du débit cardiaque, qui n'est pas sans évoquer l'intolérance à l'effort des patients atteints d'ICFEP (Tableau 16). A l'avenir, ces données *ex vivo* devront être confirmées *in vivo* à l'aide de tests d'intolérance à l'effort sur tapis-roulant, ou de natation.

Au niveau cellulaire et moléculaire, plusieurs éléments de physiopathologie concordent également avec les éléments connus de physiopathologie de l'ICFEP. Les animaux présentent une fibrose myocardique diffuse, et les premiers éléments à notre disposition suggèrent que les rats Tg $\beta_3$  présentent également une altération de leur métabolisme lipidique et de l'homéostasie du Ca<sup>2+</sup>, bien que ces éléments doivent être confirmés par de plus amples investigations. De plus, au vu des données obtenues *ex vivo* sur les muscles papillaires en présence et en absence d'endothélium, la surexpression du  $\beta_3$ -AR au niveau endothélial semble être au cœur de la physiopathologie de notre modèle. Ce dernier point est particulièrement intéressant à mettre en parallèle avec les dernières données de la littérature, où les cellules endothéliales et leur effet

paracrine sur les cardiomyocytes sont suspectés d'être fortement liés à l'apparition de dysfonction diastolique [260].

De plus, chez l'homme comme dans notre modèle, les patients présentent des profils différents en fonction de leur sexe. Il est en effet préoccupant de constater qu'à ce jour, l'immense majorité des études précliniques portent exclusivement sur des animaux de sexe mâle, alors que l'ICFEP affecte un grand nombre de femmes, qui, généralement, présentent un profil très différent de celui des hommes atteints. Le modèle du rat Tg $\beta_3$  est également particulièrement innovant dans son approche dans la mesure où les particularités phénotypiques de chaque sexe seront prises en comptes, analysées, et comparées.

**Tableau 16. Similitudes et différences entre les patients en ICFEP et les rats Tg $\beta_3$**   
PTDVG : pression télédiastolique du VG

	Homme - ICFEP	Rat - Tg $\beta_3$
Âge	> 70 y.	45 semaines
Sexe	♀ > ♂	♂
Fraction d'éjection	=	=
PTDVG	↑	↑
Dysfonction diastolique	+	+
Fibrose myocardique	+	+
Inadaptation au stress	+	+
Comorbidités	+	-

A plus long terme, les données de transcriptomique obtenues dans notre modèle de rat transgénique seront également comparées à des données obtenues sur une cohorte de patients. En effet, les cardiologues du groupe de Chantal Gauthier travaillent actuellement à l'élaboration d'une cohorte de patients atteints d'HFpEF. L'objectif est à terme de pouvoir faire l'étude comparée de notre modèle et des patients humains, dans le but de valider les cibles pressenties par notre étude préclinique. Par ce biais, nous espérons déterminer des cibles thérapeutiques.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. B., B.G.a.R., *Physiologie humaine appliquée*, in *Fonction cardiaque gauche*. 2009.
2. Bristow, M.R. and R. Ginsburg, *Beta 2 receptors on myocardial cells in human ventricular myocardium*. *Am J Cardiol*, 1986. **57**(12): p. 3F-6F.
3. Brodde, O.E., H. Bruck, and K. Leineweber, *Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance*. *J Pharmacol Sci*, 2006. **100**(5): p. 323-37.
4. Candelore, M.R., et al., *Pharmacological characterization of a recently described human beta 3-adrenergic receptor mutant*. *Endocrinology*, 1996. **137**(6): p. 2638-41.
5. Chambers, J., et al., *Beta 3-adrenoceptor agonist-induced down-regulation of Gs alpha and functional desensitization in a Chinese hamster ovary cell line expressing a beta 3-adrenoceptor refractory to down-regulation*. *Biochem J*, 1994. **303** ( Pt 3): p. 973-8.
6. Chaudhry, A. and J.G. Granneman, *Influence of cell type upon the desensitization of the beta 3-adrenergic receptor*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. **271**(3): p. 1253-8.
7. Curran, P.K. and P.H. Fishman, *Endogenous beta 3- but not beta 1-adrenergic receptors are resistant to agonist-mediated regulation in human SK-N-MC neurotumor cells*. *Cell Signal*, 1996. **8**(5): p. 355-64.
8. Vrydag, W., A.E. Alewijnse, and M.C. Michel, *Do gene polymorphisms alone or in combination affect the function of human beta3-adrenoceptors?* *Br J Pharmacol*, 2009. **156**(1): p. 127-34.
9. Hutchinson, D.S., B.A. Evans, and R.J. Summers, *beta(3)-adrenoceptor regulation and relaxation responses in mouse ileum*. *Br J Pharmacol*, 2000. **129**(6): p. 1251-9.
10. Vaniotis, G., B.G. Allen, and T.E. Hebert, *Nuclear GPCRs in cardiomyocytes: an insider's view of beta-adrenergic receptor signaling*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. **301**(5): p. H1754-64.
11. Defer, N., M. Best-Belpomme, and J. Hanoune, *Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000. **279**(3): p. F400-16.
12. Dessauer, C.W., *Adenylyl cyclase--A-kinase anchoring protein complexes: the next dimension in cAMP signaling*. *Mol Pharmacol*, 2009. **76**(5): p. 935-41.
13. Tsunematsu, T., et al., *Coupling of beta1-adrenergic receptor to type 5 adenylyl cyclase and its physiological relevance in cardiac myocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **458**(3): p. 531-5.
14. Nikolaev, V.O., et al., *Cyclic AMP imaging in adult cardiac myocytes reveals far-reaching beta1-adrenergic but locally confined beta2-adrenergic receptor-mediated signaling*. *Circ Res*, 2006. **99**(10): p. 1084-91.
15. Chen-Izu, Y., et al., *G(i)-dependent localization of beta(2)-adrenergic receptor signaling to L-type Ca(2+) channels*. *Biophys J*, 2000. **79**(5): p. 2547-56.
16. Jurevicius, J. and R. Fischmeister, *cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca2+ channels by beta-adrenergic agonists*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(1): p. 295-9.
17. Keef, K.D., J.R. Hume, and J. Zhong, *Regulation of cardiac and smooth muscle Ca(2+) channels (Ca(V)1.2a,b) by protein kinases*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001. **281**(6): p. C1743-56.
18. Kushnir, A. and A.R. Marks, *The ryanodine receptor in cardiac physiology and disease*. *Adv Pharmacol*, 2010. **59**: p. 1-30.
19. Kentish, J.C., et al., *Phosphorylation of troponin I by protein kinase A accelerates relaxation and crossbridge cycle kinetics in mouse ventricular muscle*. *Circ Res*, 2001. **88**(10): p. 1059-65.

20. Cerra, M.C. and S. Imbrogno, *Phospholamban and cardiac function: a comparative perspective in vertebrates*. Acta Physiol (Oxf), 2012. **205**(1): p. 9-25.
21. Yamasaki, R., et al., *Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes*. Circ Res, 2002. **90**(11): p. 1181-8.
22. Zile, M.R., et al., *Myocardial stiffness in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: contributions of collagen and titin*. Circulation, 2015. **131**(14): p. 1247-59.
23. Fischmeister, R., et al., *Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases*. Circ Res, 2006. **99**(8): p. 816-28.
24. Mika, D., et al., *PDE4B mediates local feedback regulation of beta(1)-adrenergic cAMP signaling in a sarcolemmal compartment of cardiac myocytes*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 5): p. 1033-42.
25. Xiang, Y.K., *Compartmentalization of beta-adrenergic signals in cardiomyocytes*. Circ Res, 2011. **109**(2): p. 231-44.
26. Calaghan, S., L. Kozera, and E. White, *Compartmentalisation of cAMP-dependent signalling by caveolae in the adult cardiac myocyte*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **45**(1): p. 88-92.
27. Brodde, O.E. and M.C. Michel, *Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart*. Pharmacol Rev, 1999. **51**(4): p. 651-90.
28. Daaka, Y., L.M. Luttrell, and R.J. Lefkowitz, *Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A*. Nature, 1997. **390**(6655): p. 88-91.
29. Zhang, W., et al., *beta-Adrenergic receptor-PI3K signaling crosstalk in mouse heart: elucidation of immediate downstream signaling cascades*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26581.
30. Francis, S.H., et al., *cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action*. Pharmacol Rev, 2010. **62**(3): p. 525-63.
31. Tansey, M.G., et al., *Ca(2+)-dependent phosphorylation of myosin light chain kinase decreases the Ca2+ sensitivity of light chain phosphorylation within smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1994. **269**(13): p. 9912-20.
32. Aslam, M., et al., *cAMP/PKA antagonizes thrombin-induced inactivation of endothelial myosin light chain phosphatase: role of CPI-17*. Cardiovasc Res, 2010. **87**(2): p. 375-84.
33. Nakamura, K., et al., *cGMP-dependent relaxation of smooth muscle is coupled with the change in the phosphorylation of myosin phosphatase*. Circ Res, 2007. **101**(7): p. 712-22.
34. Sauzeau, V., et al., *Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca2+ sensitization of contraction in vascular smooth muscle*. J Biol Chem, 2000. **275**(28): p. 21722-9.
35. Barman, S.A., et al., *cAMP activates BKCa channels in pulmonary arterial smooth muscle via cGMP-dependent protein kinase*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **284**(6): p. L1004-11.
36. Shi, Y., et al., *PKA phosphorylation of SUR2B subunit underscores vascular KATP channel activation by beta-adrenergic receptors*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **293**(3): p. R1205-14.
37. Tian, L., et al., *Distinct stoichiometry of BKCa channel tetramer phosphorylation specifies channel activation and inhibition by cAMP-dependent protein kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(32): p. 11897-902.
38. Yang, Y., et al., *PKA-dependent activation of the vascular smooth muscle isoform of KATP channels by vasoactive intestinal polypeptide and its effect on relaxation of the mesenteric resistance artery*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(1): p. 88-96.
39. Komalavilas, P. and T.M. Lincoln, *Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta*. J Biol Chem, 1996. **271**(36): p. 21933-8.
40. Morgado, M., et al., *Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(2): p. 247-66.

41. Gauthier, C., et al., *Functional beta3-adrenoceptor in the human heart*. J Clin Invest, 1996. **98**(2): p. 556-62.
42. Aragon, J.P., et al., *Beta3-adrenoreceptor stimulation ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury via endothelial nitric oxide synthase and neuronal nitric oxide synthase activation*. J Am Coll Cardiol, 2011. **58**(25): p. 2683-91.
43. Birenbaum, A., et al., *Involvement of beta 3-adrenoceptor in altered beta-adrenergic response in senescent heart: role of nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide*. Anesthesiology, 2008. **109**(6): p. 1045-53.
44. Watts, V.L., et al., *Anti-hypertrophic and anti-oxidant effect of beta3-adrenergic stimulation in myocytes requires differential neuronal NOS phosphorylation*. J Mol Cell Cardiol, 2013. **62**: p. 8-17.
45. Massion, P.B. and J.L. Balligand, *Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice*. J Physiol, 2003. **546**(Pt 1): p. 63-75.
46. Cheng, H.J., et al., *Upregulation of functional beta(3)-adrenergic receptor in the failing canine myocardium*. Circ Res, 2001. **89**(7): p. 599-606.
47. Gauthier, C., et al., *Interspecies differences in the cardiac negative inotropic effects of beta(3)-adrenoceptor agonists*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **290**(2): p. 687-93.
48. Angelone, T., et al., *Beta3-adrenoceptors modulate left ventricular relaxation in the rat heart via the NO-cGMP-PKG pathway*. Acta Physiol (Oxf), 2008. **193**(3): p. 229-39.
49. Skeberdis, V.A., et al., *beta3-adrenergic receptor activation increases human atrial tissue contractility and stimulates the L-type Ca2+ current*. J Clin Invest, 2008. **118**(9): p. 3219-27.
50. Niu, X., et al., *beta3-Adrenoreceptor stimulation protects against myocardial infarction injury via eNOS and nNOS activation*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e98713.
51. Trappanese, D.M., et al., *Chronic beta1-adrenergic blockade enhances myocardial beta3-adrenergic coupling with nitric oxide-cGMP signaling in a canine model of chronic volume overload: new insight into mechanisms of cardiac benefit with selective beta1-blocker therapy*. Basic Res Cardiol, 2015. **110**(1): p. 456.
52. Moniotte, S., et al., *Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium*. Circulation, 2001. **103**(12): p. 1649-55.
53. Dessy, C., et al., *Endothelial beta3-adrenoceptors mediate vasorelaxation of human coronary microarteries through nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization*. Circulation, 2004. **110**(8): p. 948-54.
54. Kou, R. and T. Michel, *Epinephrine regulation of the endothelial nitric-oxide synthase: roles of RAC1 and beta3-adrenergic receptors in endothelial NO signaling*. J Biol Chem, 2007. **282**(45): p. 32719-29.
55. Tagaya, E., et al., *Atypical adrenoceptor-mediated relaxation of canine pulmonary artery through a cyclic adenosine monophosphate-dependent pathway*. Lung, 1999. **177**(5): p. 321-32.
56. Trochu, J.N., et al., *Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta*. Br J Pharmacol, 1999. **128**(1): p. 69-76.
57. Anversa, P., et al., *Stereological measurement of cellular and subcellular hypertrophy and hyperplasia in the papillary muscle of adult rat*. J Mol Cell Cardiol, 1980. **12**(8): p. 781-95.
58. Wu, K.K., *Endothelial prostaglandin and nitric oxide synthesis in atherogenesis and thrombosis*. J Formos Med Assoc, 1996. **95**(9): p. 661-6.
59. Brutsaert, D.L., *Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity*. Physiol Rev, 2003. **83**(1): p. 59-115.
60. Aird, W.C., *The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome*. Blood, 2003. **101**(10): p. 3765-77.
61. Kuruvilla, L. and C.C. Kartha, *Molecular mechanisms in endothelial regulation of cardiac function*. Mol Cell Biochem, 2003. **253**(1-2): p. 113-23.

62. Brutsaert, D.L., et al., *Effects of damaging the endocardial surface on the mechanical performance of isolated cardiac muscle*. *Circ Res*, 1988. **62**(2): p. 358-66.
63. Bras-Silva, C. and A.F. Leite-Moreira, *Obligatory role of the endocardial endothelium in the increase of myocardial distensibility induced by endothelin-1*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2006. **231**(6): p. 876-81.
64. Shen, X., et al., *Endocardial endothelium is a key determinant of force-frequency relationship in rat ventricular myocardium*. *J Appl Physiol (1985)*, 2013. **115**(3): p. 383-93.
65. Li, K., et al., *Effect of dysfunctional vascular endothelium on myocardial performance in isolated papillary muscles*. *Circ Res*, 1993. **72**(4): p. 768-77.
66. Soni, H., et al., *Cardioprotective effect with carbon monoxide releasing molecule-2 (CORM-2) in isolated perfused rat heart: Role of coronary endothelium and underlying mechanism*. *Vascul Pharmacol*, 2010. **53**(1-2): p. 68-76.
67. Bryan, N.S., K. Bian, and F. Murad, *Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2009. **14**: p. 1-18.
68. Balligand, J.L. and P.J. Cannon, *Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(10): p. 1846-58.
69. Chesnais, J.M., R. Fischmeister, and P.F. Mery, *Positive and negative inotropic effects of NO donors in atrial and ventricular fibres of the frog heart*. *J Physiol*, 1999. **518** ( Pt 2): p. 449-61.
70. Casadei, B. and C.E. Sears, *Nitric-oxide-mediated regulation of cardiac contractility and stretch responses*. *Prog Biophys Mol Biol*, 2003. **82**(1-3): p. 67-80.
71. Hammond, J. and J.L. Balligand, *Nitric oxide synthase and cyclic GMP signaling in cardiac myocytes: from contractility to remodeling*. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. **52**(2): p. 330-40.
72. Zaccolo, M. and M.A. Movsesian, *cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology*. *Circ Res*, 2007. **100**(11): p. 1569-78.
73. Yang, L., et al., *Protein kinase G phosphorylates Cav1.2 alpha1c and beta2 subunits*. *Circ Res*, 2007. **101**(5): p. 465-74.
74. Lee, D.I., et al., *PDE5A suppression of acute beta-adrenergic activation requires modulation of myocyte beta-3 signaling coupled to PKG-mediated troponin I phosphorylation*. *Basic Res Cardiol*, 2010. **105**(3): p. 337-47.
75. Mongillo, M., et al., *Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway*. *Circ Res*, 2006. **98**(2): p. 226-34.
76. Burger, D.E., et al., *Neuronal nitric oxide synthase protects against myocardial infarction-induced ventricular arrhythmia and mortality in mice*. *Circulation*, 2009. **120**(14): p. 1345-54.
77. Mozaffarian, D., et al., *Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association*. *Circulation*, 2015. **131**(4): p. e29-322.
78. Owan, T.E., et al., *Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction*. *N Engl J Med*, 2006. **355**(3): p. 251-9.
79. Oktay, A.A., J.D. Rich, and S.J. Shah, *The emerging epidemic of heart failure with preserved ejection fraction*. *Curr Heart Fail Rep*, 2013. **10**(4): p. 401-10.
80. Lam, C.S., et al., *Epidemiology and clinical course of heart failure with preserved ejection fraction*. *Eur J Heart Fail*, 2011. **13**(1): p. 18-28.
81. Shah, R.U., L. Klein, and D.M. Lloyd-Jones, *Heart failure in women: epidemiology, biology and treatment*. *Womens Health (Lond)*, 2009. **5**(5): p. 517-27.
82. Chamberlain, A.M., et al., *Multimorbidity in heart failure: a community perspective*. *Am J Med*, 2015. **128**(1): p. 38-45.
83. Godet-Mardrossian, H., et al., *Patterns of hypertension management in France (ENNS 2006-2007)*. *Eur J Prev Cardiol*, 2012. **19**(2): p. 213-20.
84. Hollander, W., *Role of hypertension in atherosclerosis and cardiovascular disease*. *Am J Cardiol*, 1976. **38**(6): p. 786-800.

85. Johansson, B.B., *Hypertension mechanisms causing stroke*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1999. **26**(7): p. 563-5.
86. Salem, M.M., *Pathophysiology of hypertension in renal failure*. Semin Nephrol, 2002. **22**(1): p. 17-26.
87. Dhingra, A., et al., *Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction*. Curr Heart Fail Rep, 2014. **11**(4): p. 354-65.
88. Izzo, J.L., Jr., *Arterial stiffness and the systolic hypertension syndrome*. Curr Opin Cardiol, 2004. **19**(4): p. 341-52.
89. Kosmala, W., et al., *Progression of left ventricular functional abnormalities in hypertensive patients with heart failure: an ultrasonic two-dimensional speckle tracking study*. J Am Soc Echocardiogr, 2008. **21**(12): p. 1309-17.
90. Leggio, M., et al., *Systo-diastolic ventricular function in patients with hypertension: an echocardiographic tissue doppler imaging evaluation study*. Int J Cardiovasc Imaging, 2007. **23**(2): p. 177-84.
91. Charlemagne, A., et al., *Epidemiology of atrial fibrillation in France: extrapolation of international epidemiological data to France and analysis of French hospitalization data*. Arch Cardiovasc Dis, 2011. **104**(2): p. 115-24.
92. Bursi, F., et al., *Pulmonary pressures and death in heart failure: a community study*. J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(3): p. 222-31.
93. Leung, C.C., et al., *Prevalence and risk factors of pulmonary hypertension in patients with elevated pulmonary venous pressure and preserved ejection fraction*. Am J Cardiol, 2010. **106**(2): p. 284-6.
94. Salamon, J.N., et al., *Outcomes in World Health Organization group II pulmonary hypertension: mortality and readmission trends with systolic and preserved ejection fraction-induced pulmonary hypertension*. J Card Fail, 2014. **20**(7): p. 467-75.
95. Guazzi, M., *Pulmonary hypertension in heart failure preserved ejection fraction: prevalence, pathophysiology, and clinical perspectives*. Circ Heart Fail, 2014. **7**(2): p. 367-77.
96. Segers, V.F., D.L. Brutsaert, and G.W. De Keulenaer, *Pulmonary hypertension and right heart failure in heart failure with preserved left ventricular ejection fraction: pathophysiology and natural history*. Curr Opin Cardiol, 2012. **27**(3): p. 273-80.
97. Santé, H.A.d., *Treatment strategy for Glycaemic control in type 2 diabetes.*, A.N.d.S.d.M.e.d.P.d. Santé, Editor. 2013.
98. Grundy, S.M., et al., *Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association*. Circulation, 1999. **100**(10): p. 1134-46.
99. Samson, R., et al., *Clinical Phenotypes in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction*. J Am Heart Assoc, 2016. **5**(1).
100. Cheyron, S.G.d., *Le syndrome cardiorénal : diagnostic, physiopathologie et prise en charge*. Réanimation, 2014, Volume 23, Issue 6, pp 585–594. **23**(6): p. 585–594
101. Adams, K.F., Jr., et al., *Characteristics and outcomes of patients hospitalized for heart failure in the United States: rationale, design, and preliminary observations from the first 100,000 cases in the Acute Decompensated Heart Failure National Registry (ADHERE)*. Am Heart J, 2005. **149**(2): p. 209-16.
102. Brouwers, F.P., 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, 2013. **34**(19): p. 1424-31.
103. Gori, M., et al., *Association between renal function and cardiovascular structure and function in heart failure with preserved ejection fraction*. Eur Heart J, 2014. **35**(48): p. 3442-51.

104. Unger, E.D., et al., *Association of chronic kidney disease with abnormal cardiac mechanics and adverse outcomes in patients with heart failure and preserved ejection fraction*. *Eur J Heart Fail*, 2016. **18**(1): p. 103-12.
105. Moe, G., *Heart failure with multiple comorbidities*. *Curr Opin Cardiol*, 2016. **31**(2): p. 209-16.
106. Ather, S., et al., *Impact of noncardiac comorbidities on morbidity and mortality in a predominantly male population with heart failure and preserved versus reduced ejection fraction*. *J Am Coll Cardiol*, 2012. **59**(11): p. 998-1005.
107. von Haehling, S., et al., *Anaemia among patients with heart failure and preserved or reduced ejection fraction: results from the SENIORS study*. *Eur J Heart Fail*, 2011. **13**(6): p. 656-63.
108. Mohammed, S.F., et al., *Comorbidity and ventricular and vascular structure and function in heart failure with preserved ejection fraction: a community-based study*. *Circ Heart Fail*, 2012. **5**(6): p. 710-9.
109. Lindman, B.R., et al., *Cardiovascular phenotype in HFpEF patients with or without diabetes: a RELAX trial ancillary study*. *J Am Coll Cardiol*, 2014. **64**(6): p. 541-9.
110. Maurer, M.S. and D. Mancini, *HFpEF: is splitting into distinct phenotypes by comorbidities the pathway forward?* *J Am Coll Cardiol*, 2014. **64**(6): p. 550-2.
111. Kao, D.P., et al., *Characterization of subgroups of heart failure patients with preserved ejection fraction with possible implications for prognosis and treatment response*. *Eur J Heart Fail*, 2015. **17**(9): p. 925-35.
112. Shah, S.J., et al., *Phenomapping for novel classification of heart failure with preserved ejection fraction*. *Circulation*, 2015. **131**(3): p. 269-79.
113. Pitt, B., et al., *Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction*. *N Engl J Med*, 2014. **370**(15): p. 1383-92.
114. Rossignol, P. and F. Zannad, *Regional differences in heart failure with preserved ejection fraction trials: when nephrology meets cardiology but east does not meet west*. *Circulation*, 2015. **131**(1): p. 7-10.
115. Ferreira, J.P., et al., *Geographic differences in heart failure trials*. *Eur J Heart Fail*, 2015. **17**(9): p. 893-905.
116. Kristensen, S.L., et al., *International geographic variation in event rates in trials of heart failure with preserved and reduced ejection fraction*. *Circulation*, 2015. **131**(1): p. 43-53.
117. Dokainish, H., et al., *Heart Failure in Africa, Asia, the Middle East and South America: The INTER-CHF study*. *Int J Cardiol*, 2016. **204**: p. 133-41.
118. Karaye, K.M. and A.A. Akintunde, *Insights into heart failure with preserved ejection fraction among admitted Nigerian patients*. *Int J Cardiol*, 2013. **170**(2): p. e36-7.
119. Magana-Serrano, J.A., et al., *Prevalence of heart failure with preserved ejection fraction in Latin American, Middle Eastern, and North African Regions in the I PREFER study (Identification of Patients With Heart Failure and PREserved Systolic Function: an epidemiological regional study)*. *Am J Cardiol*, 2011. **108**(9): p. 1289-96.
120. McMurray, J., et al., *Clinical features and contemporary management of patients with low and preserved ejection fraction heart failure: baseline characteristics of patients in the Candesartan in Heart failure-Assessment of Reduction in Mortality and morbidity (CHARM) programme*. *Eur J Heart Fail*, 2003. **5**(3): p. 261-70.
121. Kawaguchi, M., et al., *Combined ventricular systolic and arterial stiffening in patients with heart failure and preserved ejection fraction: implications for systolic and diastolic reserve limitations*. *Circulation*, 2003. **107**(5): p. 714-20.
122. Maurer, M.S., I. Kronzon, and D. Burkhoff, *Ventricular pump function in heart failure with normal ejection fraction: insights from pressure-volume measurements*. *Prog Cardiovasc Dis*, 2006. **49**(3): p. 182-95.
123. Melenovsky, V., et al., *Cardiovascular features of heart failure with preserved ejection fraction versus nonfailing hypertensive left ventricular hypertrophy in the urban Baltimore community: the role of atrial remodeling/dysfunction*. *J Am Coll Cardiol*, 2007. **49**(2): p. 198-207.

124. Westermann, D., et al., *Cardiac inflammation contributes to changes in the extracellular matrix in patients with heart failure and normal ejection fraction*. *Circ Heart Fail*, 2011. **4**(1): p. 44-52.
125. Shah, A.M., et al., *Cardiac structure and function in heart failure with preserved ejection fraction: baseline findings from the echocardiographic study of the Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure with an Aldosterone Antagonist trial*. *Circ Heart Fail*, 2014. **7**(1): p. 104-15.
126. Schober, K.E. and V. Chetboul, *Echocardiographic evaluation of left ventricular diastolic function in cats: Hemodynamic determinants and pattern recognition*. *J Vet Cardiol*, 2015. **17 Suppl 1**: p. S102-33.
127. Tan, Y.T., et al., *The pathophysiology of heart failure with normal ejection fraction: exercise echocardiography reveals complex abnormalities of both systolic and diastolic ventricular function involving torsion, untwist, and longitudinal motion*. *J Am Coll Cardiol*, 2009. **54**(1): p. 36-46.
128. Wang, J., et al., *Preserved left ventricular twist and circumferential deformation, but depressed longitudinal and radial deformation in patients with diastolic heart failure*. *Eur Heart J*, 2008. **29**(10): p. 1283-9.
129. Borbely, A., et al., *Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium*. *Circ Res*, 2009. **104**(6): p. 780-6.
130. van Heerebeek, L., et al., *Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure*. *Circulation*, 2006. **113**(16): p. 1966-73.
131. Gilbert, R., et al., *The carboxyl terminus of myosin binding protein C (MyBP-C, C-protein) specifies incorporation into the A-band of striated muscle*. *J Cell Sci*, 1996. **109 ( Pt 1)**: p. 101-11.
132. Gruen, M. and M. Gautel, *Mutations in beta-myosin S2 that cause familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC) abolish the interaction with the regulatory domain of myosin-binding protein-C*. *J Mol Biol*, 1999. **286**(3): p. 933-49.
133. Oakley, C.E., et al., *Myosin binding protein C: structural abnormalities in familial hypertrophic cardiomyopathy*. *Cell Res*, 2004. **14**(2): p. 95-110.
134. Marston, S., et al., *How do MYBPC3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy?* *J Muscle Res Cell Motil*, 2012. **33**(1): p. 75-80.
135. Kittleson, M.D., et al., *Familial hypertrophic cardiomyopathy in maine coon cats: an animal model of human disease*. *Circulation*, 1999. **99**(24): p. 3172-80.
136. Meurs, K.M., et al., *A substitution mutation in the myosin binding protein C gene in ragdoll hypertrophic cardiomyopathy*. *Genomics*, 2007. **90**(2): p. 261-4.
137. Meurs, K.M., et al., *A cardiac myosin binding protein C mutation in the Maine Coon cat with familial hypertrophic cardiomyopathy*. *Hum Mol Genet*, 2005. **14**(23): p. 3587-93.
138. Rosas, P.C., et al., *Phosphorylation of cardiac Myosin-binding protein-C is a critical mediator of diastolic function*. *Circ Heart Fail*, 2015. **8**(3): p. 582-94.
139. Morgan, J.P., et al., *Abnormal intracellular calcium handling, a major cause of systolic and diastolic dysfunction in ventricular myocardium from patients with heart failure*. *Circulation*, 1990. **81**(2 Suppl): p. III21-32.
140. Mercadier, J.J., et al., *Altered sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>(+)-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure*. *J Clin Invest*, 1990. **85**(1): p. 305-9.
141. Schwinger, R.H., et al., *Reduced Ca<sup>2+</sup>-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation*. *J Mol Cell Cardiol*, 1999. **31**(3): p. 479-91.
142. Mattiello, J.A., et al., *Contribution of reverse-mode sodium-calcium exchange to contractions in failing human left ventricular myocytes*. *Cardiovasc Res*, 1998. **37**(2): p. 424-31.

143. Marx, S.O., et al., *PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts*. Cell, 2000. **101**(4): p. 365-76.
144. Yano, M., et al., *Altered stoichiometry of FKBP12.6 versus ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca(2+) leak through ryanodine receptor in heart failure*. Circulation, 2000. **102**(17): p. 2131-6.
145. Rodriguez, J.S., et al., *Increased Na(+)/Ca(2)(+) exchanger expression/activity constitutes a point of inflection in the progression to heart failure of hypertensive rats*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e96400.
146. Primessnig, U., et al., *Novel pathomechanisms of cardiomyocyte dysfunction in a model of heart failure with preserved ejection fraction*. Eur J Heart Fail, 2016. **18**(8): p. 987-97.
147. Kamimura, D., et al., *Ca<sup>2+</sup> entry mode of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger as a new therapeutic target for heart failure with preserved ejection fraction*. Eur Heart J, 2012. **33**(11): p. 1408-16.
148. Kasner, M., et al., *Heterogeneous responses of systolic and diastolic left ventricular function to exercise in patients with heart failure and preserved ejection fraction*. ESC Heart Fail, 2015. **2**(3): p. 121-132.
149. Mohammed, S.F., et al., *Coronary microvascular rarefaction and myocardial fibrosis in heart failure with preserved ejection fraction*. Circulation, 2015. **131**(6): p. 550-9.
150. Heymans, S., et al., *Increased cardiac expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 is related to cardiac fibrosis and dysfunction in the chronic pressure-overloaded human heart*. Circulation, 2005. **112**(8): p. 1136-44.
151. Matsumura, S., et al., *Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 599-609.
152. Azevedo, E.P., et al., *Activated microglia mediate synapse loss and short-term memory deficits in a mouse model of transthyretin-related oculoleptomeningeal amyloidosis*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e789.
153. Gonzalez-Lopez, E., et al., *Wild-type transthyretin amyloidosis as a cause of heart failure with preserved ejection fraction*. Eur Heart J, 2015. **36**(38): p. 2585-94.
154. Mohammed, S.F., et al., *Left ventricular amyloid deposition in patients with heart failure and preserved ejection fraction*. JACC Heart Fail, 2014. **2**(2): p. 113-22.
155. Lam, C.S. and D.L. Brutsaert, *Endothelial dysfunction: a pathophysiologic factor in heart failure with preserved ejection fraction*. J Am Coll Cardiol, 2012. **60**(18): p. 1787-9.
156. Marechaux, S., et al., *Vascular and Microvascular Endothelial Function in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction*. J Card Fail, 2016. **22**(1): p. 3-11.
157. Akiyama, E., et al., *Incremental prognostic significance of peripheral endothelial dysfunction in patients with heart failure with normal left ventricular ejection fraction*. J Am Coll Cardiol, 2012. **60**(18): p. 1778-86.
158. Borlaug, B.A., et al., *Impaired chronotropic and vasodilator reserves limit exercise capacity in patients with heart failure and a preserved ejection fraction*. Circulation, 2006. **114**(20): p. 2138-47.
159. Borlaug, B.A., et al., *Global cardiovascular reserve dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction*. J Am Coll Cardiol, 2010. **56**(11): p. 845-54.
160. Saltin, B., *Hemodynamic adaptations to exercise*. Am J Cardiol, 1985. **55**(10): p. 42D-47D.
161. Fuchs, F. and Y.P. Wang, *Sarcomere length versus interfilament spacing as determinants of cardiac myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity and Ca<sup>2+</sup> binding*. J Mol Cell Cardiol, 1996. **28**(7): p. 1375-83.
162. Shimaie, J., et al., *Determinants of Effort Intolerance in Patients With Heart Failure: Combined Echocardiography and Cardiopulmonary Stress Protocol*. JACC Heart Fail, 2015. **3**(10): p. 803-14.
163. Kosmala, W., et al., *Contributions of Nondiastolic Factors to Exercise Intolerance in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction*. J Am Coll Cardiol, 2016. **67**(6): p. 659-70.

164. Borlaug, B.A., et al., *Diastolic relaxation and compliance reserve during dynamic exercise in heart failure with preserved ejection fraction*. Heart, 2011. **97**(12): p. 964-9.
165. Wang, J., et al., *Importance of chronotropic response and left ventricular long-axis function for exercise performance in patients with heart failure and preserved ejection fraction*. Int J Cardiol, 2016. **202**: p. 339-43.
166. Brubaker, P.H. and D.W. Kitzman, *Chronotropic incompetence: causes, consequences, and management*. Circulation, 2011. **123**(9): p. 1010-20.
167. Hundley, W.G., et al., *Cardiac cycle-dependent changes in aortic area and distensibility are reduced in older patients with isolated diastolic heart failure and correlate with exercise intolerance*. J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(3): p. 796-802.
168. Desai, A.S., et al., *Central aortic stiffness is increased in patients with heart failure and preserved ejection fraction*. J Card Fail, 2009. **15**(8): p. 658-64.
169. Haykowsky, M.J., et al., *Relationship of flow-mediated arterial dilation and exercise capacity in older patients with heart failure and preserved ejection fraction*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2013. **68**(2): p. 161-7.
170. Matsue, Y., et al., *Endothelial dysfunction measured by peripheral arterial tonometry predicts prognosis in patients with heart failure with preserved ejection fraction*. Int J Cardiol, 2013. **168**(1): p. 36-40.
171. Ponikowski, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure*. Rev Esp Cardiol (Engl Ed), 2016. **69**(12): p. 1167.
172. Yancy, C.W., et al., *2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines*. Circulation, 2013. **128**(16): p. 1810-52.
173. Yusuf, S., et al., *Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial*. Lancet, 2003. **362**(9386): p. 777-81.
174. Massie, B.M., et al., *Irbesartan in patients with heart failure and preserved ejection fraction*. N Engl J Med, 2008. **359**(23): p. 2456-67.
175. Deswal, A., et al., *Results of the Randomized Aldosterone Antagonism in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction trial (RAAM-PEF)*. J Card Fail, 2011. **17**(8): p. 634-42.
176. Edelmann, F., et al., *Effect of spironolactone on diastolic function and exercise capacity in patients with heart failure with preserved ejection fraction: the Aldo-DHF randomized controlled trial*. JAMA, 2013. **309**(8): p. 781-91.
177. Cleland, J.G., et al., *The perindopril in elderly people with chronic heart failure (PEP-CHF) study*. Eur Heart J, 2006. **27**(19): p. 2338-45.
178. Borlaug, B.A., et al., *Response to Letter Regarding Article, "Effects of Sildenafil on Ventricular and Vascular Function in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction"*. Circ Heart Fail, 2015. **8**(4): p. 840.
179. Conraads, V.M., et al., *Effects of the long-term administration of nebivolol on the clinical symptoms, exercise capacity, and left ventricular function of patients with diastolic dysfunction: results of the ELANDD study*. Eur J Heart Fail, 2012. **14**(2): p. 219-25.
180. Yamamoto, K., et al., *Effects of carvedilol on heart failure with preserved ejection fraction: the Japanese Diastolic Heart Failure Study (J-DHF)*. Eur J Heart Fail, 2013. **15**(1): p. 110-8.
181. Redfield, M.M., 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, 2013. **309**(12): p. 1268-77.
182. Fukuta, H., et al., *Statin therapy may be associated with lower mortality in patients with diastolic heart failure: a preliminary report*. Circulation, 2005. **112**(3): p. 357-63.
183. Ouzounian, M., et al., *Statin therapy and clinical outcomes in heart failure: a propensity-matched analysis*. J Card Fail, 2009. **15**(3): p. 241-8.

184. Liu, G., et al., *Meta-analysis of the effect of statins on mortality in patients with preserved ejection fraction*. Am J Cardiol, 2014. **113**(7): p. 1198-204.
185. Houser, S.R., et al., *Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association*. Circ Res, 2012. **111**(1): p. 131-50.
186. Moens, A.L., et al., *Reversal of cardiac hypertrophy and fibrosis from pressure overload by tetrahydrobiopterin: efficacy of recoupling nitric oxide synthase as a therapeutic strategy*. Circulation, 2008. **117**(20): p. 2626-36.
187. Molina, E.J., et al., *Reverse remodeling is associated with changes in extracellular matrix proteases and tissue inhibitors after mesenchymal stem cell (MSC) treatment of pressure overload hypertrophy*. J Tissue Eng Regen Med, 2009. **3**(2): p. 85-91.
188. Norton, G.R., et al., *Heart failure in pressure overload hypertrophy. The relative roles of ventricular remodeling and myocardial dysfunction*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(4): p. 664-71.
189. Yemane, H., et al., *Neurohumoral mechanisms in deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertension in rats*. Exp Physiol, 2010. **95**(1): p. 51-5.
190. Silberman, G.A., et al., *Uncoupled cardiac nitric oxide synthase mediates diastolic dysfunction*. Circulation, 2010. **121**(4): p. 519-28.
191. Gurgun, D., et al., *Sex-specific mTOR signaling determines sexual dimorphism in myocardial adaptation in normotensive DOCA-salt model*. Hypertension, 2013. **61**(3): p. 730-6.
192. Klotz, S., et al., *Development of heart failure in chronic hypertensive Dahl rats: focus on heart failure with preserved ejection fraction*. Hypertension, 2006. **47**(5): p. 901-11.
193. Groban, L., et al., *Progressive diastolic dysfunction in the female mRen(2). Lewis rat: influence of salt and ovarian hormones*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2008. **63**(1): p. 3-11.
194. Dupont, S., et al., *The onset of left ventricular diastolic dysfunction in SHR rats is not related to hypertrophy or hypertension*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **302**(7): p. H1524-32.
195. LeGrice, I.J., et al., *Progression of myocardial remodeling and mechanical dysfunction in the spontaneously hypertensive rat*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **303**(11): p. H1353-65.
196. Reed, A.L., et al., *Diastolic dysfunction is associated with cardiac fibrosis in the senescence-accelerated mouse*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(3): p. H824-31.
197. Sylvia A. McCune, P.B.B.a.H.F.S.J., *SHHF/Mcc-cp Rat: Model of Obesity, Non-insulin-dependent Diabetes, and Congestive Heart Failure*. ILAR Journal, 1990. **32**(3): p. 23-27.
198. Anderson, K.M., et al., *The myocardial beta-adrenergic system in spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) rats*. Hypertension, 1999. **33**(1 Pt 2): p. 402-7.
199. Zucker, L.M. and H.N. Antoniadis, *Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat "fatty"*. Endocrinology, 1972. **90**(5): p. 1320-30.
200. Zhou, X., et al., *Nebivolol improves diastolic dysfunction and myocardial remodeling through reductions in oxidative stress in the Zucker obese rat*. Hypertension, 2010. **55**(4): p. 880-8.
201. Fang, Y., et al., *Improvement of left ventricular diastolic function induced by beta-blockade: a comparison between nebivolol and metoprolol*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **51**(2): p. 168-76.
202. Augstein, P. and E. Salzsieder, *Morphology of pancreatic islets: a time course of pre-diabetes in Zucker fatty rats*. Methods Mol Biol, 2009. **560**: p. 159-89.
203. Clark, J.B., C.J. Palmer, and W.N. Shaw, *The diabetic Zucker fatty rat*. Proc Soc Exp Biol Med, 1983. **173**(1): p. 68-75.
204. Slieker, L.J., et al., *Glucose transporter levels in tissues of spontaneously diabetic Zucker fa/fa rat (ZDF/drt) and viable yellow mouse (Avy/a)*. Diabetes, 1992. **41**(2): p. 187-93.
205. Radovits, T., et al., *An altered pattern of myocardial histopathological and molecular changes underlies the different characteristics of type-1 and type-2 diabetic cardiac dysfunction*. J Diabetes Res, 2015. **2015**: p. 728741.
206. Hamdani, N., et al., *Deranged myofilament phosphorylation and function in experimental heart failure with preserved ejection fraction*. Cardiovasc Res, 2013. **97**(3): p. 464-71.

207. Reil, J.C., et al., *Heart rate reduction by If-inhibition improves vascular stiffness and left ventricular systolic and diastolic function in a mouse model of heart failure with preserved ejection fraction*. Eur Heart J, 2013. **34**(36): p. 2839-49.
208. Munagala, V.K., et al., *Ventricular structure and function in aged dogs with renal hypertension: a model of experimental diastolic heart failure*. Circulation, 2005. **111**(9): p. 1128-35.
209. Rienzo, M., et al., *Impaired left ventricular function in the presence of preserved ejection in chronic hypertensive conscious pigs*. Basic Res Cardiol, 2012. **107**(6): p. 298.
210. Hart, C.Y., et al., *Load versus humoral activation in the genesis of early hypertensive heart disease*. Circulation, 2001. **104**(2): p. 215-20.
211. Ferasin, L., *Feline myocardial disease. 1: Classification, pathophysiology and clinical presentation*. J Feline Med Surg, 2009. **11**(1): p. 3-13.
212. Carlos Sampedrano, C., et al., *Systolic and diastolic myocardial dysfunction in cats with hypertrophic cardiomyopathy or systemic hypertension*. J Vet Intern Med, 2006. **20**(5): p. 1106-15.
213. Fox, P.R., et al., *Spontaneously occurring restrictive nonhypertrophied cardiomyopathy in domestic cats: a new animal model of human disease*. Cardiovasc Pathol, 2014. **23**(1): p. 28-34.
214. Linney, C.J., et al., *Left atrial size, atrial function and left ventricular diastolic function in cats with hypertrophic cardiomyopathy*. J Small Anim Pract, 2014. **55**(4): p. 198-206.
215. Biasato, I., et al., *Anatomopathological staging of feline hypertrophic cardiomyopathy through quantitative evaluation based on morphometric and histopathological data*. Res Vet Sci, 2015. **102**: p. 136-41.
216. Christiansen, L.B., et al., *Ultrastructural myocardial changes in seven cats with spontaneous hypertrophic cardiomyopathy*. J Vet Cardiol, 2015. **17 Suppl 1**: p. S220-32.
217. Ferasin, L., et al., *Feline idiopathic cardiomyopathy: a retrospective study of 106 cats (1994-2001)*. J Feline Med Surg, 2003. **5**(3): p. 151-9.
218. Wess, G., R. Sarkar, and K. Hartmann, *Assessment of left ventricular systolic function by strain imaging echocardiography in various stages of feline hypertrophic cardiomyopathy*. J Vet Intern Med, 2010. **24**(6): p. 1375-82.
219. Kobayashi, D.L., et al., *Hypertension in cats with chronic renal failure or hyperthyroidism*. J Vet Intern Med, 1990. **4**(2): p. 58-62.
220. Littman, M.P., *Spontaneous systemic hypertension in 24 cats*. J Vet Intern Med, 1994. **8**(2): p. 79-86.
221. Syme, H.M., et al., *Prevalence of systolic hypertension in cats with chronic renal failure at initial evaluation*. J Am Vet Med Assoc, 2002. **220**(12): p. 1799-804.
222. Colliard, L., et al., *Prevalence and risk factors of obesity in an urban population of healthy cats*. J Feline Med Surg, 2009. **11**(2): p. 135-40.
223. German, A.J., et al., *A simple, reliable tool for owners to assess the body condition of their dog or cat*. J Nutr, 2006. **136**(7 Suppl): p. 2031S-2033S.
224. Kienzle, E. and K. Moik, *A pilot study of the body weight of pure-bred client-owned adult cats*. Br J Nutr, 2011. **106 Suppl 1**: p. S113-5.
225. Russell, K., et al., *Influence of feeding regimen on body condition in the cat*. J Small Anim Pract, 2000. **41**(1): p. 12-7.
226. Lederer, R., et al., *Frequency of feline diabetes mellitus and breed predisposition in domestic cats in Australia*. Vet J, 2009. **179**(2): p. 254-8.
227. Chetboul, V., et al., *Spontaneous feline hypertension: clinical and echocardiographic abnormalities, and survival rate*. J Vet Intern Med, 2003. **17**(1): p. 89-95.
228. Little, C.J. and G. Gettinby, *Heart failure is common in diabetic cats: findings from a retrospective case-controlled study in first-opinion practice*. J Small Anim Pract, 2008. **49**(1): p. 17-25.

229. Payne, J.R., D.C. Brodbelt, and V. Luis Fuentes, *Cardiomyopathy prevalence in 780 apparently healthy cats in rehoming centres (the CatScan study)*. J Vet Cardiol, 2015. **17 Suppl 1**: p. S244-57.
230. Raij, L., S. Azar, and W. Keane, *Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats*. Kidney Int, 1984. **26**(2): p. 137-43.
231. Eckel, L.A., *The ovarian hormone estradiol plays a crucial role in the control of food intake in females*. Physiol Behav, 2011. **104**(4): p. 517-24.
232. Ferrand, C., et al., *Prolonged treatment with the beta3-adrenergic agonist CL 316243 induces adipose tissue remodeling in rat but not in guinea pig: 1) fat store depletion and desensitization of beta-adrenergic responses*. J Physiol Biochem, 2006. **62**(2): p. 89-99.
233. Lonnqvist, F., et al., *A pathogenic role of visceral fat beta 3-adrenoceptors in obesity*. J Clin Invest, 1995. **95**(3): p. 1109-16.
234. Mottillo, E.P., et al., *Coupling of lipolysis and de novo lipogenesis in brown, beige, and white adipose tissues during chronic beta3-adrenergic receptor activation*. J Lipid Res, 2014. **55**(11): p. 2276-86.
235. Bordicchia, M., et al., *Nebivolol induces, via beta3 adrenergic receptor, lipolysis, uncoupling protein 1, and reduction of lipid droplet size in human adipocytes*. J Hypertens, 2014. **32**(2): p. 389-96.
236. Gettys, T.W., P.J. Harkness, and P.M. Watson, *The beta 3-adrenergic receptor inhibits insulin-stimulated leptin secretion from isolated rat adipocytes*. Endocrinology, 1996. **137**(9): p. 4054-7.
237. dos Santos, R.L., et al., *Sex hormones in the cardiovascular system*. Horm Mol Biol Clin Investig, 2014. **18**(2): p. 89-103.
238. Knowlton, A.A., *Estrogen and cardiovascular disease: aging and estrogen loss at the heart of the matter?* Future Cardiol, 2012. **8**(1): p. 9-12.
239. Murphy, E., *Estrogen signaling and cardiovascular disease*. Circ Res, 2011. **109**(6): p. 687-96.
240. Chambliss, K.L. and P.W. Shaul, *Rapid activation of endothelial NO synthase by estrogen: evidence for a steroid receptor fast-action complex (SRFC) in caveolae*. Steroids, 2002. **67**(6): p. 413-9.
241. Qin, W., et al., *Genistein alleviates pressure overload-induced cardiac dysfunction and interstitial fibrosis in mice*. Br J Pharmacol, 2015. **172**(23): p. 5559-72.
242. Matori, H., et al., *Genistein, a soy phytoestrogen, reverses severe pulmonary hypertension and prevents right heart failure in rats*. Hypertension, 2012. **60**(2): p. 425-30.
243. Gardner, C.D., L.M. Chatterjee, and A.A. Franke, *Effects of isoflavone supplements vs. soy foods on blood concentrations of genistein and daidzein in adults*. J Nutr Biochem, 2009. **20**(3): p. 227-34.
244. Rijzewijk, L.J., et al., *Myocardial steatosis is an independent predictor of diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus*. J Am Coll Cardiol, 2008. **52**(22): p. 1793-9.
245. Mahmud, M., et al., *Myocardial steatosis and left ventricular contractile dysfunction in patients with severe aortic stenosis*. Circ Cardiovasc Imaging, 2013. **6**(5): p. 808-16.
246. Wei, J., et al., *Myocardial steatosis as a possible mechanistic link between diastolic dysfunction and coronary microvascular dysfunction in women*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016. **310**(1): p. H14-9.
247. Haemmerle, G., et al., *ATGL-mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR-alpha and PGC-1*. Nat Med, 2011. **17**(9): p. 1076-85.
248. Neubauer, S., *The failing heart--an engine out of fuel*. N Engl J Med, 2007. **356**(11): p. 1140-51.
249. Hom, G.J., et al., *Beta(3)-adrenoceptor agonist-induced increases in lipolysis, metabolic rate, facial flushing, and reflex tachycardia in anesthetized rhesus monkeys*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **297**(1): p. 299-307.

250. Dzeja, P. and A. Terzic, *Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing*. Int J Mol Sci, 2009. **10**(4): p. 1729-72.
251. He, H., et al., *Endothelial cells provide an instructive niche for the differentiation and functional polarization of M2-like macrophages*. Blood, 2012. **120**(15): p. 3152-62.
252. Glezeva, N., et al., *Exaggerated inflammation and monocytosis associate with diastolic dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction: evidence of M2 macrophage activation in disease pathogenesis*. J Card Fail, 2015. **21**(2): p. 167-77.
253. Nevers, T., et al., *Left Ventricular T-Cell Recruitment Contributes to the Pathogenesis of Heart Failure*. Circ Heart Fail, 2015. **8**(4): p. 776-87.
254. Roth Flach, R.J., et al., *beta3-Adrenergic receptor stimulation induces E-selectin-mediated adipose tissue inflammation*. J Biol Chem, 2013. **288**(4): p. 2882-92.
255. Calvani, M., et al., *Norepinephrine promotes tumor microenvironment reactivity through beta3-adrenoreceptors during melanoma progression*. Oncotarget, 2015. **6**(7): p. 4615-32.
256. Vasina, V., et al., *The beta3-adrenoceptor agonist SR58611A ameliorates experimental colitis in rats*. Neurogastroenterol Motil, 2008. **20**(9): p. 1030-41.
257. Bronnikov, G., et al., *beta1 to beta3 switch in control of cyclic adenosine monophosphate during brown adipocyte development explains distinct beta-adrenoceptor subtype mediation of proliferation and differentiation*. Endocrinology, 1999. **140**(9): p. 4185-97.
258. Hatanaka, T., et al., *In vitro and in vivo pharmacological profile of the selective beta3-adrenoceptor agonist mirabegron in rats*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2013. **386**(3): p. 247-53.
259. Sato, M., et al., *Functional domains of the mouse beta3-adrenoceptor associated with differential G protein coupling*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **315**(3): p. 1354-61.
260. Paulus, W.J. and C. Tschope, *A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation*. J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(4): p. 263-71.



# ANNEXES

## **Annexe 1: Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée et cardiomyopathies félines (article de revue)**

### **Human heart failure with preserved ejection versus feline cardiomyopathy: what can we learn from both veterinary and human medicine?**

Lead author: Valentine Prat

#### **Human and feline diastolic diseases**

**Corresponding author:** Valentine Prat, +33 5 35 38 19 50, [valentine.prat@gmail.com](mailto:valentine.prat@gmail.com)

**List of authors:**

Valentine Prat, DVM, l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France

Bertrand Rozec, MD, PhD, l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, Nantes, France

Chantal Gauthier, PhD, l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France

Benjamin Lauzier, PhD, l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France

Submitted at Journal of Cardiovascular Translational Research

## **Abbreviations**

BCS body condition score  
CM cardiomyopathy  
CV cardiovascular  
DCM dilated cardiomyopathy  
DOCA deoxycortisone acetate  
EDT E-wave deceleration time  
FCM feline cardiomyopathy  
GCK glucokinase  
GKRP glucokinase regulatory protein  
GLUT2 glucose transporter 2  
HCM hypertrophic cardiomyopathy  
HF heart failure  
HFpEF heart failure with preserved ejection fraction  
HK1 hexokinase 1  
HT hypertension  
IL interleukine  
IVRT isovolumic relaxation time  
LV left ventricle  
MMP matrix metalloproteinase  
RCM restrictive cardiomyopathy  
TIMP tissue inhibitor metalloproteinase  
TNF $\alpha$  tumor necrosis factor  $\alpha$   
UCM unclassified cardiomyopathy  
V-CAM vascular cell adhesion molecule 1  
WHO World Health Organization  
ZFR Zucker fatty rat

## **Abstract**

Cardiovascular affections are a growing health burden in human populations. Recent advances in cardiology have improved treatments and outcomes for myocardial infarction and arrhythmias, but other conditions still remain poorly understood. To date, the classical approach to study cardiovascular diseases involves rodent models, despite their strong differences with human cardiac physiology. In this context, this review will focus on the common traits between human and feline cardiac diseases, namely heart failure with preserved ejection fraction and feline cardiomyopathies respectively. These two affections share similar pathological patterns and epidemiological characteristics. An improved knowledge would be of interest for both human and feline patients, and could lead to the establishment of a more accurate treatment and therapeutic strategy for medical doctors and veterinary practitioners.

**Key words:** heart failure with preserved ejection fraction, diastolic dysfunction, feline cardiomyopathy, hypertension, obesity, diabetes

## **Introduction**

Cardiovascular (CV) diseases are a major burden among the human population, with a constantly increasing prevalence in correlation with the spread of many CV risks: obesity, diabetes, hypertension, or tobacco consumption. According to the World Health Organization (WHO) and Heart Disease and Stroke Statistics 2015, CV diseases are the leading cause of mortality worldwide, with 17.3 million deaths per year (30% of global deaths [1]).

To improve the understanding of CV diseases and elaborate new treatments, most of the studies involve rodents placed in pathological conditions. Among the commonly used, are rodent strains derived from original strains spontaneously developing a human-like disease are commonly used (e.g., Zucker rat for obesity and insulin resistance, and the SHR rat for hypertension). Other models involve wild-type animals, which undergo a surgical procedure, medical treatment, or any specific protocol to induce a pathological condition. However, the use of small rodents presents several limitations regarding CV physiology, basal characteristics, and natural history of the disease.

Over the past decades, veterinary cardiology has experienced an impressive development. More and more attention has been paid to CV health of domestic animals, and recent insights have allowed veterinary practitioners to manage cardiac diseases with more accuracy. However, many aspects of the pathophysiology of domestic animal disease remains poorly understood. Among CV diseases, feline cardiomyopathies represent a particular interest and has not yet been extensively studied. When considering recent advances in human cardiology, feline and human conditions share several interesting common traits, both at pathological epidemiological and environmental levels.

In this context, this review will focus on two diastolic diseases: heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF), which is becoming the most frequent HF etiology in humans, and feline cardiomyopathy (FCM), which is the most common CV disease in feline populations.

## **Main pathophysiological findings in HFpEF and FCM**

### *Medical definition of HFpEF and FCM*

In human medicine the definition of HFpEF relies on functional criteria. HFpEF is defined by the detection of signs of diastolic dysfunction/HF, associated with an apparently normal systolic function (EF >50%). Interestingly, the classification opposing HF with reduced EF and HFpEF does not take in account the phenomenon of cardiac remodeling in their definitions. In clinical studies, HFpEF patients present various types of remodeling: Shah et al. showed that only 53% of patients present a concentric remodeling or hypertrophy. Other patients present an eccentric hypertrophy (16%) or no visible remodeling (31%) [2].

In veterinary medicine, FCM is primarily classified into hypertrophic CM (HCM), restrictive CM (CM) or dilated CM (DCM). A fourth category known as unclassified CM (UCM) refers to cardiomyopathies that do not fit under other headings. HCM is the most represented form, as it concerns 57.5% of FCM versus 20.7% for RCM, 10.4% for DCM and 10.4% for UCM [3]. However, as Ferasin highlighted in his clinical review [4], this classification presents several limitations, as it includes both anatomical and functional criteria, and does not take into account the potential evolution of the disease from one denomination to another.

It is interesting to point out that in human medicine, the term HCM is usually reserved for pathologies caused by identified genetic mutations [5]. In veterinary medicine, mutations of genes encoding sarcomeric proteins have also been linked to primary HCM, especially in Maine coon, Ragdoll and British shorthair breeds [6-8]. But a great part of HCM cases, defined as "secondary HCM", are not related to specific mutations.

### *General characteristics of human and feline patients*

In human populations, HFpEF is found in the elderly, with an average age of diagnosis of 80 years. Initially, HFpEF was thought to affect more often women, and this was associated with the sex hormone loss occurring at menopause. However, when considering the vast literature concerning HFpEF, it appears that this assertion is not so clear. According to studies,

the percentage of women among HFpEF patients varies from 45% to 73%, which does not allow to properly determine the real impact of sex hormone loss on HFpEF occurrence [9].

Concerning the feline population, notable variations exist according to the breed. For inherited disorders, several studies reported an age of diagnosis of around 2 years old [8,10] in Maine Coon and British Shorthair cats. Trehou-Sechi et al. described a median age of diagnosis of 2.5 years for the Maine Coon and of 3.5 years for the Sphynx [11]. But in the same study, a higher age of diagnosis was reported for Domestic Shorthair (8.0), Chartreux (8.0) and Persian (11.0). In mixed-breed studies, age of diagnosis was comprised between 5 and 18 years, with the majority around 10 years old (Table 1). Interestingly, FCM prevalence was not correlated with either sex or hormonal status, except for a recent study by Payne et al. [12] conducted in a large cohort of cats. In their study, male and neutered animals were more susceptible to develop HCM.

#### *Diastolic dysfunction*

The main characteristic found in both human and feline patients is diastolic impairment. Usually assessed by cardiac echography in Doppler mode, diastolic function is impaired at various levels, according to the disease evolution. Both human and veterinary medicine have described three successive stages of diastolic dysfunction, related to disease evolution and severity.

The early stage of the pathology is characterized by a dynamic alteration generally in the form of an alteration to the myocardial relaxation.. Isovolumic relaxation time (IVRT) and E-wave deceleration time are typically increased, reflecting a delayed passive and active relaxation. At this stage, the impaired relaxation is compensated by a modification of the filling pattern: E/A (early to late) filling ratio is usually decreased, due to the greater part of cardiac filling insured by atrial contraction. At the same time, LV filling pressure is already increased, illustrated by an increase in E/E' ratio (ratio of transmitral Doppler early filling velocity to tissue Doppler early diastolic mitral annular velocity).

At the second stage, if diastolic dysfunction gets worse, LV filling pressure rises, and may result in an increase in left atrial (LA) pressure. This adaptive phenomenon is able to normalize the pressure gradient between the atrium and the ventricle, resulting in an apparently normal E/A

ratio: this is the pseudo-normal filling pattern. Despite an apparently normal cardiac function evaluated by the E and A waves, IVRT and EDT, increased filling pressure (and so E/E') illustrates an even worse diastolic dysfunction.

In the third and more severe stage, cardiac filling is drastically impaired. LV pressure increases further, and myocardial compliance is severely reduced, leading to a restrictive filling profile. EDT and IVRT are reduced, and E/A ratio is greatly increased.

Due to the great variability of observed stages in clinical studies, HFpEF patients express different echocardiographic profiles. As reported by Zile et al. [13], LV pressure evaluation remains the most effective way to determine diastolic dysfunction. Indeed, 92% of patients present an increase in LV end diastolic pressure, whereas almost half of the patients express abnormalities in E wave, A wave, IVRT or EDT (Figure 1).

Concerning systolic function, human patients classically show a preserved ejection fraction (>40-50%), but speckle-tracking studies revealed that their hearts presented an altered contracting motion, suggesting that despite an apparently "normal" ejection fraction, cardiac contractility is modified in HFpEF. This characteristic is also found in HCM cats [14].

### **Human and feline populations share common comorbidities**

HFpEF patient populations are very heterogeneous, and a lot of comorbidities are associated with the disease: arterial hypertension, diabetes, obesity, metabolic syndrome, renal failure, or anaemia [15]. Unfortunately, studies related to HCM poorly investigated the role of the comorbidities described in humans, and very little data is available in this field. Most of the authors attributed cardiac dysfunction to a consequence of either genetic mutation, hypertension or hyperthyroidism, and most of the papers mainly focused on heart dysfunction and damages. However, despite the apparent lack of data concerning feline comorbidities, some evidence has to be considered.

#### *Arterial hypertension*

In both human and feline populations, arterial hypertension is a major determinant of diastolic dysfunction and cardiac hypertrophy. In numerous clinical studies, HFpEF is most

frequently associated with hypertension (HT) in 55–84% of cases[15]. The traditional understanding of disease progression in HT has been “cardiac-centric” and focused on structural LV remodeling and the key role of LV hypertrophy in the pathogenesis of HF. However, fewer than half of the patients with HFpEF have LV hypertrophy, and this proportion was no greater than those with asymptomatic HT in a population-based study [16,2]. A recent study has provided valuable insight into several mechanisms involved in the progression of HFpEF in patients with HT, such as macrovascular stiffening and microvascular dysfunction, systemic endothelial inflammation, fibrosis and collagen deposition [17].

In cats, HT is also the most documented comorbidity. This disease is commonly diagnosed in cats, especially with age, and is frequently associated with renal failure or hyperthyroidism [18-20]. HT is also a well-known factor able to induce diastolic dysfunction and hypertrophic remodeling of the left ventricle (LV), as has been showed in several studies [21,22,12]. As a consequence, FCM associated with HT is often qualified as “secondary FCM”.

#### *Diabetes mellitus*

Diabetes is defined by chronic hyperglycemia, over 1.26 mg/L. This comorbidity is already known to be related to multiple adverse CV events, such as HF, atherosclerosis, stroke, or chronic kidney disease. Diabetes prevalence among HFpEF patients is remarkably high. According to the studies, 30-40% of patients are diabetic [9] and several pathological mechanisms are thought to impair their diastolic function. Chronic hyperglycemia profoundly alters paracrine endothelial signaling [23,24], and promotes cardiac fibrosis [25]. Lipotoxicity and microvascular rarefaction have also been found as promoting factors for cardiac dysfunction in diabetes mellitus [26].

In the feline population, no study clearly links the development of FCM with diabetes. Only Little et al. followed diabetic cats in a case-controlled study, and reported a high occurrence of HF in diabetic cats, associated with a predominance of hypertrophic remodeling [27]. Despite the low number of cats involved in the study (n=28), they point out the fact that, as in humans, diabetes mellitus is a risk factor for HF, and that its role is underestimated in HF development.

Despite the apparent lack of data on cats, one should consider their particular metabolic status regarding glucose management. Cats are obligate carnivores, and find their energy in a

low carbohydrate diet, essentially from neoglucogenesis using amino acids. As a consequence, two key enzymes involved in glucose intake are not expressed in hepatocytes: glucokinase (GCK) and the glucokinase regulatory protein (GKRP) [28,29]. In humans, GCK activity is regulated by the translocation of GKRP from the nucleus to the cytosol in case of hyperglycemia. In cats, hexokinase 1 (HK1) is expressed instead of GCK. HK1 presents a higher affinity and lower  $K_m$  for glucose. In other words, HK1 activity is maximal below the basal blood glucose concentration, and will not increase consequently to hyperglycemia [30]. This physiological particularity in glucose metabolism is responsible for the inability of cats to fully regulate glycemia after carbohydrate intake (Fig. 2) [31].

When cats are fed a low carbohydrate diet, such as a natural-prey based diet, the lower phosphorylation rate of HK1 has few consequences on plasmatic glucose regulation. However, domestic cats are usually fed commercial and carbohydrate-rich diets, and, according to a study by Coradini et al., these chows are able to dramatically increase glycemia after feeding [32]. Thus, at a physiological level, the condition of domestic cats is very close to a prediabetic state in humans [33], of which has already been associated with CV events and mortality [34-37].

Thus far, no study has focused on a possible link between the natural glucose intolerance state of this species and CV events. However, Freeman et al. have already shown that in Maine Coon cat populations, cats with HCM presented a higher level of glucose when compared to control cats, without being considered in a diabetic state [38].

### *Obesity.*

Obesity is defined as an abnormal or excessive fat accumulation in the body. In 2014, WHO estimated worldwide that 39% of adults over the age of 18 were considered overweight, and 13% considered obese. Obesity – like hypertension and HF - is a well-established risk factor for CV diseases in the human population, , increases the risk of dyslipidemia and diabetes [39,40]. In HFpEF, all the clinical studies highlighted a high prevalence of obesity among patients: 27-46% of patients were considered obese according to the studies [9].

Even though the pathophysiological processes by which obesity promotes HFpEF are not fully understood, the chronic pro-inflammatory state is thought to exert an important role. Indeed, Paulus highlighted the role of inflammatory markers (IL-6, TNF- $\alpha$ ) driven by obesity

in HFpEF development, and stated that a systemic pro-inflammatory state may be a predictive factor for the incidence of HFpEF [41]. A possible mechanism could be the endothelial dysfunction driven by this subclinical inflammatory state [42], leading to a reduction of NO bioavailability, with a disruption of the NO-cGMP-PKG cardiomyocyte signaling pathway, and the advent of HFpEF (concentric LV remodeling, increases stiffness of cardiomyocytes, interstitial fibrosis, and collagen deposition) [43].

As for their owners, feline populations are well concerned by this affection. Depending on the study, the level of obesity in domestic cats is estimated between 30 and 63.7% [44,45]. In feline populations, the link between cardiomyopathy and obesity is not so clear. Only a few studies have focused on the impact of obesity and increased body weight on cardiac disease incidence. Payne et al. showed a higher prevalence of obesity incats with HCM, compared to healthy cats [12]. Freeman et al. reported in a Maine Coon cat cohort that HCM cats presented a higher body condition score, and a higher abdominal circumference than healthy cats [38]. In a study on a mixed-breed cohort, Freeman et al. that HCM cats presented a higher body weight, and were of a heavier build [46]. In this latter study, no correlation was found between the BCS and HCM occurrence, but this fact could be explained by the difficulty of BCS determination according to the different breeds and morphotypes.

### **HFpEF and FCM share common pathological mechanisms**

#### *Myocardial fibrosis*

For both HFpEF and FCM, exact pathological mechanisms are still unclear, and appear to be very complex. Many parameters have been explored to try explain the filling impairment, among them, determinants of LV stiffness have been a well-documented field. It has been observed that cardiac extracellular matrix in HFpEF presented strong modifications. In their study, Mohammed et al. showed that hearts of HFpEF patients presented myocardial fibrosis [47], causing an increase in myocardium stiffness and diastolic dysfunction [48,49,13]. Collagen deposition can be explained by an imbalance of collagen production and degradation [50]. It appears that in HFpEF patients, matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) is down regulated, and TIMP-1 (tissue inhibitor metalloproteinase) and MMP-2 are upregulated [49]. The increase in MMP-2 may seem to be in contradiction with the higher amount of collagen deposition in

HFpEF, but it appears that MMP-2 is a prognostic marker of HFpEF [51]. MMP-2 promotes destruction of basement membrane proteins and facilitates the transendothelial migration of immunocompetent cells, thereby triggering cardiac inflammation [52].

In FCM, Fox et al. described various patterns of myocardial fibrosis, with endocardial and diffuse fibrosis in a necropsic study involving cats suffering from RCM and HCM [53-55]. These lesions were associated with a LA enlargement, and - in some cases- the presence of a thrombus in the LA, as a consequence of a chronic impairment of LV filling. Aupperle et al. conducted a necropsic study on cats echocardiographically diagnosed with HCM or UCM, and also found perivascular and interstitial fibrosis in failing hearts [56]. In their study, they equally showed that collagen deposition was associated to an increased expression of MMP-2 and TIMP-3 in cardiomyocytes and fibroblasts [56].

#### *Inflammation and myocardial inflammatory cell infiltration*

As mentioned previously, inflammation and pro-inflammatory state is thought to trigger myocardial remodeling observed in HFpEF. Glezeva et al. showed that patients generally present a higher level of circulating monocytes, and higher amounts of systemic pro-inflammatory and pro-fibrotic cytokines [57]. In addition, Westerman et al. showed leukocyte infiltration of the myocardium in patients with T-cells and macrophages [49]. This infiltration was associated with an increase in V-CAM in the myocardium, which enhances leukocyte adhesion and infiltration, and TGF- $\beta$  secretion, a highly pro-fibrotic cytokine [49].

No data are available on circulating levels of inflammatory cells in FCM cats, but several studies have shown cardiac histological findings similar to those in human HFpEF. Several necropsic studies showed leukocyte infiltration in FCM myocardium, with a perivascular localization [54]. Moreover, this inflammatory cell infiltration has been associated with an increased secretion of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  in the myocardium [56,58].

## **Why cardiologists and veterinary practitioners should pay attention to each other for tackling diastolic HF**

### *Limitations of the currently used models of HFpEF*

Unfortunately, the underlying mechanisms involved in HFpEF are still poorly understood. This lack of knowledge is due to the scarcity of cardiac biopsies from HFpEF patients, but also the inability of currently used models to reproduce the disease.

In the literature, diastolic dysfunction is often induced in rodents using a strong elevation of the afterload [59-61]. As a consequence of these drastic conditions, mice and rats show strong differences to the human pathology. First, diastolic dysfunction appears at a very young age in these models (from 7 to 12 weeks according to the studies) [62-64,61], which is particularly limiting for studying the pathophysiology of a long-term disease like HFpEF. Secondly, as a consequence of such drastic pathological conditions, afterload-increased models develop a systolic dysfunction within weeks. Indeed Klotz et al showed that the ejection fraction of Dahl/SS rats decreased over time starting at the age of 16[65]. In another study, Legrice et al. showed that SHR rats presented a decrease of fractional shortening from the age of 18 weeks old [60].

Models of HFpEF that do not involve an afterload increase to induce diastolic dysfunction have been developed recently, particularly experimental models of diabetes and metabolic syndrome. Among these, are the db/db mice and the Zucker derived strains. These animals have a deficient leptin receptor, and become obese and diabetic very early in life. Several studies investigated cardiac function of these models, and showed that diastolic dysfunction is present at almost 6-7 weeks-old [66], whereas for the HFpEF studies concern animals of ages varying from 7 to 20 weeks in the publications [67,68]. Although these models seem more complex and accurate for the study of HFpEF, these data are only collected on young animals, bred in extreme conditions, and definitely does not take into account the ageing process.

These data also raise other questions regarding the design of research protocols. First, rodents and humans present strong differences in physiological characteristics, such as heart rate or body weight. In addition, numerous inbred or outbred strains can lead to completely

different interpretations for similar protocols and experimentation following their genetic background, and do not reflect the genetic variability of the human population [69-71]. In animal research facilities, living conditions are a very controlled element in experimental procedures. Eventhough this provides a very reproducible context to perform research protocols, standard living conditions definitely do not reproduce the very complex environment in which human populations live.

*How could domestic cats help to explore human HFpEF?*

In light of this evidence, a new approach is needed to fully understand this complex disease, develop accurate treatment and reduce the economic cost of HFpEF. Human populations already live in the presence of domestic animals. In many aspects, these pets share many features with their owners. They live in the same environment, and toxicologists already use data on domestic animals to measure human population exposure to various threats such as air pollution [72] or passive tobacco consumption [73]. Interestingly, secular trends observed in the human population, such as diabetes [74] and obesity [75], are observed in the same way as in pet population. Numerous pets in developed countries have serious health follow-ups in veterinary practices, until an advanced age.

These data raise new questions regarding our approach to studying HFpEF. Studying another species, that spontaneously develops a similar disease, in the same environment, might resolve the underlying questions which cannot be answered with laboratory models. However, in the field of cardiology, these interesting characteristics of animal populations are not yet valued, and few studies have focused on the characteristics of similar domestic animal and human diseases.

*What are the benefits of human cardiology for feline patients?*

At the present time, when diagnosed, the prognosis of HF is very poor for feline patients. As shown by the recent study of Payne et al., FCM may be underdiagnosed in the feline population, which leads to late diagnosis [12]. There is no data regarding the pathophysiology of this disease, and except from well-known comorbidities (HT and hyperthyroidism), there are no data available that allow an appropriate prevention for owners. Most of all, very few

treatments are available for cats suffering from HF, and no large scale clinical study has clearly determined and accurate treatment for these cats.

Paying attention to the biomedical research on HFpEF is an opportunity to change our perception on these poorly known diseases, and to consider new options to improve FCM prevention and treatment.

### **Conclusion and perspectives**

Tackling HFpEF is a challenging task for the 21st century, as patients' biopsies and accurate models remain rare. In this context, the epidemiological and clinical similarities between HFpEF and FCM could be of interest to better understand the underlying mechanisms involved in both pathologies. A better knowledge of feline and human cardiac pathophysiology could lead to the identification of innovative and accurate therapeutic approaches in both veterinary and human medicine.

### **Acknowledgments**

We thank Emma Abell and Marja Steenman for careful English revision.

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest

## References

1. Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., Cushman, M., et al. (2015). Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 131(4), e29-322, doi:10.1161/CIR.000000000000152.
2. Shah, A. M., Shah, S. J., Anand, I. S., Sweitzer, N. K., O'Meara, E., Heitner, J. F., et al. (2014). Cardiac structure and function in heart failure with preserved ejection fraction: baseline findings from the echocardiographic study of the Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure with an Aldosterone Antagonist trial. *Circ Heart Fail*, 7(1), 104-115, doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000887.
3. Ferasin, L., Sturgess, C. P., Cannon, M. J., Caney, S. M., Gruffydd-Jones, T. J., & Wotton, P. R. (2003). Feline idiopathic cardiomyopathy: a retrospective study of 106 cats (1994-2001). *J Feline Med Surg*, 5(3), 151-159.
4. Ferasin, L. (2009). Feline myocardial disease 2: diagnosis, prognosis and clinical management. *J Feline Med Surg*, 11(3), 183-194, doi:10.1016/j.jfms.2009.01.002.
5. Pantazis, A., Vischer, A. S., Perez-Tome, M. C., & Castelletti, S. (2015). Diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy. *Echo Res Pract*, 2(1), R45-53, doi:10.1530/ERP-15-0007.
6. Granstrom, S., Godiksen, M. T., Christiansen, M., Pipper, C. B., Willesen, J. L., & Koch, J. (2011). Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a cohort of British Shorthair cats in Denmark. *J Vet Intern Med*, 25(4), 866-871, doi:10.1111/j.1939-1676.2011.0751.x.
7. Meurs, K. M., Norgard, M. M., Ederer, M. M., Hendrix, K. P., & Kittleson, M. D. (2007). A substitution mutation in the myosin binding protein C gene in ragdoll hypertrophic cardiomyopathy. *Genomics*, 90(2), 261-264, doi:10.1016/j.ygeno.2007.04.007.
8. Granstrom, S., Godiksen, M. T., Christiansen, M., Pipper, C. B., Martinussen, T., Mogelvang, R., et al. (2015). Genotype-phenotype correlation between the cardiac myosin binding protein C mutation A31P and hypertrophic cardiomyopathy in a cohort of Maine Coon cats: a longitudinal study. *J Vet Cardiol*, 17 Suppl 1, S268-281, doi:10.1016/j.jvc.2015.10.005.
9. Dhingra, A., Garg, A., Kaur, S., Chopra, S., Batra, J. S., Pandey, A., et al. (2014). Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Curr Heart Fail Rep*, 11(4), 354-365, doi:10.1007/s11897-014-0223-7.
10. Kittleson, M. D., Meurs, K. M., Munro, M. J., Kittleson, J. A., Liu, S. K., Pion, P. D., et al. (1999). Familial hypertrophic cardiomyopathy in maine coon cats: an animal model of human disease. *Circulation*, 99(24), 3172-3180.
11. Trehou-Sechi, E., Tissier, R., Gouni, V., Misbach, C., Petit, A. M., Balouka, D., et al. (2012). Comparative echocardiographic and clinical features of hypertrophic cardiomyopathy in 5 breeds of cats: a retrospective analysis of 344 cases (2001-2011). *J Vet Intern Med*, 26(3), 532-541, doi:10.1111/j.1939-1676.2012.00906.x.

12. Payne, J. R., Brodbelt, D. C., & Luis Fuentes, V. (2015). Cardiomyopathy prevalence in 780 apparently healthy cats in rehoming centres (the CatScan study). *J Vet Cardiol*, 17 Suppl 1, S244-257, doi:10.1016/j.jvc.2015.03.008.
13. Zile, M. R., Baicu, C. F., Ikonomidis, J. S., Stroud, R. E., Nietert, P. J., Bradshaw, A. D., et al. (2015). Myocardial stiffness in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: contributions of collagen and titin. *Circulation*, 131(14), 1247-1259, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013215.
14. Wess, G., Sarkar, R., & Hartmann, K. (2010). Assessment of left ventricular systolic function by strain imaging echocardiography in various stages of feline hypertrophic cardiomyopathy. *J Vet Intern Med*, 24(6), 1375-1382, doi:10.1111/j.1939-1676.2010.0586.x.
15. Lam, C. S., Donal, E., Kraigher-Krainer, E., & Vasan, R. S. (2011). Epidemiology and clinical course of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur J Heart Fail*, 13(1), 18-28, doi:10.1093/eurjhf/hfq121.
16. Lam, C. S., Roger, V. L., Rodeheffer, R. J., Bursi, F., Borlaug, B. A., Ommen, S. R., et al. (2007). Cardiac structure and ventricular-vascular function in persons with heart failure and preserved ejection fraction from Olmsted County, Minnesota. *Circulation*, 115(15), 1982-1990, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.659763.
17. Teo, L. Y., Chan, L. L., & Lam, C. S. (2016). Heart failure with preserved ejection fraction in hypertension. *Curr Opin Cardiol*, 31(4), 410-416, doi:10.1097/HCO.0000000000000292.
18. Kobayashi, D. L., Peterson, M. E., Graves, T. K., Lesser, M., & Nichols, C. E. (1990). Hypertension in cats with chronic renal failure or hyperthyroidism. *J Vet Intern Med*, 4(2), 58-62.
19. Littman, M. P. (1994). Spontaneous systemic hypertension in 24 cats. *J Vet Intern Med*, 8(2), 79-86.
20. Syme, H. M., Barber, P. J., Markwell, P. J., & Elliott, J. (2002). Prevalence of systolic hypertension in cats with chronic renal failure at initial evaluation. *J Am Vet Med Assoc*, 220(12), 1799-1804.
21. Carlos Sampedrano, C., Chetboul, V., Gouni, V., Nicolle, A. P., Pouchelon, J. L., & Tissier, R. (2006). Systolic and diastolic myocardial dysfunction in cats with hypertrophic cardiomyopathy or systemic hypertension. *J Vet Intern Med*, 20(5), 1106-1115.
22. Chetboul, V., Lefebvre, H. P., Pinhas, C., Clerc, B., Boussouf, M., & Pouchelon, J. L. (2003). Spontaneous feline hypertension: clinical and echocardiographic abnormalities, and survival rate. *J Vet Intern Med*, 17(1), 89-95.
23. Nishikawa, T., Edelstein, D., & Brownlee, M. (2000). The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int Suppl*, 77, S26-30.
24. Shenouda, S. M., Widlansky, M. E., Chen, K., Xu, G., Holbrook, M., Tabit, C. E., et al. (2011). Altered mitochondrial dynamics contributes to endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circulation*, 124(4), 444-453, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.014506.

25. Asbun, J., & Villarreal, F. J. (2006). The pathogenesis of myocardial fibrosis in the setting of diabetic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 47(4), 693-700, doi:10.1016/j.jacc.2005.09.050.
26. Seferovic, P. M., & Paulus, W. J. (2015). Clinical diabetic cardiomyopathy: a two-faced disease with restrictive and dilated phenotypes. *Eur Heart J*, 36(27), 1718-1727, 1727a-1727c, doi:10.1093/eurheartj/ehv134.
27. Little, C. J., & Gettinby, G. (2008). Heart failure is common in diabetic cats: findings from a retrospective case-controlled study in first-opinion practice. *J Small Anim Pract*, 49(1), 17-25, doi:10.1111/j.1748-5827.2007.00466.x.
28. Tanaka, A., Inoue, A., Takeguchi, A., Washizu, T., Bonkobara, M., & Arai, T. (2005). Comparison of expression of glucokinase gene and activities of enzymes related to glucose metabolism in livers between dog and cat. *Vet Res Commun*, 29(6), 477-485, doi:10.1007/s11259-005-1868-1.
29. Washizu, T., Tanaka, A., Sako, T., Washizu, M., & Arai, T. (1999). Comparison of the activities of enzymes related to glycolysis and gluconeogenesis in the liver of dogs and cats. *Res Vet Sci*, 67(2), 205-206, doi:10.1053/rvsc.1998.0305.
30. Schermerhorn, T. (2013). Normal glucose metabolism in carnivores overlaps with diabetes pathology in non-carnivores. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 4, 188, doi:10.3389/fendo.2013.00188.
31. Deng, P., Ridge, T. K., Graves, T. K., Spears, J. K., & Swanson, K. S. (2013). Effects of dietary macronutrient composition and feeding frequency on fasting and postprandial hormone response in domestic cats. *J Nutr Sci*, 2, e36, doi:10.1017/jns.2013.32.
32. Coradini, M., Rand, J. S., Morton, J. M., & Rawlings, J. M. (2011). Effects of two commercially available feline diets on glucose and insulin concentrations, insulin sensitivity and energetic efficiency of weight gain. *Br J Nutr*, 106 Suppl 1, S64-77, doi:10.1017/S0007114511005046.
33. American Diabetes, A. (2015). (2) Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*, 38 Suppl, S8-S16, doi:10.2337/dc15-S005.
34. Latini, R., Staszewsky, L., Sun, J. L., Bethel, M. A., Disertori, M., Haffner, S. M., et al. (2013). Incidence of atrial fibrillation in a population with impaired glucose tolerance: the contribution of glucose metabolism and other risk factors. A post hoc analysis of the Nateglinide and Valsartan in Impaired Glucose Tolerance Outcomes Research trial. *Am Heart J*, 166(5), 935-940 e931, doi:10.1016/j.ahj.2013.08.012.
35. Balkau, B., Eschwege, E., Papoz, L., Richard, J. L., Claude, J. R., Warnet, J. M., et al. (1993). Risk factors for early death in non-insulin dependent diabetes and men with known glucose tolerance status. *BMJ*, 307(6899), 295-299.
36. Decode Study Group, t. E. D. E. G. (2001). Glucose tolerance and cardiovascular mortality: comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria. *Arch Intern Med*, 161(3), 397-405.

37. Lowe, L. P., Liu, K., Greenland, P., Metzger, B. E., Dyer, A. R., & Stamler, J. (1997). Diabetes, asymptomatic hyperglycemia, and 22-year mortality in black and white men. The Chicago Heart Association Detection Project in Industry Study. *Diabetes Care*, 20(2), 163-169.
38. Freeman, L. M., Rush, J. E., Meurs, K. M., Bulmer, B. J., & Cunningham, S. M. (2013). Body size and metabolic differences in Maine Coon cats with and without hypertrophic cardiomyopathy. *J Feline Med Surg*, 15(2), 74-80, doi:10.1177/1098612X12460847.
39. de Lusignan, S., Hague, N., van Vlymen, J., Dhoul, N., Chan, T., Thana, L., et al. (2006). A study of cardiovascular risk in overweight and obese people in England. *Eur J Gen Pract*, 12(1), 19-29, doi:10.1080/13814780600757260.
40. Samson, R., Jaiswal, A., Ennezat, P. V., Cassidy, M., & Le Jemtel, T. H. (2016). Clinical Phenotypes in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Heart Assoc*, 5(1), doi:10.1161/JAHA.115.002477.
41. Paulus, W. J., & Tschope, C. (2013). A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol*, 62(4), 263-271, doi:10.1016/j.jacc.2013.02.092.
42. Campia, U., Tesauro, M., & Cardillo, C. (2012). Human obesity and endothelium-dependent responsiveness. *Br J Pharmacol*, 165(3), 561-573, doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01661.x.
43. Komajda, M., & Lam, C. S. (2014). Heart failure with preserved ejection fraction: a clinical dilemma. *Eur Heart J*, 35(16), 1022-1032, doi:10.1093/eurheartj/ehu067.
44. Colliard, L., Paragon, B. M., Lemuet, B., Benet, J. J., & Blanchard, G. (2009). Prevalence and risk factors of obesity in an urban population of healthy cats. *J Feline Med Surg*, 11(2), 135-140, doi:10.1016/j.jfms.2008.07.002.
45. Kienzle, E., & Moik, K. (2011). A pilot study of the body weight of pure-bred client-owned adult cats. *Br J Nutr*, 106 Suppl 1, S113-115, doi:10.1017/S0007114511001802.
46. Freeman, L. M., Rush, J. E., Feugier, A., & van Hoek, I. (2015). Relationship of body size to metabolic markers and left ventricular hypertrophy in cats. *J Vet Intern Med*, 29(1), 150-156, doi:10.1111/jvim.12503.
47. Mohammed, S. F., Hussain, S., Mirzoyev, S. A., Edwards, W. D., Maleszewski, J. J., & Redfield, M. M. (2015). Coronary microvascular rarefaction and myocardial fibrosis in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation*, 131(6), 550-559, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.009625.
48. Kasner, M., Sinning, D., Lober, J., Post, H., Fraser, A. G., Pieske, B., et al. (2015). Heterogeneous responses of systolic and diastolic left ventricular function to exercise in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *ESC Heart Fail*, 2(3), 121-132, doi:10.1002/ehf2.12049.
49. Westermann, D., Lindner, D., Kasner, M., Zietsch, C., Savvatis, K., Escher, F., et al. (2011). Cardiac inflammation contributes to changes in the extracellular matrix in patients with heart

failure and normal ejection fraction. *Circ Heart Fail*, 4(1), 44-52, doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.931451.

50. Heymans, S., Schroen, B., Vermeersch, P., Milting, H., Gao, F., Kassner, A., et al. (2005). Increased cardiac expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 is related to cardiac fibrosis and dysfunction in the chronic pressure-overloaded human heart. *Circulation*, 112(8), 1136-1144, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.516963.

51. Martos, R., Baugh, J., Ledwidge, M., O'Loughlin, C., Murphy, N. F., Conlon, C., et al. (2009). Diagnosis of heart failure with preserved ejection fraction: improved accuracy with the use of markers of collagen turnover. *Eur J Heart Fail*, 11(2), 191-197, doi:10.1093/eurjhf/hfn036.

52. Matsumura, S., Iwanaga, S., Mochizuki, S., Okamoto, H., Ogawa, S., & Okada, Y. (2005). Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest*, 115(3), 599-609, doi:10.1172/JCI22304.

53. Fox, P. R. (2003). Hypertrophic cardiomyopathy. Clinical and pathologic correlates. *J Vet Cardiol*, 5(2), 39-45, doi:10.1016/S1760-2734(06)70051-0.

54. Fox, P. R. (2004). Endomyocardial fibrosis and restrictive cardiomyopathy: pathologic and clinical features. *J Vet Cardiol*, 6(1), 25-31, doi:10.1016/S1760-2734(06)70061-3.

55. Fox, P. R., Basso, C., Thiene, G., & Maron, B. J. (2014). Spontaneously occurring restrictive nonhypertrophied cardiomyopathy in domestic cats: a new animal model of human disease. *Cardiovasc Pathol*, 23(1), 28-34, doi:10.1016/j.carpath.2013.08.001.

56. Aupperle, H., Baldauf, K., & Marz, I. (2011). An immunohistochemical study of feline myocardial fibrosis. *J Comp Pathol*, 145(2-3), 158-173, doi:10.1016/j.jcpa.2010.12.003.

57. Glezeva, N., Voon, V., Watson, C., Horgan, S., McDonald, K., Ledwidge, M., et al. (2015). Exaggerated inflammation and monocytosis associate with diastolic dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction: evidence of M2 macrophage activation in disease pathogenesis. *J Card Fail*, 21(2), 167-177, doi:10.1016/j.cardfail.2014.11.004.

58. Meurs, K. M., Fox, P. R., Miller, M. W., Kapadia, S., & Mann, D. L. (2002). Plasma concentrations of tumor necrosis factor-alpha in cats with congestive heart failure. *Am J Vet Res*, 63(5), 640-642.

59. Hudson, B., Hidalgo, C., Saripalli, C., & Granzier, H. (2011). Hyperphosphorylation of mouse cardiac titin contributes to transverse aortic constriction-induced diastolic dysfunction. *Circ Res*, 109(8), 858-866, doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.246819.

60. LeGrice, I. J., Pope, A. J., Sands, G. B., Whalley, G., Doughty, R. N., & Smaill, B. H. (2012). Progression of myocardial remodeling and mechanical dysfunction in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 303(11), H1353-1365, doi:10.1152/ajpheart.00748.2011.

61. Silberman, G. A., Fan, T. H., Liu, H., Jiao, Z., Xiao, H. D., Lovelock, J. D., et al. (2010). Uncoupled cardiac nitric oxide synthase mediates diastolic dysfunction. *Circulation*, 121(4), 519-528, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.883777.
62. Groban, L., Yamaleyeva, L. M., Westwood, B. M., Houle, T. T., Lin, M., Kitzman, D. W., et al. (2008). Progressive diastolic dysfunction in the female mRen(2). Lewis rat: influence of salt and ovarian hormones. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 63(1), 3-11.
63. Litwin, S. E., Katz, S. E., Weinberg, E. O., Lorell, B. H., Aurigemma, G. P., & Douglas, P. S. (1995). 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*, 91(10), 2642-2654.
64. Moens, A. L., Takimoto, E., Tocchetti, C. G., Chakir, K., Bedja, D., Cormaci, G., et al. (2008). Reversal of cardiac hypertrophy and fibrosis from pressure overload by tetrahydrobiopterin: efficacy of recoupling nitric oxide synthase as a therapeutic strategy. *Circulation*, 117(20), 2626-2636, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.737031.
65. Klotz, S., Hay, I., Zhang, G., Maurer, M., Wang, J., & Burkhoff, D. (2006). Development of heart failure in chronic hypertensive Dahl rats: focus on heart failure with preserved ejection fraction. *Hypertension*, 47(5), 901-911, doi:10.1161/01.HYP.0000215579.81408.8e.
66. Zhou, X., Ma, L., Habibi, J., Whaley-Connell, A., Hayden, M. R., Tilmon, R. D., et al. (2010). Nebivolol improves diastolic dysfunction and myocardial remodeling through reductions in oxidative stress in the Zucker obese rat. *Hypertension*, 55(4), 880-888, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.145136.
67. Franssen, C., Chen, S., Unger, A., Korkmaz, H. I., De Keulenaer, G. W., Tschope, C., et al. (2016). Myocardial Microvascular Inflammatory Endothelial Activation in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *JACC Heart Fail*, 4(4), 312-324, doi:10.1016/j.jchf.2015.10.007.
68. Hamdani, N., Franssen, C., Lourenco, A., Falcao-Pires, I., Fontoura, D., Leite, S., et al. (2013). Myocardial titin hypophosphorylation importantly contributes to heart failure with preserved ejection fraction in a rat metabolic risk model. *Circ Heart Fail*, 6(6), 1239-1249, doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000539.
69. Moreth, K., Fischer, R., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Wurst, W., Katus, H. A., et al. (2014). High-throughput phenotypic assessment of cardiac physiology in four commonly used inbred mouse strains. *J Comp Physiol B*, 184(6), 763-775, doi:10.1007/s00360-014-0830-3.
70. Seeger, D. R., & Murphy, E. J. (2016). Mouse Strain Impacts Fatty Acid Uptake and Trafficking in Liver, Heart, and Brain: A Comparison of C57BL/6 and Swiss Webster Mice. *Lipids*, 51(5), 549-560, doi:10.1007/s11745-015-4117-6.
71. Vaillant, F., Lauzier, B., Poirier, I., Gelinias, R., Rivard, M. E., Robillard Frayne, I., et al. (2014). Mouse strain differences in metabolic fluxes and function of ex vivo working hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 306(1), H78-87, doi:10.1152/ajpheart.00465.2013.
72. Reif, J. S. (2011). Animal sentinels for environmental and public health. *Public Health Rep*, 126 Suppl 1, 50-57.

73. Bertone-Johnson, E. R., Procter-Gray, E., Gollenberg, A. L., Ryan, M. B., & Barber, L. G. (2008). Environmental tobacco smoke and canine urinary cotinine level. *Environ Res*, 106(3), 361-364, doi:10.1016/j.envres.2007.09.007.
74. O'Neill, D. G., Gostelow, R., Orme, C., Church, D. B., Niessen, S. J., Verheyen, K., et al. (2016). Epidemiology of Diabetes Mellitus among 193,435 Cats Attending Primary-Care Veterinary Practices in England. *J Vet Intern Med*, 30(4), 964-972, doi:10.1111/jvim.14365.
75. Courcier, E. A., Mellor, D. J., Pendlebury, E., Evans, C., & Yam, P. S. (2012). An investigation into the epidemiology of feline obesity in Great Britain: results of a cross-sectional study of 47 companion animal practises. *Vet Rec*, 171(22), 560, doi:10.1136/vr.100953.

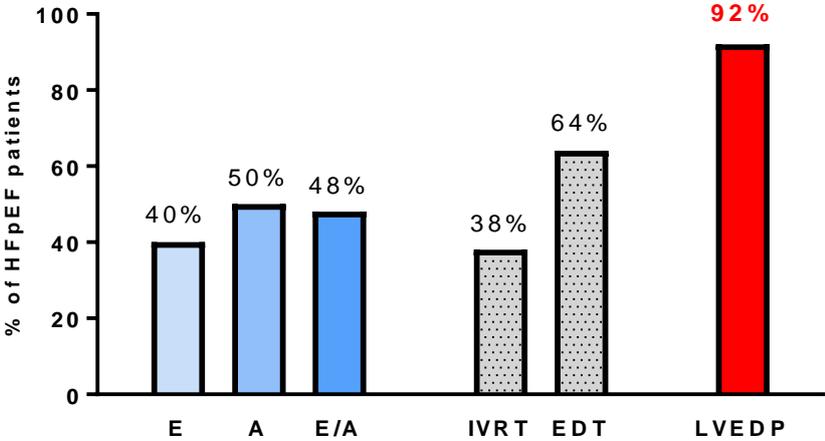
**Figure legends.**

**Figure 1.** More frequently associated cardiac abnormalities to HFpEF, Adapted from Zile et al. 2015. E/A : Early-to-late filing ratio, IVRT: isovolumic relaxation time, EDT: E-wave deceleration time, LVEDP: left ventricular end-diastolic pressure.

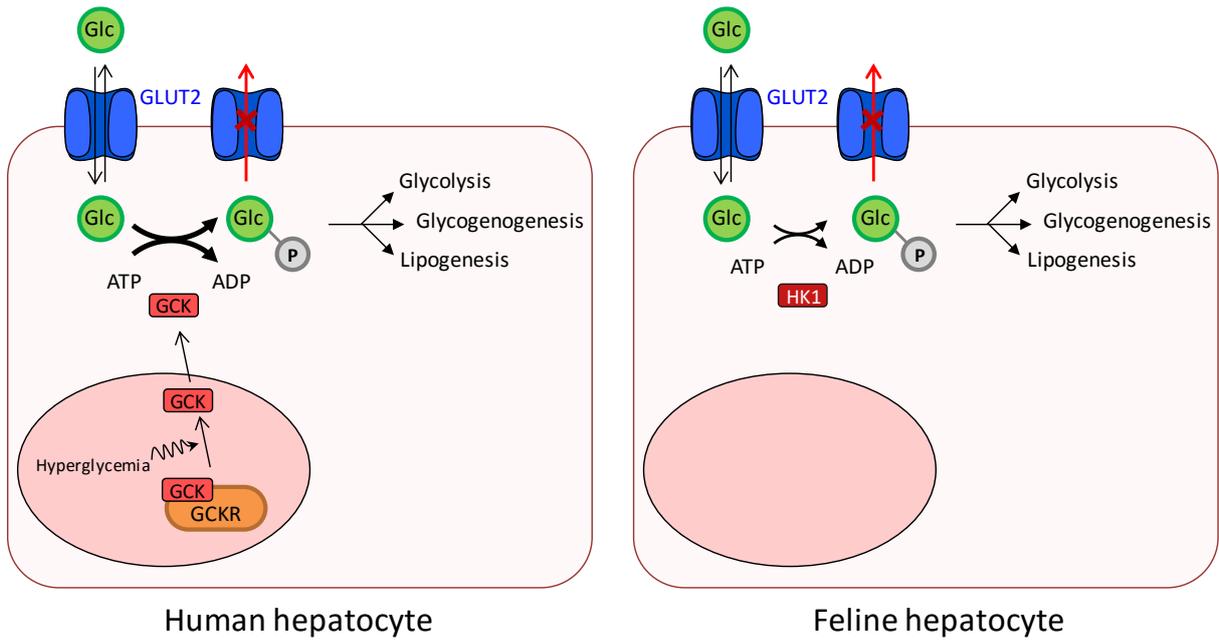
**Figure 2.** Glucose intake in human and feline species. Glucose diffuses passively through the transporter GLUT2. In humans, GCK phosphorylate the glucose in glucose-6-phosphate, and so prevent its release from the cell. Cytoplasmic levels of GCK are regulated according the fasted state: after feeding, GCK is released from GKRP inhibition and translocates to the cytosol to adapt glucose phosphorylation rate in function of glycemia level. In cats, GCK is replaced by HK1, whose cytoplasmic level remains stable.

**Table 1.** Main pathological characteristics of human HFpEF and feline cardiomyopathy

Figure 1.



**Figure 2.**



**Table 1.**

		Feline cardiomyopathies		
		HCM	DCM	RCM
<b>Age of diagnosis</b>	Human HFpEF 77 years (Hamaguchi 2012) 70 years (Kawaguchi 2012)	5-9 years (Ferasin 2003) 8-18 years (Simpson 2009) 7-13 years (Carlos Sampedrano 2006) 5-8 years (Christiansen 2015) 7-14 (Spalla 2015) 9 years (Wess 2010)	9.1 years (Ferasin 2003)	7.1 years (Ferasin 2003) 10 years (Fox 2014) 10 years (Biasato 2015)
<b>Cardiac hypertrophy</b>	Yes (Kawaguchi 2012, Melenovski 2007) No (Shah 2012)	Yes (Christiansen 2015, Sampedrano 2006 Biasato 2015)		Yes (Fox 2014) No (Biasato 2015)
<b>Diastolic dysfunction</b>	Yes: from delayed relaxation to restrictive filling pattern	Yes: relaxation trouble decreased diastolic velocities restrictive profile if CHF (Sampedrano 2006 Linney 2014)		Yes: restrictive +++ pattern with E/A +++ (Fox 2014)
<b>Fractional shortening</b>	Preserved	Preserved (Christiansen 2015, Sampedrano 2006)		Preserved (Fox 2014)
<b>Fibrosis</b>	Moderate (Mohammed 2013)	Yes (Liu 1993, Christiansen 2015 Biasato 2015 Khor 2015)		Yes (Fox 2014)
<b>Death</b>	Median survival time of 2.1 years (Udelson 2011)	Median survival time after diagnosis : 492 days (Ferasin 2003) Mean time of survival 865 days (Biasato 2015)	Median survival time after diagnosis : 11 days (Ferasin 2003)	Nearly 80% deceased from cardiac complication in the 12 months (Fox 2014) 75% death from non cardiac complication within 2 years after diagnosis (Fox 2014) Median survival time after diagnosis : 132 days (Ferasin 2003) Mean time of survival 273 days (Biasato 2015)



## **Annexe 2: Etude de la fonction cardiaque intrinsèque dans le choc septique par la technique du cœur isolé travaillant.**

### **Study of intrinsic cardiac dysfunction in septic shock conditions by isolated working heart: a primary approach before new therapeutic proposals?**

**Marine Ferron<sup>a1</sup>, Valentine Prat<sup>a</sup>, David Roul<sup>a</sup>, Julien Cadiet<sup>a</sup>, Chantal Gauthier<sup>a</sup>, Bertrand Rozec<sup>b</sup>, Benjamin Lauzier<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France

<sup>b</sup> l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, Nantes, France

Submitted at Resuscitation.

#### **ABSTRACT**

Septic shock is an inflammatory response to an infection leading to cardiovascular dysfunction. Today, only few studies have evaluated whether cardiac dysfunction in septic shock is due to load modifications, neuroendocrine influence or intrinsic cardiac alterations. Isolated working heart approach allows measurement of cardiac function under controlled conditions. Our study demonstrated for the first time that in rat endotoxemic shock induces an alteration of cardiac function characterized by both systolic and diastolic dysfunctions despite physiological load conditions. This observation might help to design new therapeutic avenue.

## INTRODUCTION

Sepsis can be defined as deregulated host response to an infection and is characterized by circulatory and cellular metabolism abnormalities (1). Excessive inflammatory response with a massive release of cytokines can lead to organ dysfunction by various mechanisms and ultimately death (2). Among these organs, cardiac dysfunction is present in 40% of patients and plays a critical role in the patient outcome. It increases mortality by 40% and is a major predictor of morbidity and mortality in sepsis (3). Echocardiographic evaluation of the cardiac function shows that both left ventricular (LV) systolic and diastolic parameters are altered by a decrease in LV ejection fraction ( $< 40\%$  in 50% of cases) and an alteration of early to late diastolic filling (E/A) (in 44% of septic shock patients) (4). Various treatments have been tried to reduce the impact of cardiac function in these patients to improve their outcome, however, no real improvement have been reported so far.

Therefore, the main goals of these past decades have been to increase our knowledge about the cardiac function, its pathophysiology and to develop specific treatments to reduce septic shock burden. In order to complete comprehension of septic shock cardiomyopathy, *in vivo* (carotid catheterization (5) and echocardiography (6)) and *in vitro* studies (papillary muscles (7) or isolated cardiomyocytes (8)) were performed on animal models. Yet, these studies are performed either *in vivo* or on a small part of the organ. It remains controversial if the cardiac alteration associated with sepsis is a consequence of drastic drop in blood pressure, capillary leakage and neuroendocrine system activation or an intrinsic alteration of the cardiac function or regulation (9). In fact, the intrinsic contractile function of the heart and the intrinsic myocardial response to sepsis have been poorly investigated. Indeed, as recently reported by Zaky et al, characterization of sepsis-induced cardiomyopathy and its mechanisms are incomplete and need to be explored (9).

By echocardiography and an approach of isolated working heart techniques, this study allows to investigate the intrinsic cardiac function in septic shock in the presence or absence of preload, afterload and neurohumoral modifications.

## **METHODS**

### **Endotoxemic model**

All animal protocols were approved by the ethic committee in charge of animal experimentation of Pays de la Loire and were performed in accordance with French law on animal welfare, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, and the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Pub. No. 85-23, revised 2011).

Ten-weeks-old male Sprague–Dawley rats (Janvier, Le Genest St, France) were housed under standard conditions of room temperature, humidity (40–60%) and 12 h light/dark cycle. Food and water were available ad libitum. Rats were anesthetized with 4% isoflurane (Forene®, AbbottFrance, Rungis, France) in 1 L.min<sup>-1</sup> O<sub>2</sub> flow. Control rats (CTRL) receive physiologic serum injection whereas endotoxemic shock (LPS) was induced by intravenous injection of 5 mg/kg LPS from *Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma, St Quentin Fallavier, France), like previously described (5). Hearts were harvested 180 min after shock induction to study ex vivo the early impact of endotoxemic shock on isolated working heart.

### **In vivo evaluation**

Animals were anesthetized with 2% isoflurane in O<sub>2</sub> (TEM anesthesia, France). Isoflurane was delivered at a concentration of 2% volume and 1 L.min<sup>-1</sup> O<sub>2</sub> flow to limit hemodynamic repercussion.

Transthoracic echocardiography was performed using an ultrasound system VIVID7 (GE Healthcare, Horton, Norway) equipped with a 10 MHz sectorial probe as previously described (10). Measurements were made on five cardiac cycles and averaged for each data value.

Hemodynamic arterial pressure was performed using an 2F catheter (Millar, Houston, USA) in isolated right carotid artery. Pressure signal were continuously recorded using an A/D converter (EMKA Technologies, Paris, France), stored and displayed by the IOX1.5.7 Software System (EMKA Technologies).

Arterial blood samples were collected at abdominal aortic level and lactatemia was analyzed using a GEM®4000 (Instrumentation Laboratory, Paris, France).

### **Working heart study**

Animals were anesthetized with pentobarbital (Dolethal®, 60 mg.kg<sup>-1</sup> ip injection), heparinized (100 UI.kg<sup>-1</sup>) 15 min before surgery to avoid any blood clot formation in coronary vessels. The procedure for rat heart isolation and its ex vivo perfusion in working mode with continuous monitoring of physiological and functional parameters (cardiac flow, heart rate, left ventricular pressure and contractility) have been described previously (11). Hearts were then perfused at physiological pre- and afterload pressures (respectively 12.5 and 80 mmHg). The following functional parameters were monitored continuously during the perfusion experiments: cardiac output and coronary flow, with calibrated electromagnetic flow probes (Scisense ADV500, Transonic, Elstree, The Netherlands), heart rate (HR) and cardiac cycle, left ventricular pressure (LVP), and values for the first derivative of LVP (dP/dt) with a pressure transducer (Perfused isolated heart system, EMKA Technologies).

### **Statistical analysis**

Results are expressed as the mean ± SEM of n experiments. Working heart values were compared using Mann-Whitney test. A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

## **RESULTS**

LPS rats, 3h after shock induction, presented an hypotension (CTRL: 87.17 mmHg, LPS: 72.75 mmHg, p<0.05), a tachycardia (353.8 vs 440.7 beat.min<sup>-1</sup> in LPS, p<0.01) and a hyperlactatemia (2.80 vs 4.74 mmol.L<sup>-1</sup> in LPS, p<0.05). Echocardiographic evaluation of LPS rats also shown a 36 % decrease in cardiac output (p<0.05) and an impairment of systolic (ejection fraction) and diastolic (E/A ratio and E/E' ratio) functions which shown a significant diminution of all these parameters indicating an alteration of the cardiac function in agreement with septic shock disease (Table 1).

After a stabilization period of 20 minutes, study of intrinsic cardiac function of isolated working heart at physiological load conditions, also demonstrated a tachycardia (261.9 vs 297.3 beats.min<sup>-1</sup> in LPS,  $p < 0.05$ ) due to a reduction of the diastolic filling period (-45% in the LPS group,  $p < 0.05$ ) without any other alteration of the cardiac cycle (Table 2). In LPS group, an alteration of the systolic function was also observed, with a 24% reduction of the end systolic pressure ( $p < 0.001$ ) and a 48% reduction of the contractility (dP/dt max,  $p < 0.001$ ). Diastolic function was impaired in LPS rats with an increase in left ventricular minimal pressure (-9.3 mmHg in CTRL to 0.8 mmHg in LPS,  $p < 0.05$ ) and a reduced cardiac relaxation (dP/dt min of -4495.7 vs -2415.7 mmHg.sec<sup>-1</sup> in LPS,  $p < 0.001$ ). Altogether these alterations led to a significant reduction in cardiac output (-38%,  $p < 0.01$ ).

## **DISCUSSION**

Septic shock is associated with hemodynamic perturbations, especially a profound vasodilatation with a drop in blood pressure, and a myocardial dysfunction (1). However, mechanisms of sepsis-induced cardiomyopathy are still not well understood (9), albeit it is admitted that both systolic and diastolic functions are altered. Since 2012, echocardiographic studies reported diastolic dysfunction as a predictor of a high morbi-mortality (12,13). In our study, we demonstrate for the first time that alteration of the cardiac function in a septic situation is independent of the load conditions and neurohumoral status.

As reported, echocardiography shows us both systolic and diastolic dysfunctions. Interestingly, these dysfunctions are also observed by isolated working in physiologic load conditions. These results suggest an intrinsic cardiac alteration independently of pre- or after load modifications. Even if the cardiac dysfunction is known to have an important role in the patient survival rate, until recently, no attention has been paid to the impact of load condition on cardiac function. Yet, recent study using echocardiography approaches, focussing on parameters less prone to be modified by load condition, demonstrated that diastolic (a low  $E'$  value and a high  $E/E'$  ratio), but not systolic (ejection fraction) alterations are associated with a higher mortality (13). Isolated working heart model allows to evaluate the cardiac function under very standardise situation.

In this study we confirm hyperlactemia, hypotension and tachycardia associated with septic shock. This increase in heart rate is also observed by isolated working heart, after a 20 minutes' period of stabilisation. Study of the different parameters involved in cardiac cycle demonstrated a decrease only in the diastolic filling period. Recently, Wei et al focused on the heart rate alteration associated with septic shock and evaluated the impact of a specific decrease in heart rate with an inhibitor of If channel (Ivabradine) that will specifically impact on the diastolic filling period (7). However, they do not report any improvement of cardiac function while heart rate was efficiently reduced by approximately 20%. These results suggest a cardiac dysfunction independently of neurohumoral stimulation, and especially a high catecholamine level. Beneficial effects of  $\beta$ -blockers are still discussed (14) and some reports beneficial effects associated with an improvement of inflammatory and metabolic pathways while others reports controversial improvements of cardiac function and especially cardiac output (15). Taken together all these data suggest that cardiac function might be altered independently of load condition and neurohumoral stimulation.

Isolated working heart technique have brought a new insight on cardiac function and might be a good strategy to understand intrinsic cardiac dysfunction associated with septic shock, to highlight its mechanisms and so, to test new cardiac therapies before an in vivo evaluation. This observation might help to unravel why so many treatments on the septic cardiomyopathy failed to demonstrate beneficial effects and results from our study opens new avenue.

## REFERENCES

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):801–10.
2. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest*. 1992 Jun;101(6):1644–55.
3. Prabhu MM, Yalakala SK, Shetty R, Thakkar A, Sitapara T. Prognosis of Left Ventricular Systolic Dysfunction in Septic Shock Patients. *J Clin Diagn Res JCDR*. 2015 Mar;9(3):OC05–8.
4. Hochstadt A, Meroz Y, Landesberg G. Myocardial Dysfunction in Severe Sepsis and Septic Shock: More Questions Than Answers? *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2011 Jun;25(3):526–35.
5. Roul D, Rozec B, André G, Merlet N, Tran Quang T, Lauzier B, et al. Increased  $\beta$ 2-adrenergic vasorelaxation at the early phase of endotoxemic shock in rats. *Vascul Pharmacol*. 2015 Sep;72:181–9.
6. Wei C, Kattani NA, Louis H, Albuisson E, Levy B, Kimmoun A. If Channel Inhibition with Ivabradine Does not Improve Cardiac and Vascular Function in Experimental Septic Shock. *Shock*. 2016 Feb;
7. Ozer EK, Iskit AB. Effects of endothelin and nitric oxide on cardiac muscle functions in experimental septic shock model. *Hum Exp Toxicol*. 2016 Mar;35(3):267–75.
8. Hobai IA, Edgecomb J, LaBarge K, Colucci WS. Dysregulation of intracellular calcium transporters in animal models of sepsis-induced cardiomyopathy. *Shock* Augusta Ga. 2015 Jan;43(1):3–15.
9. Zaky A, Deem S, Bendjelid K, Treggiari MM. Characterization of cardiac dysfunction in sepsis: an ongoing challenge. *Shock* Augusta Ga. 2014 Jan;41(1):12–24.
10. Merlet N, Piriou N, Rozec B, Grabherr A, Lauzier B, Trochu J-N, et al. Increased beta2-adrenoceptors in doxorubicin-induced cardiomyopathy in rat. *PloS One*. 2013;8(5):e64711.
11. Lauzier B, Vaillant F, Merlen C, Gélinas R, Bouchard B, Rivard M-E, et al. Metabolic effects of glutamine on the heart. Anaplerosis versus the hexosamine biosynthetic pathway. *J Mol Cell Cardiol*. 2013 Feb;55:92–100.
12. Landesberg G, Gilon D, Meroz Y, Georgieva M, Levin PD, Goodman S, et al. Diastolic dysfunction and mortality in severe sepsis and septic shock. *Eur Heart J*. 2012 Apr;33(7):895–903.
13. Sanfilippo F, Corredor C, Fletcher N, Landesberg G, Benedetto U, Foex P, et al. Diastolic dysfunction and mortality in septic patients: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med*. 2015 Jun 1;41(6):1004–13.
14. Rozec B. How to slow down septic hearts? *J Mol Cell Cardiol*. 2014 Sep;74:112–
15. Chacko CJ, Gopal S. Systematic review of use of  $\beta$ -blockers in sepsis. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. 2015;31(4):460–5.

**Table 1:** Evaluation of septic shock model by measurement of hemodynamic arterial pressure, lactatemia and echocardiographic parameters from CTRL and LPS rats 3 hours after shock induction by LPS.

		CTRL (n=7)	LPS (n=9)
<b>Hemodynamic parameters</b>	Mean arterial pressure (mmHg)	87.17 ±1.30	72.75 ±4.69 *
<b>Metabolic parameters</b>	Lactatemia (mmol.L <sup>-1</sup> )	2.80 ±1.23	4.74 ±1.41 *
<b>Cardiac function</b>	Heart rate (beats.min <sup>-1</sup> )	373.29 ±7.78	419.78 ±5.32 *
	Cardiac output (mL.min <sup>-1</sup> )	92.96 ±9.14	59.68 ±7.37 *
	Ejection fraction (%)	80.71 ±2.24	65.11 ±3.06 *
	E/A ratio	1.10 ±0.02	0.85 ±0.01 *
	E/E' ratio	0.25 ±0.03	0.17 ±0.01 *

Values are expressed as mean ± SEM of 6-9 hearts, \* p<0.05 vs CTRL.

E: early left ventricular filling velocity; A: late left ventricular filling velocity; E': early diastolic velocities at the septal mitral annulus

**Table 2:** Main parameters of LV functions were recorded in basal conditions 3 hours after shock induction after a 20 min stabilization period by isolated working hearts from CTRL and LPS rats.

		CTRL (n=7-12)	LPS (n=8-12)
	Heart rate (beats.min <sup>-1</sup> )	261.99 ±10.05	297.32 ±9.64 *
	Cardiac output (mL.min <sup>-1</sup> )	72.09 ±6.44	44.60 ±4.06 *
<b>Systolic function</b>	Systolic ejection period (msec)	60.82 ±1.82	65.50 ±1.79
	Contraction time (msec)	37.83 ±5.91	46.17 ±6.04
	LVP max (mmHg)	140.58 ±4.77	106.21 ±4.05 *
	dP/dt max (mmHg.sec <sup>-1</sup> )	5823 ±502	3030 ±194 *
	Relaxation time (sec)	55.14 ±1.66	56.91 ±2.33
<b>Diastolic function</b>	Diastolic filling period (sec)	84.09 ±10.17	46.13 ±5.59 *
	LVP min (mmHg)	-9.29 ±3.07	0.84 ±2.41 *
	dP/dt min (mmHg.sec <sup>-1</sup> )	-4495 ±368	-2416 ±133 *

Values are expressed as mean ± SEM of 7-12 hearts, \* p<0.05 vs CTRL.

LVP: left ventricular pressure; dP/dt: derivative pressure, max: maximal or min: minimal



**Annexe 3: La stimulation de la voie de biosynthèse des hexosamines est bénéfique dans la phase précoce du choc septique.**

**O-GlcNAc stimulation is beneficial at the early phase of endotoxemic shock**

**Marine Ferron<sup>1</sup>, Julien Cadiet<sup>1</sup>, Valentine Prat<sup>1</sup>, Valentin Charrier<sup>1</sup>, Angelique Erraud<sup>1</sup>,  
Virginie Aillerie<sup>1</sup>, Matthieu Mevel<sup>2</sup>, Edith Bigot, John C Chatham<sup>3</sup>, Chantal Gauthier<sup>1</sup>,  
Bertrand Rozec<sup>1,4</sup>, Benjamin Lauzier<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>: INSERM UMR-1087, CNRS UMR-6291, L'université de Nantes, l'institut du thorax, Nantes France

<sup>2</sup>: Atlantic Gene Therapies-INSERM UMR 1089, Nantes, France

<sup>3</sup>: Division of Molecular and Cellular Pathology, Birmingham, United-States

<sup>4</sup>: Department of anesthesiology and intensive care unit of Nantes-Laennec Hospital, France

En cours de révision pour soumission.

# Thèse de Doctorat

Valentine PRAT

## Identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

Identification of new therapeutic targets for heart failure with preserved ejection fraction

### Résumé

L'insuffisance cardiaque (IC) à fraction d'éjection préservée (FEP) est la forme majoritaire d'IC. Cette pathologie liée au vieillissement est un problème de santé public majeur pour laquelle il n'existe aucun traitement efficace. L'accès à des biopsies humaines est très difficile, et hélas, les modèles animaux actuellement décrits dans la littérature ne reproduisent que partiellement le phénotype des patients, et ne permettent pas d'en comprendre la physiopathologie complexe. L'équipe dans laquelle a été réalisé ce travail possède un modèle de rat transgénique surexprimant le récepteur  $\beta_3$ -adrénergique ( $\beta_3$ -AR) humain à la membrane des cellules endothéliales. L'objectif du projet de thèse a été de (1) caractériser le phénotype cardiaque de ce modèle, et d'en fixer les modalités d'études (âge des animaux, sexe, statut hormonal), (2) déterminer l'adéquation du modèle au profil des patients, notamment en situation de stress cardiovasculaire, (3) d'identifier de nouvelles pistes de recherche afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Nous avons pu mettre en avant chez les rats mâles un profil proche du patient ICFEP, c'est-à-dire la mise en place d'une dysfonction diastolique au cours du vieillissement, sans altération de la fraction d'éjection, associée à une fibrose myocardique et à une inadéquation à des conditions de stress. Parallèlement aux anomalies fonctionnelles, ce rat présente une altération de l'expression des protéines du cycle du calcium, et une abolition de la réponse inotrope négative du  $\beta_3$ -AR endothélial. Notre modèle semble être particulièrement prometteur pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pertinentes pour les patients.

### Mots clés

Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée, modèle animal, récepteur  $\beta_3$ -adrénergique, physiologie cardiaque, endothélium, dysfonction diastolique

### Abstract

Heart failure with preserved ejection fraction is a major health burden, concerning the elderly, yet without any accurate treatment for the patients. This situation is partly due to the lack of patient biopsies and unfortunately, to the lack of used animal models which reproduce even partly the human condition. These limitations do not allow the determination of accurate therapeutic targets for the patients. In this context, this work focused on a new transgenic animal model developed by the research team: a rat overexpressing the  $\beta_3$ -adrenoceptor ( $\beta_3$ -AR) at the endothelial level. The aim of my thesis was to (1) characterize the phenotype of the model, and determine its study conditions (age, sex and hormonal status of the rats), (2) verify the relevance of the model regarding patient's phenotype in stress condition, (3) identify some innovative research axis in order to discover potential new therapeutic targets. Our results showed that male rats expressed with ageing a phenotype close to the patients' condition: a diastolic dysfunction without any impairment of systolic function, associated with myocardial fibrosis and an impaired response to a cardiovascular stress. Conversely to functional alterations, these rats presented an impaired expression of calcium cycling protein and an abolished negative inotropic response of the endothelial  $\beta_3$ -AR. Our model may be of particular interest to determine new and accurate therapeutic targets for the patients.

### Key Words

Heart failure with preserved ejection fraction, animal model,  $\beta_3$ -adrenoceptor, cardiac physiology, endothelium, diastolic dysfunction