

Université de Montréal

Rôle des biomarqueurs dérivés des neutrophiles dans la pathologie de l'insuffisance cardiaque

Par

Diana Chaar

Programme des Sciences Biomédicales, Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (PhD)

en Sciences Biomédicales, Option Générale

Avril 2021

© Diana Chaar, 2021

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée

Rôle des biomarqueurs dérivés des neutrophiles dans la pathologie de l'insuffisance cardiaque

Présentée par

Diana Chaar

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Éric Thorin

Président-rapporteur

Michel White

Directeur de recherche

Martin G. Sirois

Codirecteur

Alain Rivard

Membre du jury

Pedro Geraldès

Examineur externe

Pierre Haddad

Représentant du doyen

Résumé

L'insuffisance cardiaque (IC) est définie comme l'incapacité du cœur à fournir un débit cardiaque suffisant lorsque la demande augmente. L'IC survient lors d'une diminution 1) de la fonction contractile, définie comme l'IC à fraction d'éjection réduite (IC-FER) ou 2) de remplissage reliée à une rigidité du myocarde ou du péricarde, définie comme l'IC à FE préservée (IC-FEP). Les altérations de la fonction cardiaque contribuent à l'activation neuro-hormonale et à l'inflammation sous-clinique lors de l'apparition et l'évolution de l'IC. L'IC est caractérisée par de multiples anomalies du système vasculaire et musculaire périphériques. La diminution de la perfusion périphérique peut causer de multiples désordres au niveau vasculaire et musculaire chez les IC. L'inflammation sous-clinique contribue significativement à la progression de l'IC. Puisque les neutrophiles sont les principaux acteurs dans la sécrétion de cytokines inflammatoires, l'objectif de cette thèse est de caractériser le profil pro- et anti-inflammatoire dérivé des neutrophiles chez les patients souffrant d'IC-FER et IC-FEP, ainsi que l'impact du diabète (DM) sur ce profil.

Les biomarqueurs plasmatiques et relâchés par les neutrophiles isolés à partir du sang provenant de 20 volontaires sains (CTL), 52 IC-FER et 25 IC-FEP et 22 DM ont été quantifiés. L'observation majeure de notre étude est la réduction importante (>90%) des taux circulants de *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) chez les patients IC-FER et IC-FEP avec ou sans DM par rapport aux CTL. En parallèle, nous avons observé une diminution significative de la sécrétion du VEGF par les neutrophiles des patients IC-FER et IC-FEP avec une réduction maximale (92%) chez les IC-FEP+DM comparé aux CTL après une stimulation avec des médiateurs pro-inflammatoires. La diminution du VEGF associée à une inflammation accrue de l'endothélium micro-vasculaire coronarien conduit à une dérégulation de la génération de l'oxyde nitrique (NO). Une diminution marquée des taux circulants de NO a été observée chez les patients diabétiques et atteints d'IC comparé aux CTL. Les niveaux circulants d'IL-6 et d'IL-8 sont significativement augmentés chez les patients IC et DM et de manière synergique chez les IC-FEP avec DM. Ces données, combinées à une diminution du VEGF et du NO, suggèrent une altération significative de la fonction macro-vasculaire et micro-vasculaire chez les patients IC-FEP, qui est intensifiée par la présence de

diabète. La libération d'IL-8 et d'IL-6 par les neutrophiles était significativement augmentée chez les patients DM et IC-FEP+DM après un traitement au lipopolysaccharide (LPS). Nous avons aussi démontré une augmentation de l'IL-1RA circulante, une cytokine anti-inflammatoire dans toutes les cohortes de patients. Cependant, la sécrétion de l'IL-1RA par les neutrophiles était diminuée dans toutes les cohortes par rapport aux CTL, indépendamment de l'agoniste utilisé. Ces observations suggèrent que les neutrophiles ne sont pas les principales cellules qui secrètent l'IL-1RA, mais bien les monocytes, les hépatocytes, les cellules épithéliales et les adipocytes.

Les données scientifiques provenant de ces études nous ont permis de mieux caractériser le rôle du neutrophile dans l'IC et permettront de valider l'hypothèse stipulant que les biomarqueurs dérivés des neutrophiles jouent un rôle significatif dans l'IC.

Mots-clés : Insuffisance cardiaque, insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite, insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée, biomarqueurs, inflammation, neutrophiles, diabète.

Abstract

Heart failure (HF) is characterized by the inability of the heart to provide sufficient cardiac output when there is an increase in demand. This may result from a decrease in 1) contractile function, defined as heart failure with reduced ejection fraction (HF-REF) or 2) filling related to stiffness of the myocardium or pericardium, defined as HF with preserved EF (HF-PEF). Alterations in cardiac function contribute to neuro-hormonal activation and subclinical inflammation during the onset and progression of HF. HF is characterized by multiple abnormalities in the peripheral vascular and muscular system. Decreased peripheral perfusion can cause vascular and peripheral muscular disorders in HF-REF and HF-PEF. However, the cellular mechanisms involved in these observations remain unknown. Subclinical inflammation significantly contributes to the progression of HF. Since neutrophils are the first players for the inflammatory cytokines release, the main objective of this doctoral thesis is to characterize the pro and anti-inflammatory profile derived from neutrophils in patients suffering from HF-REF and HF-PEF, as well as the impact of diabetes (DM) on this profile.

The plasma and neutrophil released biomarkers from the blood of 20 healthy control volunteers (CTL), 52 HF-REF and 25 HF-PEF and 22 DM were quantified. The major finding of our study is the significant reduction (>90%) of the circulating levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in HF-REF and HF-PEF patients with or without diabetes compared to CTL. In parallel, we observed a significant decrease of the VEGF secretion by the neutrophils from HF-REF and HF-PEF patients with a maximal reduction (92%) in HF-PEF+DM compared to CTL after pro-inflammatory agonists stimulation. The decrease of VEGF associated with an increased inflammation of the coronary microvascular endothelium leads to a deregulation of nitric oxide (NO) generation. A marked decrease in circulating NO levels was indeed observed in diabetic and HF patients compared to CTL. Circulating levels of IL-6 and IL-8 increased significantly in HF and DM patients, being maximal in HFPEF+DM. These data, when combined with a decrease in VEGF and NO, support a significant impairment of macrovascular and microvascular function in HF-PEF patients, which is increased by the presence of diabetes.

The release of IL-8 and IL-6 from neutrophils was significantly increased in DM and HF-PEF+DM patients after treatment with lipopolysaccharide (LPS). We also observed an increase in circulating IL-1RA, an anti-inflammatory cytokine in all patients' cohorts. However, IL-1RA secretion by the neutrophils was decreased in all cohorts compared to CTL, independently of the agonist used. These observations suggest that neutrophils are not the main cells that secrete IL-1RA, but rather monocytes, hepatocytes, epithelial cells and adipocytes.

The scientific data from these studies have allowed us to better characterize the role of neutrophils in HF and will validate the hypothesis that biomarkers derived from neutrophils play a significant role in the HF.

Keywords: Heart failure, heart failure with reduced ejection fraction, heart failure with preserved ejection fraction, biomarkers, inflammation, neutrophils, diabetes.

Table des matières

Résumé.....	5
Abstract.....	7
Table des matières.....	9
Liste des tableaux.....	17
Liste des figures.....	19
Liste des sigles et abréviations.....	21
Remerciements.....	31
Chapitre 1 – Introduction.....	33
1. Insuffisance cardiaque.....	33
2. Épidémiologie.....	33
3. Pathophysiologie.....	34
3.1 Adaptation du muscle cardiaque de type intrinsèque.....	36
3.1.1 Remodelage ventriculaire.....	36
3.1.2. Principales adaptations du muscle cardiaque de type modulateur.....	37
3.1.2.1 Anomalies des récepteurs β -adrénergique cardiaque.....	37
3.1.2.2 Anomalies du système rénine-angiotensine-aldostérone régional cardiaque..	38
3.1.2.3 Anomalies des cytokines- les récepteurs du TNF- α de type R1 et R2 comme prototype.....	40
3.2 Maladaptations périphériques vasculaires et musculaires.....	42
3.3 Conséquences hémodynamiques des désordres intrinsèques et modulateurs.....	44
3.4 Conséquences systémiques et métaboliques de l'IC.....	47
3.4.1 Systèmes neuro-hormonaux vasoconstricteurs.....	47
3.4.1.1 Activation du système sympathique.....	47

3.4.1.2	Le système arginine- vasopressine.....	50
3.4.1.3	Endothéline I	50
3.4.2	Les neurohormones de type vasodilatateur	51
3.4.2.1	Les peptides natriurétiques	51
3.4.2.2	Prostaglandines vasodilatatrices.....	52
3.4.2.3	Le monoxyde d'azote (NO).....	53
3.5	Inflammation subclinique dans l'IC	53
3.6	Biomarqueurs reliés au remodelage et à l'inflammation en IC	56
3.6.1	Biomarqueurs de la nécrose des myocytes	56
3.6.2	Biomarqueurs du remodelage de la matrice extracellulaire	57
3.6.3	Autres biomarqueurs d'inflammation d'intérêt	58
3.6.3.1	La C-reactive protein (CRP)	59
3.6.3.2	Les cytokines	59
3.6.3.2.1	L'IL-6 et l'IL-8	59
3.6.3.2.2	L'IL-1 et l'IL-1RA.....	60
3.6.3.2.3	L'IL-10	61
4.	Traitement de l'IC.....	62
4.1	Traitement pharmacologique des patients IC-FER : la quadruple thérapie	62
4.1.1	Inhibition du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA)	63
4.1.1.1	Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (IECA).....	63
4.1.1.2	Antagonistes des récepteurs AT1 de l'angiotensine II (ARA).....	63
4.1.2	L'inhibiteur de l'angiotensine et de la néprilysine (ARNI)	64
4.1.3	Bêta-bloqueurs.....	65
4.1.4	Antagonistes des minéralocorticoïdes et autres diurétiques	66

4.2 Considérations pharmacologiques dans l'IC-FEP	67
4.2.1 IECA dans IC-FEP	67
4.2.2 Antagonistes des récepteurs AT1 de l'Ang II	67
4.2.3 β -bloquants	68
4.2.4 Dérivés nitrés.....	68
4.3. IC, diabète et utilisation des iSGLT2	69
5. Défibrillateur implantable	70
6. Le neutrophile humain	71
6.1 Formation	71
6.2 Fonctions	72
6.2.1 La migration.....	73
6.2.2 La phagocytose.....	73
6.2.3 Dégranulation.....	75
6.2.4 Explosion oxydative.....	76
6.2.5 Génération de médiateurs de l'inflammation	76
6.2.5.1 Médiateurs peptidiques	78
6.2.5.2 Médiateurs lipidiques.....	80
6.2.6 Production de NETs	80
6.3. Implications pathologiques des neutrophiles	81
6.3.1 Le rôle des neutrophiles dans l'athérosclérose.	81
6.3.1.1 Le rôle des neutrophiles dans l'initiation de l'athérosclérose	81
6.3.1.2 L'implication des neutrophiles dans l'activation et le recrutement des monocytes.....	82

6.3.1.3 Contribution des neutrophiles dans la déstabilisation de la plaque athéromateuse	83
6.3.2 Rôle des neutrophiles dans le diabète	84
6.3.3 Rôle des neutrophiles dans l'insuffisance cardiaque	87
7. Objectifs de recherche	88
Chapitre 2 – Neutrophils pro and anti-inflammatory cytokine release in patients with heart failure and reduced ejection fraction	90
Abstract:	91
Introduction:	92
Methods:	94
Population	94
Selection criteria of healthy control volunteers and patients	94
Study protocol – plasma, serum and neutrophil collection	95
Biomarkers quantification	95
Neutrophil stimulation and treatments	95
Statistical analysis	96
Results	97
Effect of pro-inflammatory agonists on the release of selected cytokines by neutrophils	97
Discussion	99
Study limitations	102
Conclusion	102
Acknowledgements	104
Funding	104
Declaration of interest	104

References.....	105
Figure legends	111
Figures	112
Figure 1.....	112
Figure 2.....	113
Figure 3.....	114
Tables	115
Table 1 Patient’s demographics	115
Response to reviewers	117
Chapitre 3 – Neutrophils and circulating pro- and anti-inflammatory biomarkers in diabetes and heart failure with preserved ejection fraction	120
Abstract	121
Introduction.....	123
Methods	125
Population	125
Selection criteria of healthy control volunteers and patients	125
Study protocol – plasma, serum and neutrophil collection.....	126
Biomarkers quantification.....	126
Neutrophil stimulation and treatments.....	127
Statistical analysis.....	127
Results	128
Effect of pro-inflammatory agonists on the release of selected cytokines by neutrophils.....	129
Discussion.....	131
Study limitations.....	133

Conclusion	133
Acknowledgements	134
Funding	134
Declaration of interest	134
References.....	135
Figure legends	143
Figures	145
Figure 1.....	145
Figure 2.....	146
Figure 3.....	147
Tables	148
Table 1 Patient’s demographics	148
Chapitre 4 – Discussion	150
1. Réduction de 90% des taux circulants du VEGF ainsi que sa libération par les neutrophiles chez les patients IC.....	150
2. Réduction du NO plasmatique chez IC-FEP et IC-FER	153
3. Augmentation des molécules d'adhésion endothéliale solubles.....	154
4. Impact de l’insuffisance cardiaque sur la réponse inflammatoire et anti-inflammatoire du neutrophile.....	155
6. L’impact du diabète sur les réponses pro- et anti-inflammatoires des neutrophiles	157
Chapitre 5 : Conclusions.....	160
1. Conclusions et retour sur les objectifs	160
2. Perspectives futures	161
Références bibliographiques.....	163

Liste des tableaux

Tableau 1. – Les facteurs de risques de l'IC.....34

Tableau 2. – Les principales classifications de l'IC35

Liste des figures

Figure 1. –	La relation pression-volume du cycle cardiaque.....	44
Figure 2. –	Relation entre la longueur du sarcomère et la force de contraction.	45
Figure 3. –	Courbes pression volume du VG dans les 4 phases du cycle myocardique.....	47
Figure 4. –	L'effet du système autonome sur la régulation cardiaque	49
Figure 5. –	Dysfonction et remodelage myocardique dans IC-FER et IC-FEP.	54
Figure 6. –	Les biomarqueurs de l'IC.....	58
Figure 7. –	Les étapes de la diapédèse des neutrophiles.	74
Figure 8. –	Les différents médiateurs peptidiques et lipidiques produits par les neutrophiles.	77

Liste des sigles et abréviations

ACC: *American college of cardiology*

ADH: *anti-diuretic hormone*

AHA: *American Heart Association*

AMPc: *cyclic adenosine monophosphate*

AngII: *angiotensin II*

ANP: *atrial natriuretic peptide*

ARA: antagoniste de récepteurs AT1 de l'angiotensine II

ARM: antagoniste des minéralocorticoïdes

ARNI: inhibiteur de l'angiotensine et de la néprilysine

AT1: récepteur de l'angiotensine II

AT2: récepteur de l'angiotensine II

ATP: adénosine triphosphate

AVID: *Antiarrhythmics Versus Implantable Defibrillators*

AVP: arginine vasopressine

β -ARK1: *beta-adrenergic receptor kinase*

BB: Bêta-bloqueurs

BNP: *Brain natriuretic peptide*

CARE-HF: *cardiac resynchronization in heart failure*

CCL2: *C-C motif chemokines ligand 2*

CD80: *cluster of differentiation 80*

CD83: *cluster of differentiation 83*

CD86: *cluster of differentiation 86*

CE: cellules endothéliales

cGMP: *cyclic guanosine monophosphate*

CHARM: *candesartan in heart failure-assessment of reduction in mortality and morbidity*

Cl⁻: ion chlorure

CLPs: *chitinase-like protein*

CONSENSUS: *cooperative north Scandinavian Enalapril survival study*

cPLA2: enzyme cytosolique phospholipase A2

CRP: protéine C réactive

CRT: thérapie par resynchronisation cardiaque

CXCR1: *C-X-C motif chemokine receptor 1*

CXCR2: *C-X-C motif chemokine receptor 2*

DAG: diacylglycérol

DAI: défibrillateur implantable

DAPA-HF: *Dapagliflozin and Prevention of Adverse Outcomes in Heart Failure*

DC: débit cardiaque

DD: *death domaine*

DM: diabète

ELITE: *evaluation of Losartan in the elderly study*

EMPEROR-Reduced Trial: *Empagliflozin Outcome trial in patients with chronic heart failure with reduced ejection fraction*

EMPHASIS-HF: *Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And Survival Study In Heart Failure*

EPHESUS: *Eplerenone Post-AMI Heart Failure Efficacy and Survival Study*

ET-1: endothéline 1

ET-A: Récepteur de l'endothéline 1

ET-B: Récepteur de l'endothéline 1

FABP: *heart-type fatty acid binding protein*

FADD: *Fas-associated death-domain-containing protein*

Fc: fréquence cardiaque

FEVG: fraction d'éjection ventriculaire gauche

FMD: *flow-mediated vasodilatation*

fMLP: *formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine*

FRP: récepteur du fMLP

Gαq: *Gq protein alpha*

G-CSF: *granulocyte colony-stimulating factor*

GM-CSF: *granulocyte-macrophage-colony stimulating factor*

GRK: *G protein-coupled receptor kinase*

H⁺: ion hydrogène

HbA1c: hémoglobine glycosylée

H₂O₂: peroxyde d'hydrogène

HOCl: acide hypochloreux

hsCRP: *high sensitivity CRP*

HTA: hypertension artérielle

ICAM: *intercellular adhesion molecule*

IC: insuffisance cardiaque

IC-FEP: insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée

IC-FER: insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite

IC-mEF: insuffisance cardiaque *mid-range ejection fraction*

IECA: inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II

IgG: immunoglobulines

IL-1: interleukine-1

IL-1RA: antagoniste du récepteur de l'interleukine-1

IL-1RI: récepteur de type I de l'IL-1

IL-1: interleukine-1

IL-3: interleukine-3

IL-6: interleukine-6

IL-8: interleukine-8

IL-10: interleukine-10

IL-18: interleukine-18

IL-23: interleukine 23

IMT: *intima-media thickness*

IP3: inositol 1, 4, 5-triphosphate

IPRESERVE: *Irbesartan in Heart Failure with Preserved Systolic Function*

IRS-1: récepteur de l'insuline 1

iSGLT2: inhibiteur du cotransporteur sodium-glucose de type 2

K+: ion potassium

LFA1: *leucocyte function associated antigen*

LPS: lipopolysaccharide

LTB4: leucotriène B4

MAPK: *mitogen activated protein kinase*

MCV: maladie cardiovasculaire

MIRACLE: *Multicenter insync randomized clinical evaluation*

MMP: *matrix metalloproteinase*

MMP-1: métalloprotéinase-1

MMP-2: métalloprotéinase-2

MMP-8: métalloprotéinase-8

MMP-9: métalloprotéinase-9

MPO: myéloperoxydase

MR-proANP: *mid regional proANP*

MVs: microvésicules extracellulaires

Na+: ion sodium

NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NEATHF-PEF: *Nitrate's Effect on Activity Tolerance in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction*

NE: noradrénaline

NET: *neutrophil extracellular traps*

NGAL: *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*

NMVs: microparticule dérivée du neutrophile

NO: oxyde nitrique

NOS: *nitric oxide synthase*

NP: peptide natriurétique

NPR-C: récepteur de clairance des peptides natriurétiques

NT-proBNP: *N-terminal prohormone BNP*

NYHA: *New York Heart Association*

O₂⁻: anion superoxide

OH⁻: *hydroxyl radical*

P: pression

PAF: *platelet-activating factor*

PARADIGM-HF: *Prospective Comparison of ARNi With ACEi to Determine Impact on Global Mortality and Morbidity in Heart Failure*

PGE₂: prostaglandine E₂

PIGF: *placental growth factor*

PGI₂: prostaglandine I₂

PI3K: *phosphatidylinositol-3-phosphate*

PIP₂: *phosphatidylinositol 4, 5-biphosphate*

PKA: protéine kinase A

PKG: protéine kinase G

PLC β : phospholipase C β

PMN: polymorphonucléaire

PR3: protéinase-3

PSGL1: *P-selectin glycoprotein ligand-1*

RALES: *Randomized Aldactone Evaluation Study*

ROS: *reactive oxygen species*

SAVE: *Survival and ventricular enlargement study*

SENIORS: *Study of the Effects of Nebivolol Intervention on Outcomes and Rehospitalization in Seniors With Heart Failure*

SNS: système nerveux sympathique

SOLVD: *studies of left ventricular dysfunction*

SRAA: système rénine-angiotensine-aldostérone

ST-2: *soluble interleukin 1 receptor*

TA: tension artérielle

TBARS: acide thiobarbiturique

T1DM: diabète type 1

T2DM: diabète type 2

TIMP-1: inhibiteur tissulaire du métalloprotéinase-1

TIMP-4: inhibiteur tissulaire du métalloprotéinase-4

TNF- α : *tumor necrosis factor-alpha*

TNFR1: récepteur du TNF- α

TNFR2: récepteur du TNF- α

TRACE: *trandolapril cardiac evaluation study*

TRADD: *TNFR1-associated death-domain containing protein*

TRAF-2: *TNFR-associated factor-2*

TXA2: thromboxane A2

V: volume

Val-HeFT: *valsartan heart failure trial*

VCAM: *vascular cell adhesion molecule*

VD: ventricule droite

VEGF: *vascular endothelial growth factor*

VEGFR2: *VEGF receptor 2*

VES: volume d'éjection systolique

VG : ventricule gauche

V-HeFT: *vasodilator heart failure trial*

VTD : volume télédiastolique

VTS : volume télésystolique

YKL-40 : *chitinase 3-like protein*

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à Dr Michel White, pour avoir accepté de diriger cette thèse. Merci Dr White pour ton support et ta bonne humeur. Merci de m'avoir donné la chance de travailler dans la recherche clinique et de m'avoir donné l'opportunité de participer à des congrès au Canada et aux États-Unis. Grâce à vous, j'ai tellement évolué en sciences et en recherche scientifique.

Au Dr Martin G. Sirois, Codirecteur de thèse. Les mots me manquent pour exprimer toute la gratitude que je voudrais vous promulguer. Alors, tout simplement, Merci. Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire, merci de votre confiance, merci de votre disponibilité infinie, merci de votre écoute et votre soutien précieux qui a fait progresser ce travail. Je n'oublierai jamais votre expression « il faut battre le fer pendant qu'il est chaud. »

Je remercie également Dr Yahye Merhi, Directeur du département Sciences biomédicales, pour les conseils qu'il m'a donnés.

Je remercie Dr Paul-Eduard Neagoe pour toute l'aide qu'il m'a apporté au cours de ma thèse, autant du point de vue scientifique qu'informatique. Vos compétences scientifiques et votre implication m'ont permis de mener à bien ces études avec confiance et sérénité.

Merci à tous les membres du labo pour les moments partagés : Elisabeth, Tharsika, Branka, Simon, Pauly. Vous étiez ma famille canadienne.

Un grand merci également à l'équipe du Dr Michel White. En particulier, à Hélène Brown pour son aide dans la partie clinique et dans les bases de données, à Maria Ida Dardes pour son aide précieux dans les prélèvements, tout le temps souriante et tout le temps disponible. À George Gabor pour son aide précieux à faire les prélèvements sanguins et surtout pour ses Jokes qui ne se terminent pas.

Je remercie mes parents de toujours m'avoir encouragé dans ce que je fais, vous êtes les meilleurs parents au monde, un support sans limite.

Finalement je remercie spécialement mon fils Marcello et mon mari Fawaz pour son humour, sa compréhension, son aide, sa présence, sa joie de vivre et son amour.

Chapitre 1 – Introduction

1. Insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque (IC) est un syndrome clinique complexe qui est causé par divers facteurs structurels ou fonctionnels cardiaques qui altèrent les fonctions de contractilité et de remplissage du sang par les ventricules [1]. Ceci entraîne une incapacité du muscle cardiaque à assurer un débit sanguin suffisant afin de répondre aux besoins métaboliques des tissus et des organes périphériques lors d'une augmentation de demande telle que l'exercice. Les principaux symptômes caractéristiques de l'IC sont la dyspnée, la fatigue et l'intolérance à l'exercice.

Les patients atteints d'IC sont subdivisés en trois phénotypes basés sur la valeur de la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) [2-5]. Plus spécifiquement, le terme « IC systolique », ou IC à fraction d'éjection réduite (IC-FER), est attribué aux patients ayant une FEVG $\leq 40\%$; tandis que le terme « IC diastolique », ou IC à fraction d'éjection préservée (IC-FEP), fait référence aux patients présentant de l'IC avec une FEVG $\geq 50\%$ [4-9]. Plus récemment le consensus européen a suggéré une troisième catégorie de patients, soit l'IC avec fraction d'éjection intermédiaire nommée IC-mEF (« mid-range ejection fraction ») [10]. Cette thèse traitera seulement de l'IC-FER et de l'IC-FEP, la troisième étant une nouvelle classification très récente, largement adoptée par la communauté européenne, qui n'a pas été prise en compte lors de l'élaboration et de la réalisation de nos études. Les principales caractéristiques de ces deux populations (réduite et préservée) seront détaillées dans les prochaines sections.

2. Épidémiologie

L'IC est une pathologie qui atteint 15 millions de personnes dans la plupart des pays industrialisés, dont approximativement 5 millions aux États-Unis et 400,000 au Canada [8, 11]. L'IC est une maladie qui apparaît principalement chez les personnes âgées de 65 ans et plus. Les coûts associés aux traitements et à l'hospitalisation de ces patients représentent le double des coûts reliés au diagnostic et traitement des patients ayant le cancer [12].

Par ailleurs, chaque année, l'IC cause le décès d'environ 4500 Canadiens [13] et provoque l'hospitalisation de 100 000 patients [13]. Or, les données actuelles suggèrent une croissance de ces nombres au cours des prochaines années étant donné le vieillissement de la population et l'augmentation des facteurs de risque de l'IC (Tableau 1). Aussi, le phénotype le plus prévalent sera vraisemblablement celui de l'IC-FEP.

Principaux facteurs
Hypertension
Diabète
Athérosclérose
Maladies valvulaires
Médicaments cardiotoxiques
Âge
Obésité
Dyslipidémies
Tabac

Tableau 1. – Les facteurs de risques de l'IC

Plusieurs classifications ont été établies pour mieux comprendre l'évaluation clinique ainsi que la sévérité des patients atteints de cette pathologie. Les deux principales classifications sont celle de la *New York Heart Association (NYHA)* basée sur les symptômes et la tolérance à l'exercice [14-16] et celle de l'*American Heart Association (AHA)* basée sur les changements structurels du cœur par rapport à la gravité des symptômes [17] (Tableau 2).

3. Pathophysiologie

L'IC est une condition pathologique qui résulte en une diminution du débit cardiaque [18]. Au début de la maladie il y a diminution du débit cardiaque à l'effort, et lors de sa progression il y a diminution du débit cardiaque au repos. Afin de rétablir un débit cardiaque normal, l'organisme met en œuvre une série de mécanismes de compensation myocardiques, systémiques et périphériques [19]. Au niveau cardiaque, il existe des changements de nature intrinsèque (structuraux), tels le remodelage des ventricules gauche et droit, ainsi que des changements d'ordre modulateur, tels la désensibilisation des récepteurs adrénergique et de type AT1, ainsi que des récepteurs au *tumor necrosis factor (TNF- α)* [19, 20]. Les principaux mécanismes adaptatifs

ACC/AHA*		NYHA**	
Stade A	<ul style="list-style-type: none"> Risque élevé de développer de l'IC. Aucune anomalie fonctionnelle ou structurelle identifiée. Asymptomatique 	Classe I	<ul style="list-style-type: none"> Pas de limitation de l'activité physique. L'activité physique ordinaire ne cause pas de fatigue, de palpitation ou de dyspnée.
Stade B	<ul style="list-style-type: none"> Présence d'une maladie structurelle du cœur principalement associée au développement de l'IC. Asymptomatique 	Classe II	<ul style="list-style-type: none"> Faible limitation de l'activité physique. Confortable au repos. L'activité physique ordinaire engendre la fatigues, des palpitations ou la dyspnée.
Stade C	<ul style="list-style-type: none"> IC symptomatique associée à une maladie structurelle du cœur. 	Classe III	<ul style="list-style-type: none"> Limitation marquée de l'activité physique. Confortable au repos. Des activités moins qu'ordinaire engendrent de la fatigue, des palpitations ou de la dyspnée.
Stade D	<ul style="list-style-type: none"> Malgré une médication optimale, il y a la présence d'une maladie structurelle du cœur avancée avec des symptômes d'IC au repos. 	Classe IV	<ul style="list-style-type: none"> Incapable de pratiquer une activité physique sans inconfort. Symptômes d'IC au repos. Si une activité physique est pratiquée, l'inconfort augmentera.

* Classification basée sur la structure et les dommages au cœur.

** Classification basée sur les symptômes et la capacité fonctionnelle.

ACC: American College of Cardiology; AHA: American Heart Association; NYHA: New York Heart Association

Tableau adaptée de Hunt et SA. *Circulation* 2005; 112. 182S-185S et *The Criteria New York Heart Association and Criteria of Diagnostic of Disease of Heart and Great Vessels*, 9th éd. Little Brown & Co, 1994, p. 253-256.

Tableau 2. – Les principales classifications de l'IC

et mal adaptatifs incluent l'élévation de diverses neurohormones et de plusieurs biomarqueurs pro-inflammatoires [20, 21]. En conséquence à la diminution de la perfusion périphérique, de multiples changements significatifs ont été rapportés au niveau du système artériel macro- et microvasculaire et périphérique, de même qu'au niveau de la distribution et de la fonction des fibres musculaires périphériques [10].

3.1 Adaptation du muscle cardiaque de type intrinsèque

3.1.1 Remodelage ventriculaire

L'IC est causée par une perte des myofibroblastes reliée à diverses insultes au niveau régional cardiaque (infarctus du myocarde) ou global (exemple : sarcoïdose, myocardite). Le cœur défaillant est caractérisé par des changements au niveau de la masse, de la géométrie et de la composition du myocarde [22, 23]. Conséquemment à cette perte de cardiomyocytes, il y a l'hypertrophie des cellules contractiles restantes. Ainsi, la perte des myofibroblastes, l'hypertrophie ventriculaire réactionnelle couplée aux changements quantitatifs et fonctionnels des régulateurs de la matrice extracellulaire résulte en un changement structurel important du cœur appelé remodelage. Ces changements intrinsèques s'installent progressivement en cas de surcharge hémodynamique ou suivant des dommages directs du myocarde [24]. Ces adaptations sont quantitativement et qualitativement différentes au niveau du cœur gauche comparé au cœur droit. Aussi, il existe deux types d'hypertrophie, soit concentrique ou excentrique, causant un remodelage distinct des ventricules, créant ainsi deux phénotypes distincts d'IC, soit l'IC-FEP ou l'IC-FER [24, 25].

Dans l'IC-FER, le ventricule développe un processus de dilatation et d'hypertrophie appelé remodelage excentrique. Cette hypertrophie est associée à une perte des cardiomyofibroblastes entraînant des modifications cellulaires et sous-cellulaires multiples incluant une dysrégulation des métalloprotéinases matricielles (MMP) et de leurs inhibiteurs (TIMP) [26]. Il y a une dilatation de la cavité ventriculaire (augmentation de sa dimension et de son volume) et un amincissement de la paroi [27]. Cette dilatation est principalement due à la dégradation du réseau de collagène par des protéases incluant les métalloprotéinases [28]. Ainsi, l'affaiblissement du réseau fibreux, suite à l'activation des protéases de la matrice, résulte en un glissement (« slippage ») des myocytes les uns par rapport aux autres, favorisant ainsi la dilatation du ventricule. Par conséquence, la cavité ventriculaire devient plus dilatée et le plus souvent de façon concomitante à la diminution de la fraction d'éjection.

L'IC-FEP est quant à elle définie par une anomalie de remplissage du ventricule gauche en présence d'une fraction d'éjection supérieure à 45 ou 50% selon les définitions [29-31]. Elle est

causée par un défaut de relaxation du ventricule gauche et conséquemment par un désordre de la distensibilité (ou encore une diminution de la compliance) [1, 29-31]. Elle est caractérisée par une rigidité accrue du myocarde [4, 5], associée le plus souvent à un remodelage concentrique des ventricules (augmentation du rapport épaisseur / diamètre) et dans environ 30% d'une hypertrophie franche du ventricule gauche (VG). Le ventricule est donc petit avec diminution des volumes télé-systolique et télé-diastolique et du volume d'éjection. Cette condition est observée le plus souvent dans des situations de surcharge telle qu'en présence de l'hypertension artérielle [4] [4, 5], du diabète et lors du vieillissement accéléré (en présence d'autres conditions morbides). Dans ces situations, la masse du VG est donc normale ou augmentée [32]. La perte nette des myocytes est moindre, mais l'activation des fibroblastes entraîne une synthèse de collagène qui produit une fibrose [32]. Ainsi, les myocytes cardiaques sont individuellement hypertrophiés et la matrice extracellulaire comprend une proportion plus importante de la trame fibreuse dont le collagène [33].

3.1.2. Principales adaptations du muscle cardiaque de type modulateur

3.1.2.1 Anomalies des récepteurs β -adrénergique cardiaque

L'IC se caractérise par des anomalies significatives au niveau de nombreux systèmes de transduction. Des changements importants surviennent au niveau des récepteurs β -adrénergiques [34, 35]. Le système nerveux sympathique (SNS) exerce ses effets, tels que l'augmentation du débit et de la contractilité cardiaque via l'activation des récepteurs β -adrénergiques dont trois sous-types ont été identifiés β_1 , β_2 et β_3 [36]. Plus spécifiquement, des changements significatifs ont été observés au niveau des récepteurs β_1 et β_2 dans l'IC [37]. L'activation du récepteur β_1 -adrénergique active la protéine kinase PKA via la stimulation d'activité de l'adénylate cyclase, ce qui a comme effet, une augmentation de la contractilité cardiaque et une augmentation de la FEVG [37-40]. Dans le cas de l'IC, il y a une diminution de la densité des récepteurs β_1 [40] qui progresse de façon proportionnelle avec la sévérité de l'IC. Par conséquent, il y a diminution de formation de l'adénylate cyclase, contribuant à la diminution de la réserve contractile ainsi qu'une atténuation de la fréquence cardiaque maximale à l'effort [40, 41]. En conditions d'IC, la signalisation β_2 est atténuée, alors que l'expression de ces récepteurs

ne diminue pas [41]. Le récepteur β_2 se lie à une protéine G_i qui a comme effet l'activation des phosphodiésterases et l'inhibition de la PKA. De plus, l'activation de G_i stimule d'autres voies comme la phosphoinositide 3 kinase (PI3K) couplée à Akt qui induisent des effets anti-apoptotiques [40-43]. De plus, les récepteurs β_1 et β_2 sont sur-stimulés dans l'IC, résultant en une désensibilisation du couplage à l'adénylate cyclase [37, 44]. En fait, ces récepteurs sont phosphorylés au niveau des domaines intracellulaires par la PKA, et des kinases GRK (*G protein receptor kinase*), dont la plus décrite est GRK2 aussi nommée β -ARK1 (kinase des récepteurs β_1) [44, 45]. La phosphorylation par les GRK2 augmente l'affinité des récepteurs à la β -arrestine, et ceci cause un découplage fonctionnel entre le récepteur et la protéine G, et conduit également à l'internalisation du récepteur qui peut alors être dégradé ou recyclé vers la membrane cellulaire [45]. Il a été démontré que les niveaux de β -ARK1 sont augmentés dans le cœur défaillant, et que cette augmentation est atténuée par un traitement avec des B-bloquants [45].

3.1.2.2 Anomalies du système rénine-angiotensine-aldostérone régional cardiaque

Le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) joue un rôle crucial dans le maintien de la fonction cardiaque et le soutien de la tension artérielle (TA) dans l'IC. Sa stimulation augmente la vasoconstriction périphérique et ainsi aide à maintenir une TA adéquate lorsque la pompe cardiaque est déficiente en situation aiguë [46]. L'activation du SRAA et l'hyperactivité sympathique sont nécessaires au maintien du débit sanguin périphérique suite à un dommage cardiaque. Par ailleurs, une activation soutenue du SRAA contribue au remodelage adverse au niveau du myocarde et subséquemment à la progression de l'IC [46]. Ainsi, l'augmentation de l'activité sympathique entraîne une vasoconstriction périphérique de l'artère rénale afférente et une diminution du flux sanguin vers l'appareil juxtaglomérulaire du rein, ayant pour effet la libération de rénine [47, 48]. Également, l'activation du SNS active les récepteurs β_1 -adrénergiques sur les cellules juxtaglomérulaires, ce qui stimule davantage la libération de rénine. Plus spécifiquement, les effets du système sympathique sur la sécrétion de rénine sont médiés par des décharges locales de noradrénaline qui, en se liant à des récepteurs β_1 -adrénergiques activent une voie de transduction de signal via AMPc. Le tonus sympathique facilitée par l'activation du système SRAA peut également agir indirectement sur la sécrétion de rénine en stimulant les récepteurs α -adrénergiques, ce qui conduit à une vasoconstriction de l'artériole

afférente. Cette vasoconstriction active les barorécepteurs rénaux et stimule la *macula densa*, aboutissant à une augmentation de la sécrétion de rénine. Par un processus enzymatique, la rénine transformera l'angiotensinogène, dérivant du foie, en angiotensine I, qui à son tour sera transformé en angiotensine II par l'action de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. L'angiotensine II ainsi générée provoque un remodelage cardiaque avec une hypertrophie des myocytes et une augmentation de la fibrose [48, 49].

Au niveau périphérique, l'Ang II est responsable d'une vasoconstriction des artéioles des muscles squelettiques et des artères rénales, cette dernière provoquant une rétention hydrosodée [50]. Elle entretient l'activité du SNS et contribue à la libération d'hormones telles que, la noradrénaline, l'endothéline et la vasopressine qui ont également une action vasoconstrictrice et qui amplifie la rétention hydrique. Ces effets résultent de la liaison de l'Ang II sur son récepteur AT1[51], qui provoque l'activation de Gαq [52]. Plusieurs études ont démontré l'implication de Gαq dans le développement de l'hypertrophie dans l'IC [52]. A son tour Gαq va phosphoryler la phospholipase C β (PLCβ) [52] qui transformera le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) en inositol 1, 4,5-triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG) [52]. L'IP3 se liera aux récepteurs à l'IP3 pour libérer le calcium du réticulum sarcoplasmique contribuant à la vasoconstriction [52-55].

La plupart des effets délétères cardiaques sont reliés à l'activation du récepteur AT1. En effet, une étude a montré qu'une déficience en AT1aR dans un modèle de souris conduit à une croissance normale [56] mais présente une réduction de l'athérosclérose aortique [56, 57].

Quant au récepteur AT2, il est exprimé au niveau des vaisseaux sanguins, du cœur, du pancréas, des glandes surrénales, des reins et du cerveau [58]. Les voies de signalisation qui y sont associées sont encore mal comprises. Néanmoins, dans des conditions physiologiques, le récepteur AT2 est un antagoniste physiologique du récepteur AT1 puisqu'il favorise la vasodilatation et inhibe la croissance cellulaire [59]. En conditions pathologiques, il est surexprimé lors d'une lésion cardiaque tel un infarctus du myocarde alors qu'il est moins présent lors de l'IC [50, 60]. Tout comme les récepteurs β, les récepteurs de type AT1 et AT2 au niveau du myocarde sont désensibilisés et diminués en nombre pour le récepteur de type AT1. Ceci suggère une étroite

collaboration et régulation entre les systèmes sympathique β -adrénergique et à l'angiotensine dans le cœur humain.

3.1.2.3 Anomalies des cytokines- les récepteurs du TNF- α de type R1 et R2 comme prototype

Tout comme les récepteurs de type β -adrénergiques et de type AT1 et AT2, il y a des anomalies présentes au niveau des récepteurs de certaines cytokines dont le *tumor necrosis factor* (TNF- α) en IC. Ceci soutient le concept du rôle important de plusieurs cytokines dans la régulation de la fonction cardiaque dans le cœur défaillant ainsi que leur régulation croisée. Le TNF- α est une des cytokines les plus étudiées dans les maladies cardiovasculaires [61] qui a longtemps été associée à l'IC [61]. De plus, le niveau du TNF- α dans le sérum est associé à la sévérité de la maladie [61] et pourrait également prédire le risque de mortalité des patients IC [62]. Le TNF- α exerce ses effets biologiques par l'intermédiaire de deux récepteurs, TNFR1 et TNFR2. Le TNFR1 semble être le principal récepteur de signalisation. Ces 2 récepteurs diffèrent par leurs domaines intracellulaires, et le TNFR1 se caractérise par la présence de « *death domain* » (DD), responsable de l'induction d'apoptose [63]. En effet, cette séquence de DD permet l'association de plusieurs protéines accessoires dont la *TNFR1-associated death-domain containing protein* (TRADD), la *Fas-associated death-domain-containing protein* (FADD) et le *TNFR-associated factor-2* (TRAF-2) [64] reconnus pour leurs effets d'activation des caspases et facteurs de transcription, le tout visant à induire le phénomène d'apoptose [64, 65]. Cependant, les actions biologiques du TNF- α restent paradoxales, puisqu'à haute dose le TNF- α favorise l'apoptose, alors que la production chronique endogène de TNF- α , surtout dans les pathologies, favorise plutôt l'inflammation, la prolifération cellulaire et la différenciation cellulaire [63, 64] [66]. De plus, le TNF- α permet la production de collagène et de métalloprotéinase (MMP-9), favorisant ainsi le remodelage tissulaire [66].

La liaison du TNF- α à ses récepteurs favorise l'internalisation du complexe cytokine-récepteur conduisant ainsi à une désensibilisation [61]. Les changements biologiques liés au TNF- α et des récepteurs de type R1 et R2 en IC supportent le rôle de l'inflammation comme mécanismes régulateurs significatifs dans l'IC [61-63].

Plusieurs interleukines jouent un rôle d'importance en IC. Parmi celle-ci l'IL-6, l'IL-8, IL-1 β et l'IL-18 semblent jouer un rôle pivot dans la pathophysiologie de l'IC. Le rôle d'IL-6 et IL-8 sera présent en détail un peu plus loin dans cette thèse. Les principaux membres de la famille des interleukines 6 sont l'IL-6, le facteur inhibiteur de la leucémie (LIF) et la cardiotrophine-1 (CT-1). Des études ont démontré des concentrations élevées d'IL-6 dans le sérum des patients souffrant d'IC. Par ailleurs, l'IL-6 a été impliquée dans l'hypertrophie cardiomyocytaire mais aussi dans la dysfonction contractile des myocytes [67]. Il a été observé dans des échantillons des patients de l'étude SOLVD, en plus des taux de TNF- α , une augmentation des taux circulants d'IL-6 par rapport à des sujets contrôles [68]. En plus du TNF- α et de l'IL-6, l'expression à la fois de la CT-1 et du LIF augmente également dans le cœur défaillant. La CT-1, une cytokine pro-inflammatoire faisant partie de la famille de l'IL-6, peut effectivement être une cible thérapeutique dans certaines formes de défaillances cardiaques. Par ailleurs, CT-1 joue un rôle dans l'IC ainsi qu'une implication dans l'athérosclérose a été démontré [67, 69-71]. La haute concentration de CT1, dans le plasma, jumelée à l'augmentation d'autres marqueurs comme la N-terminal pro B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) peut être un indicateur pour le déclenchement de la mort ou de l'IC suite à un infarctus aigu du myocarde [72]. En effet, il a été démontré une certaine corrélation entre la présence élevée de la CT-1 et une augmentation de la masse du ventricule gauche. Cette hypertrophie est caractérisée par une élongation de cellules myocardiques tout en gardant la largeur de la cellule intacte [69]. Il y a aussi une augmentation des unités sarcomériques en séries et non pas en parallèle [69]. Ceci démontre que l'hypertrophie induite par la CT-1 est distincte de celle induite par une stimulation α -adrénergique [69]. De plus, un traitement contre la CT-1, pour normaliser la concentration de la CT-1 dans le plasma des patients hypertendus, était associé avec une régression de l'hypertrophie du ventricule gauche ainsi qu'une diminution de la masse du ventricule gauche [69]. Comme on peut le voir, la CT-1 joue un rôle dans l'IC par sa persistance dans le système à la suite d'un problème cardiovasculaire. La CT-1 représente une belle cible thérapeutique. En effet, la réduction de cette cytokine dans le sang a des effets bénéfiques. En effet, une étude a démontré que l'utilisation de deux médicaments, valsartan (VAL) et spironolactone (SPL), pour le traitement de l'IC avait un effet cardioprotecteur pour les rats dans lesquels on a induit chimiquement l'hypertrophie [73]. Cette étude est intéressante puisque VAL

et SPL, tout en rétablissant la masse du cœur par rapport à la masse du corps, ont inhibé l'expression de l'ARNm de CT-1. Par ailleurs, les auteurs rapportent que le losartan, un bloqueur du récepteur de l'Ang II, produit un effet similaire en diminuant l'hypertrophie induite par CT-1 [73]. Cependant, cette étude n'a pas démontré le mécanisme par lequel VAL et SPL inhibent l'induction de CT-1.

Concernant l'IL-1 β et l'IL-18, ils sont synthétisés sous forme de précurseurs inactifs et sont clivés en forme mature active par une enzyme convertase de l'IL-1 β (ou caspase 1) [74]. La signalisation de l'IL-1 peut être un médiateur essentiel dans la pathogenèse de l'IC en supprimant la contractilité cardiaque, en favorisant l'hypertrophie du myocarde et en induisant l'apoptose des cardiomyocytes [75]. Par ailleurs, l'IL-1 est une des cytokines les plus puissantes et elle est présente dans le myocarde de patients atteints de cardiomyopathie idiopathique dilatée [76]. En plus, des études ont montré l'implication de l'IL-1 dans l'apoptose myocardique, l'hypertrophie et l'arythmie.

3.2 Maladaptations périphériques vasculaires et musculaires

L'IC de phénotype réduite ou préservée est associée à une diminution de flot périphérique entraînant des changements dans la structure et la fonction des vaisseaux de divers calibres ainsi qu'au niveau des muscles périphériques. Outre la vasoconstriction artériolaire résultante de l'activation neurohormonale, la vasodilatation dépendante de l'endothélium est altérée au niveau des vaisseaux artériels de différents calibres. Ceci est due à une production accrue de substances vasoconstrictrices, particulièrement l'endothéline, et à une diminution de la capacité de l'endothélium à libérer de l'oxyde nitrique [77]. Ce déficit en vasodilatation amplifie l'hypoperfusion reliée à l'atteinte du myocarde, résultant en une réduction significative du débit sanguin systémique. Il en résulte la fatigue ainsi qu'une intolérance à l'effort. Outre ces modifications, il existe des anomalies structurales et métaboliques au niveau des muscles périphériques [77]. La réduction chronique du transport en oxygène joue un rôle important dans l'apparition de ces anomalies, du déconditionnement ainsi que des symptômes d'IC.

Conséquemment aux changements vasculaires, ainsi qu'au déconditionnement, la masse musculaire est diminuée chez les patients avec IC [77, 78]. Les anomalies structurales et métaboliques des muscles sont aussi accompagnées par un changement de la répartition de l'ultrastructure de la fibre musculaire squelettique. Ainsi, la proportion des fibres de type II, plus particulièrement de type IIB, est augmentée [79, 80]. De plus, ces fibres à contraction rapide (type II et IIB) sont aussi atrophiées. Cela implique une diminution des fibres de type I, oxydatives et résistantes à la fatigue, et aussi une réduction du nombre de mitochondries [81] et une atrophie des fibres à contraction rapide. L'ensemble conduit à une diminution de la production d'ATP expliquant la fatigue à l'effort. Les anomalies périphériques semblent être plus marquées et pourraient jouer un rôle pathophysiologique plus important dans l'IC-FEP.

Les données cliniques ont démontré une diminution importante de la capacité des muscles périphériques à extraire de l'oxygène dans l'IC-FEP. Aussi, la présence de comorbidités dans l'IC-FEP contribue à un état pro-inflammatoire avec une diminution de la biodisponibilité en NO, engendrant ainsi une dysfonction endothéliale ainsi qu'une structure vasculaire anormale tant au niveau cardiaque que périphérique. Diverses études ont évalué la fonction et la structure vasculaire chez des patients IC-FEP en mesurant la dilatation médiée par le flux (FMD; *flow-mediated vasodilatation*) et la vasodilatation induite par la nitroglycérine [82, 83]. Ils ont également mesuré l'épaisseur de l'intima-media (IMT) en tant qu'indice de la structure vasculaire chez des patients IC-FEP en comparant à des patients sans IC [82]. La FMD et la vasodilatation induite par la nitroglycérine étaient significativement plus petites, alors que l'IMT de l'artère était significativement plus importante chez les patients IC-FEP comparé aux patients sans IC. Ceci suggère que la dysfonction endothéliale et la structure vasculaire anormale peuvent contribuer à la pathogenèse et à la progression de l'IC-FEP. Outre ces anomalies structurales et fonctionnelles, le muscle périphérique des patients IC-FEP est semblable au muscle du patient souffrant de myopathie mitochondriale. Chez ces patients, une diminution de l'extraction de l'oxygène pour un même débit cardiaque a confirmé l'importance des anomalies artérielles et musculaires dans la pathophysiologie de l'IC-FEP.

3.3 Conséquences hémodynamiques des désordres intrinsèques et modulateurs

Le débit cardiaque est défini par l'équation suivante : débit cardiaque (DC) = fréquence cardiaque (FC) x volume d'éjection systolique (VES). Afin de maintenir un DC suffisant, il faut moduler soit la FC ou le VES. La régulation du VES dépend de la pré-charge, la post-charge, et la force de contractilité [84, 85]. Le VES est anormal dans les deux types d'IC.

La relation entre le volume (V) et la pression (P) ventriculaire caractérise le fonctionnement du ventricule [86]. Les paramètres P-V en télédiastole définissent la précharge et en télésystole la postcharge. La figure 1 démontre la relation entre la courbe pression-volume.

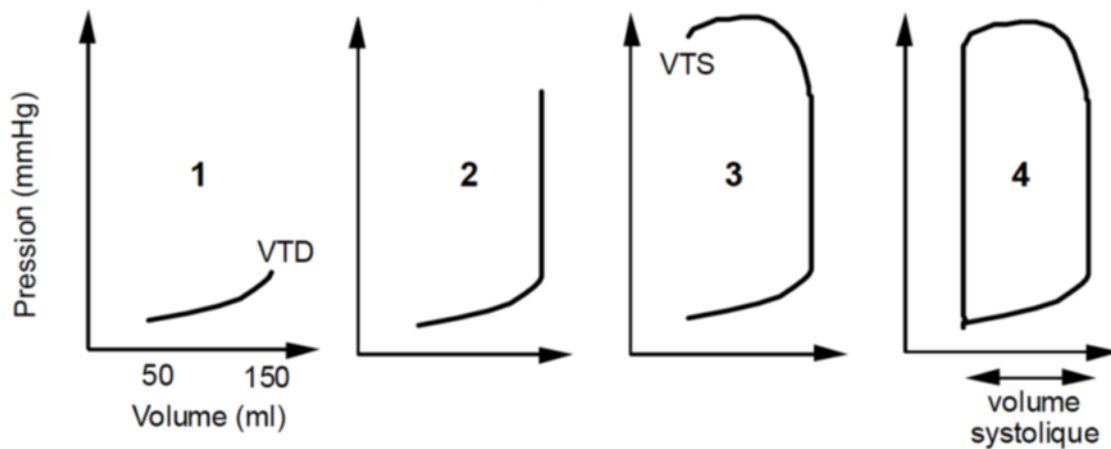
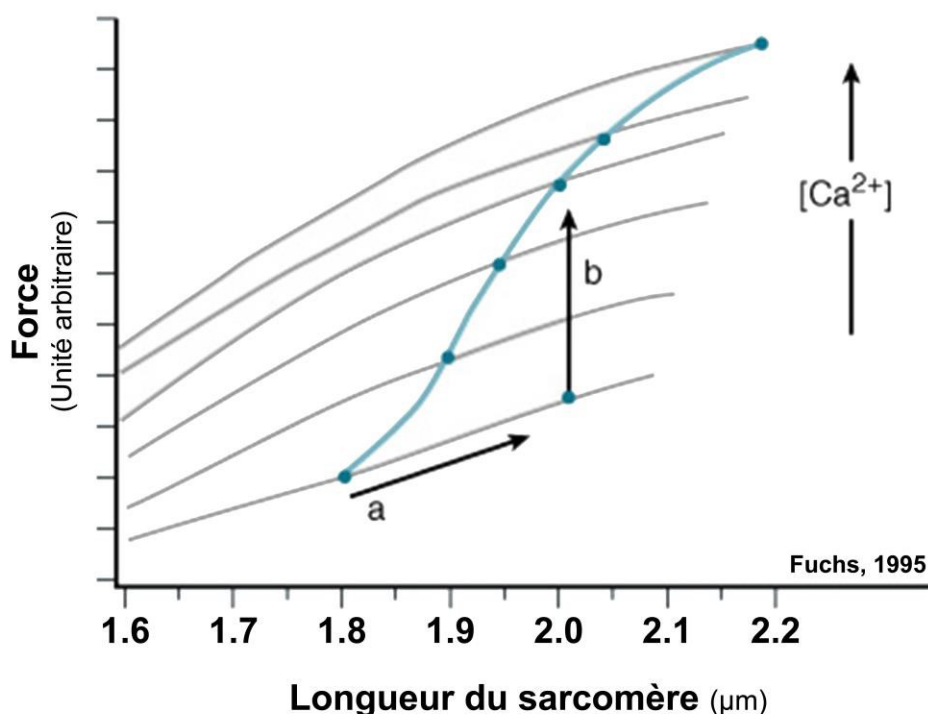


Figure 1. – La relation pression-volume du cycle cardiaque.

Les courbes représentent les 4 phases du cycle cardiaque soit : (1) le remplissage du ventricule gauche pour parvenir au VTD ainsi que l'augmentation de la pression ventriculaire, (2) la phase de contraction isovolumique au cours de laquelle la pression s'élève sans changement de volume, (3) l'éjection du contenu du ventricule gauche ce qui induit une diminution de volume de ce dernier afin d'atteindre le VTS et, (4) phase de relaxation isovolumique lors de laquelle la pression baisse sans variation de volume.

La précharge ou le volume télédiastolique (VTD) représente le volume de sang se trouvant dans le ventricule gauche à la fin de la diastole. La précharge est augmentée par la modification du retour veineux conséquent à l'augmentation du volume sanguin et la dilatation ventriculaire. L'augmentation du VTD étire les sarcomères du ventricule gauche ce qui augmente leur force de contraction selon la loi de Frank-Starling [86, 87]. Par conséquent, le VES est augmenté lorsque le cœur est plus distendu. En effet, selon la loi de Frank-Starling, la force de contraction est d'autant plus importante que les sarcomères des fibres musculaires présentent une longueur optimale d'étirement. Malgré ces compensations tant en augmentation de volume que de contractilité, ces



mécanismes adaptatifs sont déficients en IC. En effet, la réponse hémodynamique selon la loi de Frank-Starling est significativement perturbée dans l'IC créant une réponse aplatie du débit cardiaque suite à une augmentation de la précharge. La figure 2 représente la relation entre la longueur du sarcomère, qui serait optimale aux alentours de 2,22 µm, et la force générée.

Figure 2. – Relation entre la longueur du sarcomère et la force de contraction.

Tiré de [86].

Chez un sujet défaillant cardiaque avec IC-FER, l'augmentation de la précharge et de la force de contraction des myocytes restants sont des mécanismes précoces actifs pour maintenir un débit cardiaque stable. En effet, l'altération de la performance systolique contribue à une dilatation ventriculaire gauche afin de maintenir le volume systolique (Frank-Starling). Ainsi, le rapport épaisseur/rayon est diminué et la distensibilité de la chambre ventriculaire gauche accrue [88]. Il s'en suit un déplacement vers le bas et vers la droite de la relation pression volume télédiastolique (Figure 3), permettant au VG de se dilater sans augmentation trop importante des pressions de remplissage diastolique [88].

L'IC-FEP est associée à la présence de nombreuses comorbidités, dont l'hypertension artérielle (HTA), la dysfonction rénale, le diabète et l'obésité [29]. L'HTA, est presque constamment présente dans les antécédents des patients IC-FEP. Ceci provoque une augmentation de la postcharge du VG et à la suite de la tension pariétale qui est compensée par l'hypertrophie concentrique du VG [29]. Cette hypertrophie s'accompagne d'une altération de la relaxation et de la compliance [4, 5, 89, 90]. La rigidité du VG observée dans l'IC-FEP est suivie d'une augmentation de la pression télédiastolique du VG et d'une diminution du VES suite à la diminution de volume [4]. La diminution de la distensibilité entraîne une déviation vers le haut et vers la gauche de la relation pression-volume diastolique [91].

Tout comme dans l'IC-FER, la défaillance de la loi de Starling (atténuation de l'augmentation du VES et pression intra-ventriculaire élevée en réponse à l'augmentation de la précharge) contribue à limiter le débit cardiaque à l'effort et donc la capacité fonctionnelle des patients IC-FEP.

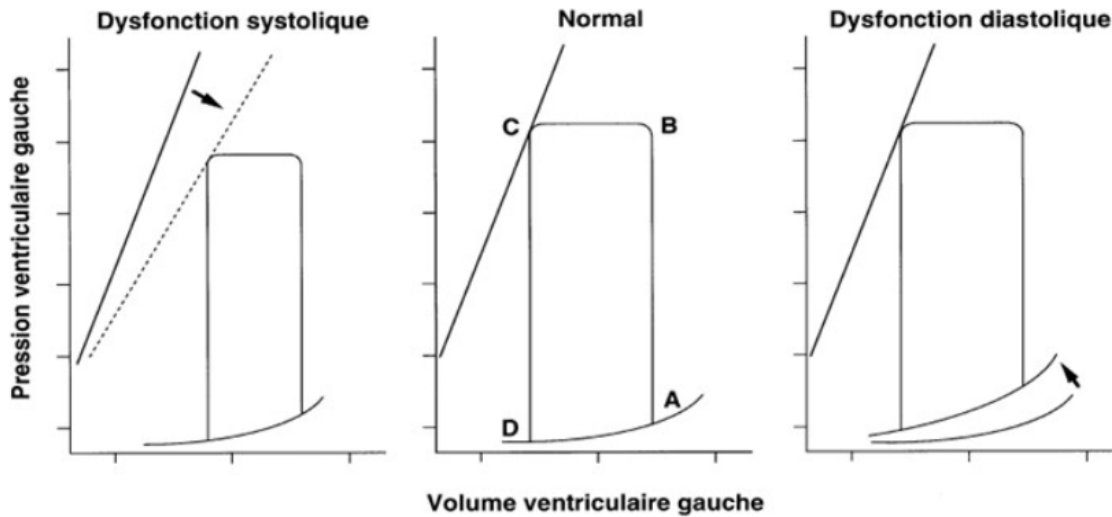


Figure 3. – Courbes pression volume du VG dans les 4 phases du cycle myocardique.

A : contraction isovolumetrique, B : éjection, C : relaxation et D : remplissage d'un cycle cardiaque normal (au centre), au cours de l'IC-FER (gauche) et de l'IC-FEP (droite). Tiré de [88, 91].

3.4 Conséquences systémiques et métaboliques de l'IC

3.4.1 Systèmes neuro-hormonaux vasoconstricteurs

Les désordres de la structure cardiaque et de sa réserve contractile contribuent à la diminution du débit cardiaque et conséquemment aux anomalies de régulation des barorécepteurs cardio-pulmonaires à haute pression (artériel) et à basse pression (veineux). Ces désordres sont à la genèse de l'activation de l'activité neuro-humorale augmentée en IC. Les hormones de type « constrictives » tels les systèmes adrénergiques, l'endothéline, l'arginine-vasopressine et « vasodilatatrices » tels l'ANP (*atrial natriuretic peptide*), le BNP (*brain natriuretic peptide*), le NO et les prostaglandines sont élevées dans l'IC quel que soit le phénotype.

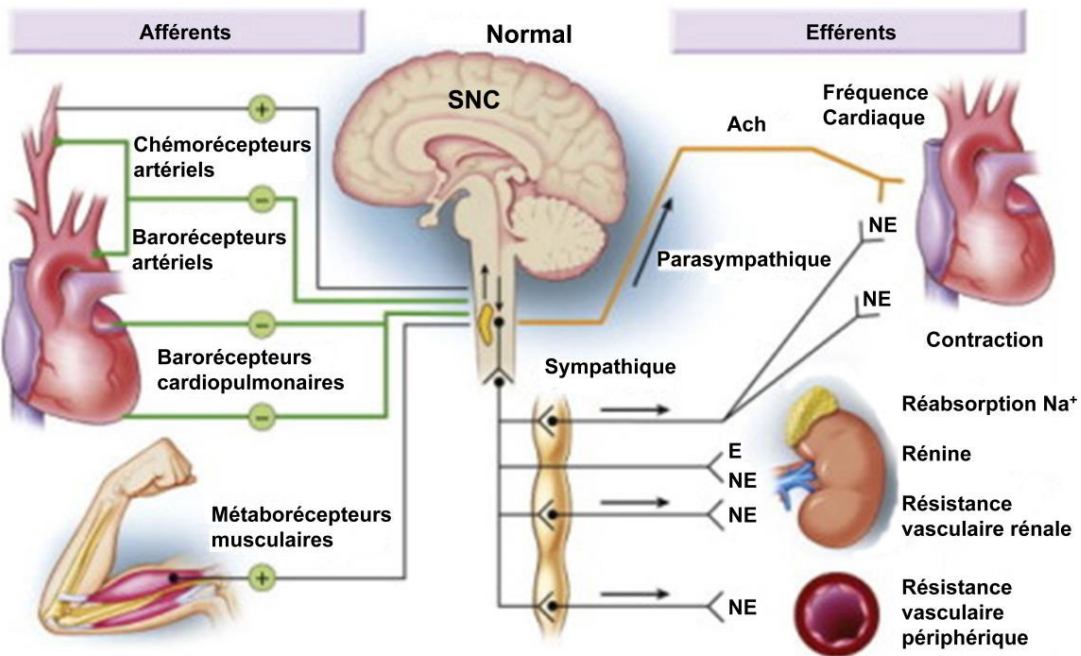
3.4.1.1 Activation du système sympathique

La diminution du débit cardiaque en cas d'IC entrainerait une diminution de la pression moyenne et de la pression pulsée qui est détectée par les barorécepteurs carotidiens. Le système sympathique ou adrénergique est donc activé de façon généralisée, résultant en une

augmentation de la fréquence cardiaque, de la contractilité ainsi qu'une vasoconstriction systémique générale [92], ce qui permet un maintien de la pression artérielle tout en augmentant le travail du VG et du VD. À long terme, ces effets contribuent au remodelage cardiaque et causent une diminution de l'expression de récepteurs β par l'altération de signalisation des voies de la G protéine. Il s'agit d'un phénomène de désensibilisation [92] qui, lorsque maintenu, engendre la diminution du nombre de ces récepteurs (« *downregulation* »).

La figure 4 montre l'implication des systèmes sympathique et parasympathique chez un sujet sain et chez un sujet insuffisant cardiaque. Chez les sujets sains (Fig. 4A), le système sympathique est inhibé via les influx nerveux inhibiteurs des barorécepteurs artériels et cardiopulmonaires. Chez les sujets atteints d'IC (Fig. 4B), le système sympathique est stimulé par les influx nerveux excitateurs des barorécepteurs et des chémorécepteurs artériels [93, 94]. Ainsi, la libération du neurotransmetteur, la noradrénaline (NE), à la suite de l'activation du système sympathique, permet une augmentation de la fréquence cardiaque [92, 95] aidant à maintenir un débit cardiaque constant malgré une baisse du volume d'éjection systolique.

A.



B.

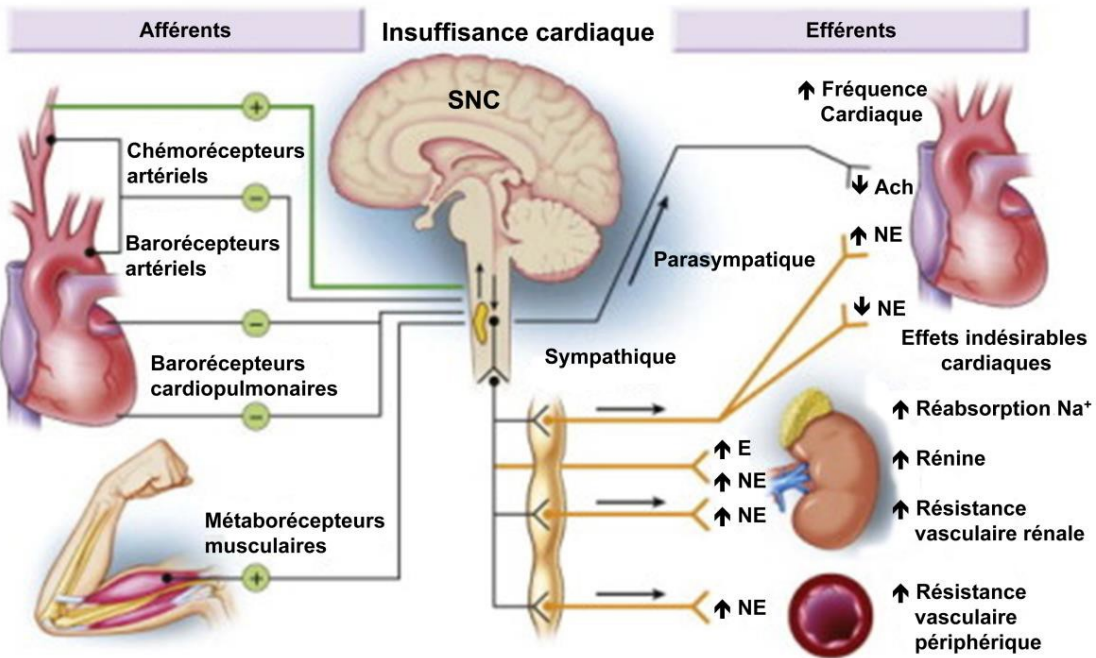


Figure 4. – L'effet du système autonome sur la régulation cardiaque

3.4.1.2 Le système arginine- vasopressine

La principale fonction de la vasopressine ou ADH est son action antidiurétique. Son taux plasmatique élevé corrèle avec la gravité de l'IC. L'activation de la production de l'ADH est due à la diminution de la PA au niveau des barorécepteurs et aux effets de l'angiotensine II. Par ailleurs, l'ADH favorise la vasoconstriction et la réabsorption hydrique à l'origine, entre autres, de l'hyponatrémie de l'IC terminale. Elle provoque principalement une réabsorption d'eau au niveau du néphron distal, ce qui conduit à une élévation du volume intravasculaire avec augmentation de la précharge du VG et du débit cardiaque [18]. Suite à la liaison de la vasopressine à son récepteur V1, une augmentation de la concentration en ions calcium a lieu [96, 97], conduisant ainsi à la contraction des vaisseaux [98, 99]. Cette action vasoconstrictrice permet ainsi une augmentation de la pression sanguine [99]. Cependant, les seuils de réponse des récepteurs V1 et V2 semblent altérés dans l'IC.

Le récepteur V2 de la vasopressine est exprimé au niveau rénal sur les cellules du tube collecteur. La liaison à ce récepteur provoque une réabsorption d'eau au niveau des tubes distaux, conduisant à des hyponatrémies observées dans les formes sévères de l'IC [21, 97]. Selon l'étude SOLVD, il existe une corrélation positive entre l'élévation des taux plasmatiques de l'hormone ADH et l'aggravation de l'IC [100].

3.4.1.3 Endothéline I

L'endothéline I (ET-1) est un peptide vasoconstricteur sécrété par l'endothélium suite à une stimulation par de nombreux facteurs dont la thrombine, l'angiotensine II, l'arginine-vasopressine, les cytokines pro-inflammatoires et l'hypoxie [101]. Son taux plasmatique est élevé en IC et corrélé à la classe fonctionnelle (stade III et IV de la NYHA) [102, 103]. L'ET-1 joue un rôle important dans la régulation de la pression artérielle en stimulant la vasoconstriction via son récepteur ET-A [102, 103]. Il a également une action inotrope positive (augmentation de la force de contraction) par l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium [102, 103]. En effet, la liaison de l'ET-1 à son récepteur active une protéine G couplée à la phospholipase C, menant à la formation de l'IP3 et DAG. La voie de l'IP3 conduit à une augmentation intracellulaire de calcium responsable de la contraction du muscle lisse vasculaire, et la voie DAG active la PKC (protéine kinase C) entraînant ainsi une prolifération cellulaire.

Il apparait nettement que l'ET-1 et ses récepteurs (ET-A et ET-B) jouent un rôle important dans l'hypertension artérielle pulmonaire, puisque différentes études ont montré que l'expression de l'ET-1 est augmentée dans cette condition [104, 105]. Ainsi, Giaid et al. ont montré que l'expression de l'ET-1 et de son ARNm était augmentée dans les poumons de sujets atteints d'hypertension artérielle pulmonaire HTAP [106]. Pareillement, Rubens et al. ont montré une corrélation entre les concentrations plasmatiques de l'ET-1 et la gravité de l'HTAP, suggérant que l'ET-1, par son effet prolifératif, peut participer au remodelage vasculaire présent dans l'HTA [107]. Le rôle de l'endothéline ainsi que des antagonistes de l'endothéline dans l'HTA de type 2, soit celle le plus souvent retrouvée dans l'IC, demeurent un sujet de controverse [107].

3.4.2 Les neurohormones de type vasodilatateur

3.4.2.1 Les peptides natriurétiques

Les peptides natriurétiques (NP), dont le peptide atrial natriurétique (ANP) et le BNP (*brain peptide*) sont les principaux membres, sont une famille d'hormones qui est principalement générée par les cardiomyocytes. Les NP sont potentiellement des biomarqueurs de l'IC puisque leur concentration plasmatique augmente en situation pathologique, plus spécifiquement durant la mise en tension anormale de la paroi myocardique [108]. Il s'agit de facteurs pronostiques de première importance intégrés dans les directives de la pratique clinique pour le diagnostic de l'IC, tel que publié par l'American College of Cardiology, l'American Heart Association, la Heart Failure Society of America et l'European Society of Cardiology [109]. Les dosages du BNP (et du NT-proBNP) ont été perfectionnés, contrairement à l'ANP dont le dosage n'est pas fiable à cause de sa courte durée de vie [110]. Cependant, le précurseur de l'ANP, MR-proANP (*mid regional-proANP*) est plus stable, ce qui en fait une molécule plus facilement dosable [110]. Étant donné que le NT-proBNP est sécrété dans la même proportion que le BNP et que sa demi-vie est plus longue, les cliniciens l'utilisent souvent comme biomarqueur de choix pour le diagnostic et l'estimation de la sévérité de l'IC, ainsi ce test aide à distinguer une IC d'une atteinte pulmonaire sévère présentant souvent les mêmes symptômes [109]. En clinique externe, le test est utile pour suivre la progression de la maladie et l'effet du traitement. Le BNP est produit au niveau de la paroi ventriculaire comme précurseur, le pré-proBNP (134 acides aminés) à la suite d'évènements

tels que l'hypoxie, l'étirement myocardique ainsi que des stimulants hormonaux comme l'Ang II, l'endothéline-1 et la catécholamine [111, 112]. À la suite d'un clivage enzymatique, le pré-proBNP est transformé en proBNP (108 acides aminés) qui est activé après sa sécrétion [113]. À ce moment, le proBNP est clivé, par les protéases furin ou corin, en deux fragments [113]. Le premier fragment (NT-proBNP) de 76 a.a. est biologiquement inactif, alors que le deuxième fragment (BNP) de 32 a.a. est biologiquement actif. L'activation du BNP peut induire l'augmentation de la vasodilatation et l'inhibition du SRAA [114, 115]. La demi-vie du BNP est de 20 minutes contre 120 minutes pour le NT-proBNP [116]. La régulation des NP en circulation se fait soit par une internalisation à l'intérieur des cellules, au moyen du récepteur NPR-C (récepteur de clairance des peptides natriurétiques), une dégradation à la suite d'une interaction avec une endopeptidase à la surface des cellules endothéliales ou une élimination par voie rénale [116, 117].

Les taux de BNP et de NT-proBNP sont corrélés à la sévérité de l'IC, la dysfonction ventriculaire gauche, l'augmentation des pressions de remplissage et la poste-charge ventriculaire gauche [118]. Les valeurs de BNP dans l'IC sont partiellement utilisées, car d'autres pathologies peuvent causer une augmentation des niveaux de BNP, telles que l'embolie pulmonaire et la septicémie chez les personnes âgées ainsi que l'hypertension artérielle et l'insuffisance rénale [119, 120].

3.4.2.2 Prostaglandines vasodilatatrices

Les prostaglandines, plus spécifiquement la PGI₂ et la PGE₂, synthétisés par les artérioles rénales, les glomérules et le tube collecteur, jouent un rôle inhibiteur de la vasoconstriction. Ainsi, ils permettent la vasodilatation de l'artériole glomérulaire afférente en agissant au niveau du transport de sodium [121]. Le taux de ces prostaglandines augmente dans l'IC, particulièrement pour la PGE₂ (prostaglandine E₂), la PGI₂ (prostaglandine I₂) et la PIGF (*placental growth factor*). Cliniquement, ceci est illustré par une sensibilité augmentée aux agents anti-inflammatoires non-stéroïdiens.

Il a été démontré que l'hypoperfusion rénale stimule fortement la libération de rénine et de prostaglandines par le rein [122] chez les patients atteints d'IC hyponatrémique qui présentent un taux élevé de rénine et de PGE₂ [123, 124]. En outre, les prostaglandines sont libérées en

réponse à un traitement diurétique et à la stimulation des nerfs sympathiques rénaux [122]. De nombreux vasoconstricteurs périphériques, notamment l'angiotensine II, l'endothéline et la noradrénaline, stimulent la production rénale de prostaglandines vasodilatatrices telle que la PGE2 et la PGI2 qui protègent le rein d'une vasoconstriction trop sévère [124]. La contribution des prostaglandines augmente avec la sévérité de l'IC. De plus, les prostaglandines peuvent inhiber directement la réabsorption du sodium dans les tubules rénaux et s'opposer aux actions de la libération de vasopressine médiée par l'angiotensine I dans les tubes collecteurs [125].

3.4.2.3 Le monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote (NO) est synthétisé à partir de l'enzyme NOS (*Nitric oxide synthase*) [126, 127]. Il est connu pour son action de vasodilatation artérielle en augmentant la cGMP intracellulaire [128]. En effet, le NO exerce ses effets vasoprotecteurs tels que le blocage de l'activation plaquettaire, l'inhibition d'adhérence des leucocytes à l'endothélium, la diminution de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses, empêchant ainsi une dysfonction endothéliale et éventuellement une IC [129]. L'IC de phénotype réduite ou préservée est associée à une diminution du flot périphérique entraînant des changements dans la structure et la fonction des vaisseaux et déclenchant ainsi la libération d'un réseau de cytokines pro-inflammatoires [4]. Il a été observé qu'une combinaison d'un faible taux de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) circulant et une inflammation accrue de l'endothélium microvasculaire coronarien conduit très probablement à une dérégulation de la génération de NO et augmente la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) [4].

3.5 Inflammation subclinique dans l'IC

L'IC est caractérisée par la présence de base d'une activation inflammatoire sub-clinique et des changements significatifs au niveau de l'immunité acquise [130, 131].

L'IC-FEP est caractérisé par un état inflammatoire significatif. De plus, la présence de comorbidités contribue à l'amplification de l'état pro-inflammatoire avec une élévation des cytokines circulantes pro-inflammatoires telles que l'IL-6, la CRP (protéine C réactive), le TNF- α , et la ST-2 soluble (*soluble interleukin 1 receptor*) [4]. Cette inflammation systémique est caractérisée par une augmentation de ROS, VCAM-1 et E-sélectine (Figure 5). L'expression de ces molécules d'adhésion permet

l'activation et la migration des leucocytes. Les cytokines pro-inflammatoires libérées, ainsi que la diminution de la biodisponibilité du NO et l'augmentation du peroxy-nitrite jouent un rôle dans la dysfonction endothéliale [4]. La contribution des cytokines sera discutée subséquemment dans cette thèse.

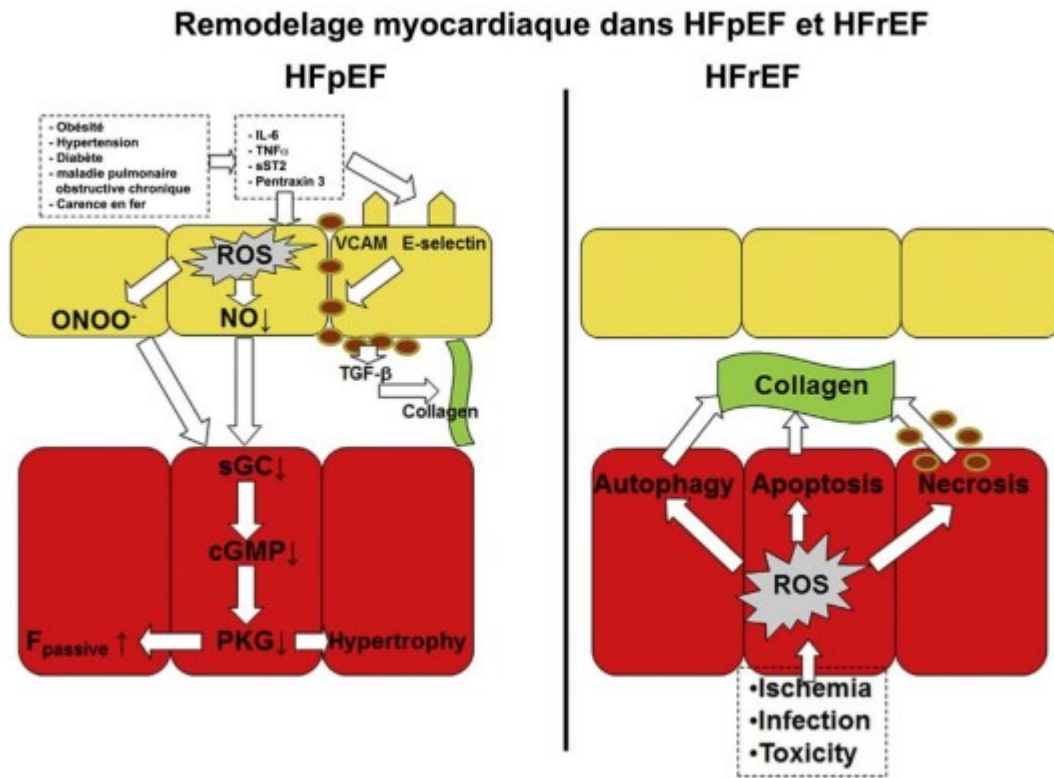


Figure 5. – Dysfonction et remodelage myocardique dans IC-FER et IC-FEP.

Adapté de [4].

Dans l'IC-FER, le remodelage du ventricule gauche est causé par une perte progressive des cardiomyocytes. Cette mort cellulaire résulte de l'autophagie, l'apoptose ou la nécrose, stimulées par le stress oxydatif présent dans le cardiomyocyte [4]. En raison de la perte des cardiomyocytes, des modifications au sein de la matrice extracellulaire contribuent d'une manière importante à la dilatation du ventricule gauche et ainsi à son remodelage excentrique.

Outre les neurohormones, l'IC se caractérise par une augmentation importante des marqueurs pro-inflammatoires [132-136]. L'augmentation de l'IL-8 et l'IL-18 facilitent la production d'autres cytokines cardiotoxiques telles que l'IL-6 et la CRP [132, 137]. Ces cytokines pro-inflammatoires

activent également l'endothélium et l'expression des molécules d'adhésion vasculaire et sélectines nécessaires pour recruter des cellules inflammatoires dans la paroi vasculaire. Une augmentation des taux circulants d'IL-1, IL-6, TNF- α et CRP, ainsi que des molécules d'adhésion solubles telles que sICAM-1 et sVCAM-1 ont été rapportées dans l'IC [132, 138-140]. Certains de ces marqueurs semblent corrélés avec la classe fonctionnelle NYHA ainsi que le pronostic chez les patients atteints d'IC-FER [135, 138, 141-143]. Des études récentes ont rapporté la présence de VCAM-1 et E-sélectine dans des biopsies endo-myocardiques récoltées chez des patients atteints de l'IC-FEP [144]. L'expression de ces molécules d'adhésion endothéliales conduit à l'activation et à la migration sous-endocardique des leucocytes circulants [144]. Les cytokines pro-inflammatoires sont connues pour provoquer une faible biodisponibilité du NO, mais contribuent également à une augmentation du peroxy-nitrite, ce qui conduit à une dysfonction endothéliale [145]. Au-delà de l'activation neurohumorale et de l'augmentation de l'inflammation, les patients atteints d'IC-FEP présentent également une augmentation significative des biomarqueurs liés au renouvellement de la matrice extracellulaire et à la fibrose [5]. Ceux-ci incluent la galectine-3, les propeptides du collagène, les métalloprotéinases (MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9), l'inhibiteur tissulaire de MMP (TIMP-1 et 4) et l'ostéopontine [5, 146-149]. Les mécanismes impliqués dans l'augmentation de ces marqueurs circulants demeurent largement inconnus.

L'augmentation du taux plasmatique de l'acide thiobarbiturique (TBARS), de l'acide urique et de la 8-isoprostaglandine F₂- α indique une augmentation du stress oxydatif chez les patients IC [150]. En fait, ces marqueurs du stress oxydatif peuvent être en corrélation avec la classe fonctionnelle de l'IC et refléter à la fois la production systémique et locale des radicaux libres [151]. L'augmentation du stress oxydatif pourrait ainsi contribuer au dysfonctionnement endothélial, à l'apoptose et nécrose des myocytes, à la prolifération des fibroblastes, au dépôt de protéines de la matrice extracellulaire, au remodelage cardiaque, à l'altération de la réserve contractile cardiaque et par conséquent à la détérioration progressive du cœur défaillant [4].

L'IC-FER et FEP sont caractérisés par un état pro-inflammatoire, une activation neuro-humorale [4, 5, 147, 148, 152-154], une inflammation systémique ainsi qu'une augmentation du stress oxydatif. Ces anomalies vasculaires conduisent à une dysfonction endothéliale. En effet, les systèmes vasoconstricteurs artériels tels que le système sympathique, le système rénine-

angiotensine-aldostérone (SRAA), l'arginine vasopressine (AVP) et l'endothéline sont activés et sont associés à la gravité de la maladie [141-143, 155]. De même, les hormones vasodilatatrices antagonistes telles que les prostaglandines, et le peptide natriurétique (BNP) augmentent pour contrer l'augmentation des marqueurs vasoconstricteurs [155]. Le BNP est probablement le biomarqueur le mieux caractérisé en IC-FEP. Chez ces patients, le BNP est plus élevé comparé aux volontaires sains, mais significativement plus faible par rapport aux patients avec IC-FER [146, 147]. Initialement le BNP a été reconnue comme variable pronostique dans l'IC systolique comme c'est démontré par Tsutamoto et al. dans une étude ayant inclus 85 patients avec IC-FER [156]. Cependant, le BNP est corrélé à la pression de remplissage du ventricule gauche et donc au stress de la paroi en diastole dans l'IC-FEP [157]. Toutefois, un BNP normal n'élimine pas la présence d'une IC-FEP car plusieurs patients présentent des symptômes à l'effort seulement, et donc une élévation des pressions de remplissage intermittente [157]. La fibrillation auriculaire, la tachycardie et l'insuffisance rénale sont des facteurs qui influencent directement le niveau du BNP [157]. En outre, il est intéressant de noter que l'obésité est associée à des niveaux chroniquement plus bas de BNP. Il faut donc favoriser une combinaison des niveaux de BNP avec d'autres mesures de dysfonction diastolique.

3.6. Biomarqueurs reliés au remodelage et à l'inflammation en IC

3.6.1 Biomarqueurs de la nécrose des myocytes

La lésion des myocytes cardiaques est le résultat d'une ischémie sévère ainsi que du stress aigu et chronique infligé au myocarde [155]. Les protéines troponine T et I sont, depuis des décennies, considérées comme d'importants biomarqueurs de l'agression des myocytes (Figure 5) [155, 158]. Cependant, la troponine n'est pas spécifique à l'infarctus du myocarde. En effet, une légère élévation de la concentration de la troponine I a été observée chez les patients IC sans ischémie [159]. L'élévation de la troponine est vraisemblablement causée par une tension murale excessive et une souffrance des cardio-myofibroblastes au niveau sous-endocardique. Xue et al. ont rapporté que les patients avec un haut niveau de troponine I étaient plus à risque de mortalité et d'IC [160, 161]. De plus, plusieurs études ont démontré que l'analyse de la troponine chez les

patients IC stables était utile pour la prévention de futurs événements cardiovasculaires [161, 162].

Par ailleurs, d'autres marqueurs de la lésion du myocarde ont été répertoriés telles que la protéine de liaison aux acides gras cardiaques (*heart-type fatty acid binding protein* (FABP)) et la chaîne légère de type 1 de la myosine (*myosin light chain-1*) [163]. Leur rôle dans l'insuffisance cardiaque est relativement nouveau. L'analyse de la FABP a tout d'abord été principalement faite chez les enfants et les adolescents atteints d'IC [164]. Cependant, certaines études ont démontré le potentiel de l'analyse de la FABP, indépendamment de l'âge des patients, lorsqu'elle est combinée au BNP [164].

3.6.2 Biomarqueurs du remodelage de la matrice extracellulaire

Plusieurs études se sont concentrées sur les biomarqueurs du remodelage de la matrice extracellulaire. La matrice extracellulaire est nécessaire pour la détermination de la taille et la structure des myocytes [155]. Normalement, il y a un certain équilibre entre les métalloprotéinases, qui dégradent le collagène fibrillaire, et les inhibiteurs des métalloprotéinases afin de fabriquer la matrice extracellulaire [155]. Or, tout déséquilibre qui favoriserait les métalloprotéinases serait associé avec la dilatation ventriculaire et le remodelage.

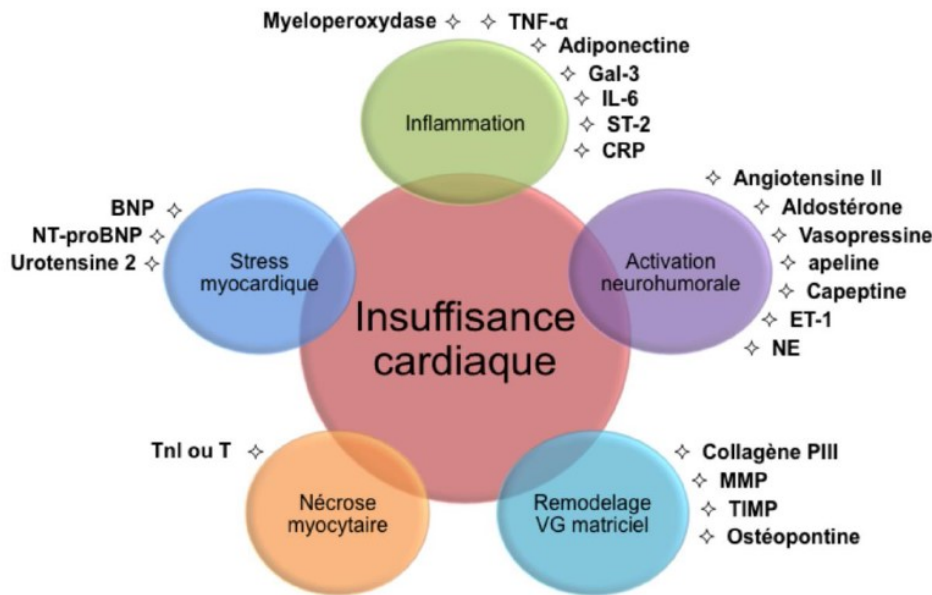


Figure 6. – Les biomarqueurs de l'IC

De même, une augmentation de la production du collagène peut avoir un effet nocif puisqu'une augmentation de la fibrose peut affecter le fonctionnement des ventricules [21]. De récentes études ont associé la présence d'une forte concentration de procollagène chez des patients atteints d'hypertension ou d'IC. Cependant, l'analyse de ces biomarqueurs potentiels représente un défi à cause du polymorphisme des métalloprotéinases et du procollagène. En effet, plus de 15 métalloprotéinases peuvent être caractérisées comme biomarqueurs [21]. Il faudra des études plus étoffées pour cerner les métalloprotéinases les plus spécifiques chez les patients IC.

3.6.3 Autres biomarqueurs d'inflammation d'intérêt

L'inflammation joue un important rôle dans la pathophysiologie de l'IC quel que soit son étiologie. À la suite de l'infarctus du myocarde, la nécrose myocardique induit une réponse inflammatoire afin d'éliminer la matrice extracellulaire et les débris cellulaires. Parallèlement, il y a l'initiation du remodelage pour remplacer la lésion du myocarde par une cicatrice. Ainsi, la qualité de la réparation à la suite d'un infarctus et le niveau du remodelage dépend de la régulation de la réponse immunitaire à l'aide des réactions pro- et anti-inflammatoires. Cette régulation est le

résultat de l'implication des éléments de la réponse immunitaire innée. Par conséquent, certains éléments de la réponse immunitaire peuvent être utilisés comme biomarqueurs.

3.6.3.1 La C-reactive protein (CRP)

La *C-reactive protein* (CRP) a été longtemps utilisée comme marqueur des maladies cardiovasculaires [165-167]. Cette protéine est générée par le foie à la suite d'une stimulation par certaines cytokines pro-inflammatoires [168, 169]. Des études ont démontré une corrélation entre l'augmentation du niveau de CRP et le développement de l'IC chez les patients atteints d'infarctus du myocarde [170, 171]. Par ailleurs, un niveau élevé de *high-sensitivity* CRP (hsCRP) a été indépendamment associé à un remodelage provoquant la dilatation [171]. Toutefois, la relation causale entre le hsCRP et le remodeling n'est pas confirmée. Chez des patients hospitalisés pour décompensations cardiaques (quelle que soit la cause), les taux plus élevés de CRP sont associés à la sévérité de l'IC et à une augmentation du risque de réhospitalisation au cours du suivi [172]. En activant le système du complément, la CRP active la phagocytose des leucocytes et participe ainsi à l'élimination des produits de dégradation des lésions tissulaires [173]. D'une autre côté, en stimulant l'expression de molécules d'adhésion, de la monocyte-chemotactic protein 1 (MCP-1), de l'IL-8, du plasminogen-activator inhibitor 1 (PAI-1), la CRP joue un rôle direct dans l'évolution de l'athérosclérose et en particulier dans la déstabilisation des plaques [173].

Outre le CRP, la myéloperoxydase (MPO) peut être un biomarqueur puisque cette enzyme est fortement exprimée dans les plaques vulnérables [21, 155]. De plus, la présence de cette enzyme est une caractéristique d'instabilité de la lésion coronarienne [155]. Par ailleurs, un haut niveau de MPO dans le sérum pourrait être un présage d'un risque de maladies cardiovasculaires chez les sujets sains [21, 155].

3.6.3.2 Les cytokines

3.6.3.2.1 L'IL-6 et l'IL-8

Plusieurs cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle d'importance en IC. Parmi celle-ci l'IL-6 et l'IL-8 semblent jouer un rôle pivot dans la pathophysiologie de l'IC. L'IL-6 est synthétisée sous la

forme d'un peptide précurseur de 212 a.a, qui est ensuite clivé pour former la protéine mature de 185 a.a [174]. L'IL-6 peut être produite par un certain nombre de cellules, y compris les cellules inflammatoires, mais également par les cardiomyocytes et les fibroblastes [174]. Des études ont démontré des concentrations élevées d'IL-6 dans le sérum des patients souffrant d'IC. Par ailleurs, l'IL-6 peut produire une hypertrophie des myocytes, un dysfonctionnement du myocarde et peut bloquer l'apoptose des myocytes cardiaques [175]. Plusieurs études cliniques ont démontré une forte association entre le niveau d'IL-6 dans le sérum et la sévérité de la maladie [171]. De plus, le niveau sanguin d'IL-6 pourrait également prédire le risque de mortalité des patients IC. En outre, certains ont proposé qu'IL-6 soit un facteur de prédiction du pronostic plus robuste que la CRP [175] [174, 176].

L'IL-8 est reconnue comme une protéine d'activation des neutrophiles sur la base de deux effets *in vitro*, le chimiotactisme et la libération d'enzymes granulaires [177]. C'est pourquoi elle a été comparée de manière approfondie avec des agonistes chimiotactiques bien établis, tels que le C5a, le formyl-Met-Leu-Phe, le facteur d'activation plaquettaire (PAF) et le leucotriène B4 (LTB4) [177]. Ces stimuli induisent trois réponses principales chez les neutrophiles : leur changement de forme et migration directionnelle, l'exocytose des protéines de stockage et le processus du stress oxydatif [177-179].

3.6.3.2.2 L'IL-1 et l'IL-1RA

La famille de l'IL-1 est constituée de deux ligands (IL-1 α et IL-1 β) présentant des activités biologiques indiscernables par l'intermédiaire du récepteur de type I de l'IL-1 (IL-1RI) [180-183]. L'IL-1 α et l'IL-1 β sont tous deux synthétisés sous forme de protéines précurseurs. Le PRO-IL-1 α est biologiquement actif et est clivé par la calpaïne pour générer la protéine mature. Au contraire, la pro-IL-1 β est biologiquement inactive jusqu'à ce qu'elle soit clivée enzymatiquement par l'enzyme de conversion de l'IL-1 β pour générer la protéine active de 17,5 kDa [184].

Plusieurs études ont démontré le rôle de l'IL-1 dans l'athérosclérose [185, 186]. En effet, l'IL-1 favorise la formation de lésions athéromateuses, renforce l'inflammation vasculaire et déclenche la déstabilisation de la plaque. En plus, la signalisation de l'IL-1 peut également être un médiateur essentiel dans la pathogenèse de l'IC en supprimant la contractilité cardiaque, en favorisant

l'hypertrophie du myocarde et en induisant l'apoptose des cardiomyocytes [74, 75]. Par ailleurs, l'IL-1 est une des cytokines les plus puissantes et elle est présente dans le myocarde de patients atteints de cardiomyopathie idiopathique dilatée [76]. En plus, des études ont montré l'implication de l'IL-1 dans l'apoptose myocardique, l'hypertrophie et l'arythmie. L'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1RA) se lie préférentiellement aux récepteurs de type I, membranaires ou solubles. Un effet protecteur vasculaire de l'IL-1RA a été rapporté. En effet, des études *in vivo* ont montré que le traitement à l'aide d'IL-1RA recombinant empêche la formation de stries lipidiques chez les souris apoE^{-/-} [187]. De plus, les souris déficientes pour l'IL-1RA développent une inflammation chronique létale au niveau de la paroi artérielle, associée à une infiltration accrue de neutrophiles, macrophages induisant ainsi une augmentation du développement des plaques d'athérosclérose [188, 189].

3.6.3.2.3 L'IL-10

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire puissante. Ces effets anti-inflammatoires sont dus à sa capacité d'inhiber les interactions entre les leucocytes et les cellules endothéliales (CE), ainsi que l'inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages ou les lymphocytes [190]. Le rôle de l'IL-10 dans le développement de l'athérosclérose a été démontré par l'utilisation de modèles murins d'athérosclérose [191-193]. En effet, la déficience en IL-10 chez la souris apoE^{-/-} et chez la souris LDLr^{-/-} montre une athérogénèse accrue, caractérisée par l'infiltration de cellules inflammatoires activées, en particulier des lymphocytes T activées [191-193]. De même, les taux circulants de thrombospondine-1, une autre cytokine anti-inflammatoire libérée lors de l'activation des plaquettes, ou de TGF- β , sont également diminués [194] suggérant un rôle protecteur de ces médiateurs anti-inflammatoires.

Une autre cytokine anti-inflammatoire étudiée par l'équipe de Hofmann [195] est l'IL-13. Cette équipe a analysé des cytokines, des chimiokines et l'expression des protéines telle que celle des facteurs de croissance dans la zone d'infarctus des souris contrôles et des souris IL-13 Knock-Out. Ils ont remarqué plus particulièrement, que les VCAM-1 étaient deux fois plus élevés chez les souris contrôles, que chez les IL-13 KO. Plusieurs molécules de surface d'adhésion, des chimiokines et des cellules étaient plus faiblement exprimées chez les souris IL-13 KO que chez

les groupes contrôles. Ce qui indique que l'IL-13 pourrait réguler le recrutement et l'expression des leucocytes.

En somme, il existe de nombreuses évidences démontrant le rôle des cytokines dans l'inflammation sub-clinique qui caractérise l'IC. Par ailleurs, les neutrophiles sont des acteurs de premier plan dans la production de cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-6 et le TNF- α , ainsi que du MPO. En effet, les neutrophiles représentent 75 % des leucocytes totaux en circulation. Le rôle des neutrophiles dans la régulation des maladies cardiovasculaires nécessite des études approfondies pour comprendre leur rôle précis ainsi que le développement ultérieur de nouvelles modalités thérapeutique contre les effets nocifs de l'inflammation chez les patients à haut risque. Le rôle des neutrophiles sera présent en détail un peu plus loin dans cette thèse.

4. Traitement de l'IC

La prise en charge thérapeutique de l'IC demande une approche non pharmacologique ainsi qu'un traitement de type polythérapie. L'approche non pharmacologique consiste en une intervention de type nutritionnelle et de kinésiologie. Les objectifs thérapeutiques sont : traiter le mécanisme causal, arrêter ou freiner le processus menant à l'IC, améliorer les symptômes, la qualité de vie des patients et le pronostic.

4.1 Traitement pharmacologique des patients IC-FER : la quadruple thérapie

Le traitement actuel pour les patients atteints de l'IC-FER était jusqu'à tout récemment basé sur la triple thérapie. Cette thérapie comprend la combinaison de : IECA (Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II) (ou ARA (Antagonistes des récepteurs AT1 de l'angiotensine II) si intolérant à IECA), ou ARNI (inhibiteur de l'angiotensine et de la néprilysine), β -bloquant, ARM (antagoniste des minéralocorticoïdes). Plus récemment, la société canadienne de cardiologie a réévalué le traitement pharmacologique de l'IC en y ajoutant un quatrième volet, soit l'utilisation des iSGLT2 (inhibiteur du cotransporteur sodium-glucose de type 2).

4.1.1 Inhibition du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA)

4.1.1.1 Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (IECA)

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) est une exopeptidase qui permet la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II [196]. Cette enzyme joue aussi un rôle dans l'inactivation de la bradykinine (un puissant vasodilatateur), ce qui explique pourquoi elle porte également le nom de Kininase II [197]. L'ECA constitue une cible idéale pour le traitement de l'IC. Ainsi, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion ou IECA bloquent la transformation de l'angiotensine I en angiotensine II [198] qui est un vasoconstricteur puissant [196, 197, 199, 200]. Les IECA réduisent la postcharge, augmentent le débit cardiaque et le volume d'éjection systolique et réduisent la précharge et la résistance vasculaire pulmonaire [46-48, 196, 201-207]. De plus, les IECA ont des effets favorables au niveau du remodelage cardiaque en réduisant les volumes ventriculaires et en entraînant un retour à la géométrie optimale -ovale tronquée [48, 196, 208-211].

Par ailleurs, plusieurs études cliniques ont permis de démontrer l'efficacité des IECA, et en particulier l'énalapril, dans le traitement de l'IC. Ces études sont: SAVE (*Survival and ventricular enlargement*), SOLVD (*[Studies of left ventricular dysfunction] Prevention* [212] et Treatment [213]), CONSENSUS (*Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study*)[214] et V-HeFT (*Vasodilator-Heart Failure Trial*) II [215]. Selon ces études, l'énalapril permet la diminution du risque d'hospitalisation tout en améliorant la survie ainsi que le développement de l'IC chez les patients asymptomatiques. Une étude (TRACE, *trandolapril cardiac evaluation study*) randomisée en double aveugle sur des patients avec une FEVG $\leq 35\%$ a montré une amélioration significative de la mortalité globale dans le groupe IEC.

Outre leurs effets sur la mortalité, les IECA permettent également une meilleure qualité de vie, une augmentation de la tolérance à l'exercice ainsi que l'amélioration de la classe fonctionnelle NYHA [214, 216] .

4.1.1.2 Antagonistes des récepteurs AT1 de l'angiotensine II (ARA)

Les ARA sont des inhibiteurs qui compétitionnent avec l'angiotensine II pour le récepteur AT1 [57]. Par ailleurs, ces antagonistes exercent leurs effets en ciblant la voie de signalisation

angiotensine II / récepteur AT1 puisque les ARA ont 10,000 fois plus d'affinité avec le récepteur AT1 que le récepteur AT2 [57].

Plusieurs études ont démontré l'efficacité des ARA en IC. Par exemple, l'étude ELITE (*Evaluation of Losartan in the Elderly Study*) [217] vise à comparer l'impact du losartan à celui du captopril. Selon cette étude, le losartan a réduit de façon significative la mortalité chez des patients IC par rapport au captopril [217]. Toutefois cet avantage n'a pas été confirmé dans l'étude ELITE 2. L'étude CHARM (*Candesartan in Heart Failure-Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity*) [218] a démontré une réduction du risque de mortalité cardiovasculaire et d'hospitalisation pour IC avec le candesartan par rapport au placebo chez des patients intolérants aux IECA. Cette étude a confirmé donc les bénéfices des ARA en IC. L'étude Val-HeFT (*Valsartan Heart Failure Trial*) [219, 220] a confirmé également les bénéfices des ARA en IC. Globalement, ces études démontraient l'efficacité du valsartan et du candesartan en IC.

La combinaison d'un IECA avec un ARA n'est plus recommandée dans le contexte de la venue des ARNI (voir ci-dessous). Bien que certaines preuves permettent de soutenir une réduction des résultats cliniquement significatifs avec leur combinaison, il existe également des preuves substantielles publiées après la recommandation précédente, qui décrivent les effets indésirables (par exemple, hypotension, hyperkaliémie et dysfonctionnement rénal). Les traitements actuels utilisant les ARA et/ou le sacubitril/valsartan reposent sur une base de preuves plus solide couvrant l'ensemble des résultats (par exemple, la morbidité et la mortalité) et limitent donc davantage le rôle des traitements combinés IECA et ARA. L'effet des IECA/ARA dans l'IC-FEP sera discuté dans la partie suivante.

4.1.2 L'inhibiteur de l'angiotensine et de la néprilysine (ARNI)

Il s'agit d'une combinaison entre le valsartan, un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II, et un inhibiteur de la néprilysine (le sacubitril), dont l'effet permet l'augmentation de plusieurs peptides vasodilatateurs dont les peptides natriurétiques. La seule molécule disponible dans cette classe à ce moment est le sacubitril/valsartan. L'efficacité de ce traitement a été évalué par l'étude PARADIGM-HF (*Prospective Comparison of ARNi With ACEi to Determine Impact on Global Mortality and Morbidity in Heart Failure*) où l'ARNI sacubitril / valsartan a été comparé à

l'énalapril chez des patients atteints d'IC-FER [221]. Selon cette étude, l'inhibition de l'angiotensine-néprilysine a conduit à une diminution significative du risque de décès cardiovasculaire et du taux d'hospitalisation pour IC [221].

Alors que de nombreuses molécules ont prouvé leur efficacité dans IC-FER, aucune thérapie n'a réussi à réduire la morbidité, ni la mortalité des patients atteints d'IC-FEP. L'étude PARAGON-HF a étudié l'efficacité du sacubitril/valsartan chez les patients porteurs d'une IC-FEP. Cette étude a montré que l'association sacubitril/valsartan ne réduit pas le nombre d'hospitalisation et le risque de décès pour IC-FEP de façon significative. Toutefois, il existe un signal fort concernant les patients porteurs d'une IC à FEVG modérément altérée (entre 45% et 57%) dans l'étude. Plus récemment l'étude PRALLAX n'a pas démontré d'effets significatifs sur la tolérance à l'effort sous-maximale chez les patients IC-FEP. Des données additionnelles seront générées par l'étude PARAGLIDE qui évaluera l'impact clinique du sacubitril/valsartan chez les patients hospitalisés avec IC et FEVG > 40%.

Ces résultats divergents de l'effet du sacubitril-valsartan chez les patients avec ces deux phénotypes différents confirment les différences pathophysiologiques significatives dans l'IC-FER versus l'IC-FEP.

4.1.3 Bêta-bloqueurs

Les β -bloqueurs (BB) ont comme rôle principal le blocage des récepteurs β -adrénergiques cardiaques. Ces agents entraînent la diminution de la fréquence cardiaque, une baisse de la vitesse de conduction des cellules cardiaques ainsi qu'une réduction de l'excitabilité et de la contractilité cardiaque. Les BB diminuent le « drive » adrénérique cardiaque et ainsi permettent une cardio-réparation. En raison des nombreux bénéfices au niveau cardiaque, les BB sont les agents pharmacologiques les plus puissants pour augmenter la fraction d'éjection chez les patients avec IC-FER. Toutes les études évaluant le potentiel des β -bloqueurs, ont démontré une réduction du taux de mortalité et d'hospitalisation chez les patients IC-FER [222-225]. Effectivement, l'application d'un traitement au bisoprolol a permis de réduire la mortalité totale de 34% [226]. Plus spécifiquement, le traitement au bisoprolol a permis de diminuer de 41% la mort soudaine et de 49% la mort à la suite de l'aggravation de l'IC [226]. Similairement, des études

ont déterminé que le traitement au carvedilol diminuerait de 35% la mortalité totale par rapport à un traitement avec un placebo [227, 228]. Des données similaires ont été démontrées avec le metoprolol succinate dans l'étude MERIT-HF.

Les BB n'ont pas d'effets démontrés sur la morbidité et la mortalité des patients avec IC-FEP. Toutefois, en raison de leur effet bradycardisant, ils ralentissent la FC et facilite le remplissage. Ils agissent aussi comme agent anti-angineux.

4.1.4 Antagonistes des minéralocorticoïdes et autres diurétiques

Durant l'IC, le débit cardiaque est efficacement préservé à la suite de la rétention d'eau et de sodium causant ainsi une augmentation de pré-charge. Toutefois, cette rétention peut être nocive puisqu'elle conduit à une congestion systémique et pulmonaire ainsi qu'un œdème périphérique. Ainsi, l'utilisation de diurétiques devient nécessaire lors de l'observation d'une rétention d'eau chez les patients IC afin de réduire l'œdème et la congestion. La principale action des diurétiques est l'élimination de l'eau et des ions (K⁺, Cl⁻, H⁺, Na⁺). Cependant, le potassium (K⁺) est important pour la repolarisation de la membrane cellulaire du point de vue cardiaque.

Les diurétiques les plus puissants sont les diurétiques de l'anse. Toutefois les antagonistes des minéralocorticoïdes agissent comme diurétiques faibles mais agissent principalement comme agent anti-remodeling en contrant les effets nocifs de l'aldostérone. Par conséquent, le traitement par diurétiques de l'anse doit être utilisé en combinaison avec un diurétique anti-aldostérone, tel que la spironolactone et l'eplerénone [229]. Ces diurétiques anti-aldostérone agissent sur les canaux collecteurs et le tube contourné distal. L'importance des antialdostérone dans l'IC s'explique par leurs multiples actions : l'effet diurétique, de la préservation du capital potassique et effet anti-remodeling au niveau du myocarde défaillant. L'utilisation de ces agents a permis d'améliorer la survie et de diminuer l'hospitalisation chez les patients IC chroniques ou après un infarctus [229-232]. En effet, l'étude RALES (*Randomized Aldactone Evaluation Study*) a évalué l'effet de la spironolactone sur la morbi-mortalité dans l'IC systolique [231]. Les patients recevaient soit un placebo soit de la spironolactone. Après suivi de 24 mois, la mortalité toutes causes était diminuée de 30 % chez les patients prenant de la spironolactone. Cette étude a

démontré que le blocage des récepteurs de l'aldostérone par la spironolactone, diminue de façon notable le risque de mortalité et de morbidité des patients en IC systolique sévère.

Deux études ont évalué l'éplérenone dans l'IC soit l'étude EPHESUS (*Eplerenone Post-AMI Heart Failure Efficacy and Survival Study*) [229] et l'étude EMPHASIS-HF (*Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And Survival Study In Heart Failure*) [232]. Dans les 2 études une diminution significative de la morbi-mortalité et de la mortalité globale ont été rapportées. Les effets des antagonistes des minéralocorticoïdes dépassent donc largement celui d'un simple diurétique.

4.2 Considérations pharmacologiques dans l'IC-FEP

Jusqu'à ce jour les études sur le traitement de l'IC-FEP n'ont pas démontrés de bénéfices sur la mortalité. Aussi, le traitement sera principalement axé sur les mécanismes pathophysiologies en cause dans cette condition, et inclura trois axes d'intérêt: le traitement symptomatique, la rétention liquidienne, ainsi que le traitement des conditions pathologiques associées, ie arythmies, tachycardie, angine, hypertension et diabète.

Le traitement spécifique vise à ralentir la fréquence cardiaque, en restaurant le rythme sinusal si nécessaire, par l'adjonction de bêtabloquant ou d'inhibiteur calcique, et de l'addition de diurétiques et/ou nitrates afin de diminuer la précharge.

4.2.1 IECA dans IC-FEP

Une réduction du nombre d'hospitalisations liées à l'IC a été démontrée avec IECA. En effet, l'administration du Perindopril à des patients d'IC-FEP âgés de 70 ans ou plus a montré des améliorations dans les symptômes et la capacité d'exercice et une diminution du nombre d'hospitalisations au cours de la première année de suivi [233]. Il n'y a eu aucun impact significatif sur la survie. De façon similaire, aucune différence significative n'a été observée avec le ramipril ou le quinapril [234].

4.2.2 Antagonistes des récepteurs AT1 de l'Ang II

Selon l'étude, « *Candesartan in Heart failure : Assessment of Reduction in Mortality and morbidity* » (CHARM)-Preserved trial, le Candesartan chez des patients d'IC-FEP et classes II-V ne montre

pas une amélioration nette par rapport au groupe placebo [235]. Toutefois, cette étude a démontré un impact sur les hospitalisations pour défaillance cardiaque.

Dans une autre étude nommée « *The Irbesartan in Heart Failure with Preserved Systolic Function (IPRESERVE)* », tous les paramètres cardiovasculaires ainsi que l'hospitalisation n'ont pas été différents entre les groupes [236].

4.2.3 β -bloquants

Bien que les β -bloquants fournissent un mécanisme d'action physiologique plausible pour améliorer les résultats en prolongeant le temps de remplissage diastolique, en réduisant la fréquence cardiaque et en améliorant le remplissage ventriculaire, atténue l'ischémie myocardique et l'hypertension ainsi qu'en jouant le rôle d'agent anti-arythmique, les études ne permettent pas, à l'heure actuelle, de recommander fermement l'utilisation routinière de cette classe de médicaments dans IC-FEP [237-240]. A titre d'exemple, l'étude *Study of the Effects of Nebivolol Intervention on Outcomes and Rehospitalization in Seniors With Heart Failure (SENIORS)* [241] a montré une réduction de 19% du critère principal combiné de mortalité toutes causes confondues et d'hospitalisation cardiovasculaire. Cependant, en raison de la faible taille de l'effet du nébivolol dans le principal essai SENIORS, cette analyse manque de pouvoir pour exclure définitivement une interaction significative entre les résultats d'intérêt et le facteur EF. Aucun autre agent bêtabloqueur n'a été investigué de façon spécifique dans IC-FEP.

4.2.4 Dérivés nitrés

Les nitrates ont été largement utilisés chez les patients présentant une maladie cardiovasculaire MCV établie, cependant, le rôle des nitrates chez les patients atteints d'IC-FEP ne s'est pas avéré concluant. L'étude *The Nitrate's Effect on Activity Tolerance in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction (NEATHFpEF)* [242] a inclus 110 patients dans un essai à l'action prolongée du nitrate (mononitrate d'isosorbide 120 mg / j) ou d'un placebo dans le but de tester l'efficacité et la sécurité de ce médicament. Selon cette étude, les nitrates n'ont pas eu d'effet bénéfique sur les biomarqueurs, la tolérance à l'exercice, le niveau d'activité ou les événements cliniques.

4.3. IC, diabète et utilisation des iSGLT2

Les patients diabétiques ont un risque élevé de développer une IC [243]. En effet, le diabète de type 2 (T2DM) est associé à des facteurs de risque cardiovasculaires tels que l'HTA, la dyslipidémie, le tabagisme ainsi que l'obésité [244]. L'ensemble de ces facteurs confère un risque élevé de développer de l'athérosclérose, la cardiopathie ischémique, la dysfonction ventriculaire gauche, et évidemment une IC. D'autre part, la cardiomyopathie diabétique est une entité bien définie facilitée par l'hypertrophie ventriculaire, une dysfonction systolique, et/ou une diastolique, amenant alors une IC clinique [245]. L'hyperglycémie et la résistance à l'insuline induisent un état pro-inflammatoire, réduisent la biodisponibilité en NO, diminuent l'activité de la protéine kinase G, et augmentent les produits de glycation avancé (*advanced glycation and products-AGEs*) [245]. Ceci va induire une hypertrophie ventriculaire. Ces événements ainsi que l'augmentation du dépôt de collagène augmentent la vulnérabilité du cœur diabétique à développer l'IC.

L'optimisation du contrôle glycémique est une stratégie efficace pour réduire les complications microvasculaires chez les patients IC avec T2DM. La metformine constitue le traitement de première intention chez les T2DM [246]. D'autre part, de nombreuses études ont démontré les effets des inhibiteurs du co-transporteur du sodium-glucose (iSGLT2) comme l'empagliflozin sur la morbidité et la mortalité des patients IC-FER. L'étude *EMPEROR-Reduced trial (Empagliflozin Outcome Trial in patients with chronic Heart Failure with reduced ejection fraction)* a étudié l'efficacité de l'empagliflozin chez des patients IC-FER [247]. Cette étude a montré une réduction significative de la mort cardiovasculaire et d'hospitalisation pour l'IC chez les patients traités avec l'empagliflozin par rapport au groupe placebo [247]. De même, l'étude *DAPA-HF trial (Dapagliflozin and Prevention of Adverse Outcomes in Heart Failure)* a étudié l'efficacité du dagagliflozin chez des patients IC-FER [248]. Selon cette étude, ce traitement a conduit à une diminution significative du risque de décès cardiovasculaire et du taux d'hospitalisations pour IC.

Les iSGLT2 ont fait la preuve dans plusieurs études de leur bénéfice cardiovasculaire en réduisant de façon très significative, le risque et l'hospitalisation pour IC. Ainsi, il est observé dans l'étude *EMPA-REG OUTCOME* une réduction de 35% des hospitalisations pour IC sous empagliflozine [249]. De même, dans l'étude *CANVAS*, la réduction d'hospitalisation pour IC sous canagliflozine

était de 35% [250]. La compréhension des mécanismes d'action des iSGLT2 favorisant l'amélioration de la fonction myocardique serait un atout dans la prévention de cette maladie. Or, trois différents mécanismes sont élaborés. On peut noter les mécanismes réduisant la précharge et la post-charge ventriculaire principalement via un effet diurétique et une vasodilatation artérielle [251, 252]; les mécanismes énergétiques visant à l'augmentation de la concentration plasmatique des corps cétoniques qui sont utilisés comme substrats énergétiques par les cardiomyocytes [253], et finalement les mécanismes qui ont une action direct sur le cœur. En effet, les iSGLT2 ont des effets directs sur le cœur via l'inhibition de l'échangeur Na⁺/H⁺ [254], l'augmentation du taux plasmatique du glucagon [255]; et la réduction de la fibrose cardiaque [256]. L'activation du récepteur du glucagon présent sur les cardiomyocytes favorise la contractilité myocardique via une augmentation de l'AMPC et par voie de conséquence du courant calcique [257]. De plus, le glucagon favorise la captation du glucose par les cellules myocardiques et possède un effet anti-arythmique [258]. Ces effets du glucagon pourraient expliquer la réduction de l'IC et des morts subites.

5. Défibrillateur implantable

Le rôle du défibrillateur implantable de même que la resynchronisation ont été largement étudiés dans l'IC. Cette section constitue un bref survol de leurs impacts en IC. Dans l'IC la mort subite est fréquente représentant encore 40% des décès. Le défibrillateur implantable (DAI) a montré son efficacité dans la prévention de la mort subite dans l'IC [3]. Plusieurs études ont montré l'importance du DAI [3, 259, 260]. L'étude AVID (*Antiarrhythmics Versus Implantable Defibrillators*) a démontré les bénéfices relatifs d'un DAI comparé au traitement antiarythmiques [261]. Un groupe de patients recevait un DAI et un deuxième groupe, un traitement médical par antiarythmique de classe III (amiodarone), avec un sous-groupe traité par sotalol [261].

Dans le suivi de trois ans, 43% des patients avec DAI ont reçu un traitement médical en plus, et 24% des patients du groupe médical ont bénéficié d'un DAI [261]. Les résultats sur la survie sont significativement plus élevés dans le groupe DAI (75.5% vs 64%) avec une réduction de mortalité

globale de 31%, indépendamment de l'âge, de la FEVG, de l'étiologie de départ et des troubles rythmiques d'inclusion [261].

L'étude MADIT II (Multicenter Automatic Defibrillator Implantation Trial II) qui a compris 1232 patients avec FEVG $\leq 30\%$ a démontré une réduction significative de 31% de mortalité [262]. Pareillement, l'étude SCD Heft (Sudden Cardiac Death in Heart Failure Trial) a compris 2521 patients en IC dont 70% en classe II de la NYHA et 30% en classe III. Le suivi moyen a été de 46 mois [263]. La diminution significative de la mortalité était de 23%. Cette même étude a en plus démontré que seuls les patients ayant une FEVG $\leq 30\%$ et en stade II de la NYHA ont un bénéfice du DAI sur la survie [263].

La thérapie par resynchronisation cardiaque (ou CRT) est un traitement qui consiste à rétablir la coordination de la contraction myocardique au moyen de sondes de stimulateur implantées au niveau des cavités cardiaques droites et du ventricule gauche, et reliées à un boîtier de pacemaker ou de défibrillateur implantable. De multiples études ont montré que la CRT permet d'améliorer la symptomatologie des patients (qualité de vie, NYHA) ainsi que les paramètres comme VO₂ max, hospitalisation et décès, test de marche de 6 minutes. Les études MIRACLE (*Multicenter insync randomized clinical evaluation*) et CARE-HF (*cardiac resynchronisation in heart failure*) ont montré une diminution de 50% du taux d'hospitalisations pour une IC par la CRT. Des données similaires ont été rapportées dans l'étude COMPANION.

6. Le neutrophile humain

Les neutrophiles sont des granulocytes polymorphonucléaires (PMN) caractérisés par la présence de nombreux granules cytoplasmiques [264]. Ces cellules représentent 75% des leucocytes (globules blancs) [264, 265] dans la circulation sanguine et constituent 95% des granulocytes comparativement à 4% et 1% pour les éosinophiles et les basophiles respectivement [265].

6.1 Formation

Les neutrophiles sont des cellules qui représentent la première ligne de défense de l'organisme contre l'invasion et la prolifération des bactéries ou des virus [266]. À l'instar des autres cellules lymphocytaires, les neutrophiles sont différenciés à partir des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse via la participation de certains facteurs de croissance et cytokines. Ainsi,

la cellule souche hématopoïétique se différencie et se transforme en une cellule progénitrice myéloïde, menant ainsi à la formation des monocytes, macrophages et neutrophiles [266]. Pour obtenir les cellules précurseurs des granulocytes et des macrophages, il faut la présence de GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor*), d'interleukine 3 (IL-3) ainsi que d'IL-6 [267]. Une fois la cellule génératrice obtenue, la présence de GM-CSF et de G-CSF sera nécessaire pour son développement en neutrophile [267]. Le G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) est une cytokine qui joue un rôle important dans la production, la maturation et la relâche des neutrophiles dans le sang périphérique [267]. Le G-CSF est une glycoprotéine essentielle pour la production de neutrophiles lorsqu'ils sont requis de manière rapide et en grand nombre, comme lors d'une infection [267]. Toutefois, le G-CSF ne semble pas essentiel à la production de neutrophiles en conditions physiologiques, puisque chez la souris neutropénique mutante G-CSF^{-/-}, nous retrouvons 25% de la production des neutrophiles d'une souris G-CSF^{+/+} qui arrivent à maturité et viables [267]. La production de neutrophiles dans la moelle osseuse est dépendante des taux de neutrophiles apoptotiques retrouvés dans les tissus, qui lorsque phagocytés par les macrophages et les cellules dendritiques, leur synthèse et relâche de l'IL-23 sont diminuées [268-270]. De plus, en présence de l'interféron- γ ou du GM-CSF, l'expression de nouveaux récepteurs de surface membranaire est augmentée chez les neutrophiles, tels que l'antigène du complexe majeur d'histocompatibilité-II, le CD80, le CD83 et le CD86, induisant leur différenciation en cellules dendritiques et leur permettant de faire le lien avec la réponse immunitaire adaptative via l'interaction avec les cellules T [271-273].

6.2 Fonctions

Les neutrophiles sont caractérisés par une courte durée de vie. En effet, une analyse du cycle de durée de vie des neutrophiles a démontré qu'une fois en circulation suivant leur émigration de la moelle osseuse, les neutrophiles peuvent survivre en moyenne de 7 à 12 heures. Cependant, en conditions inflammatoires, les neutrophiles peuvent survivre plus longtemps afin d'effectuer leurs activités de phagocytose, de dégranulation qui sont requises pour la défense de première ligne [274]. Ces différentes fonctions seront détaillées à la suite.

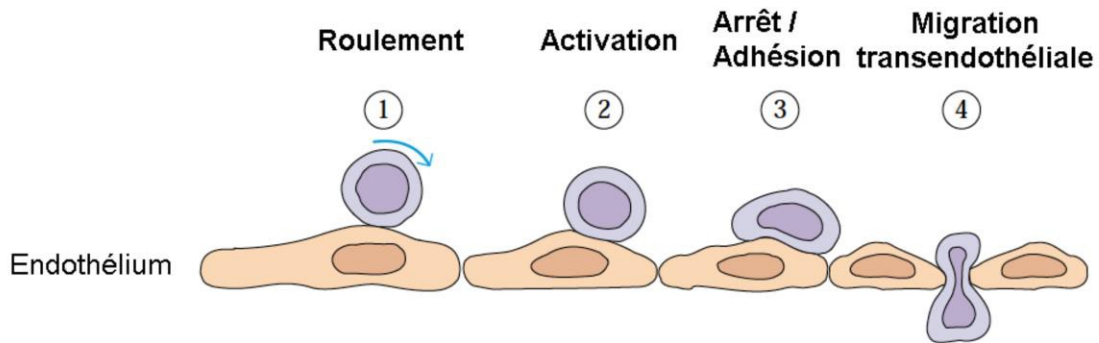
6.2.1 La migration

La migration des neutrophiles vers les sites inflammés est essentielle pour l'induction d'une réponse immunitaire [274]. Cette migration est subdivisée en quatre grandes étapes soient : l'adhésion réversible (le roulement), l'activation, l'adhésion irréversible et la diapédèse (la migration transendothéliale) (Figure 7) [274]. L'adhésion réversible est due à une faible adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales qui forment la paroi interne des vaisseaux sanguins [275]. Ainsi, la faible affinité des molécules d'adhésion, telles que les sélectines (P-sélectine et le P-sélectine ligand (PSGL-1)) présentes à la surface des neutrophiles et des cellules endothéliales, et le flux sanguin provoquent un roulement des neutrophiles sur la paroi des vaisseaux sanguins [276, 277]. En présence de molécules pro-inflammatoires telles que les lipopolysaccharides (LPS) et l'IL-8, les neutrophiles et les cellules endothéliales seront activés [278, 279]. Cette activation mènera à l'adhésion irréversible des neutrophiles à la suite de l'interaction entre les intégrines à la surface des neutrophiles (ex. : ICAM-1; *InterCellular Adhesion Molecule*) et les molécules de la superfamille des immunoglobulines (Ig) à la surface des cellules endothéliales (ex. : LFA-1; *Leucocyte Function associated Antigen*) [274]. Cette adhésion des neutrophiles permettra de procéder à la diapédèse par le biais de la chimioattraction [274].

6.2.2 La phagocytose

Les neutrophiles ont comme principale fonction l'élimination des pathogènes qui peuvent infecter l'organisme. Ainsi, les neutrophiles sont capables, tout comme les macrophages, de phagocyter tout intrus au site inflammatoire. Cette phagocytose peut se produire de deux façons. Premièrement, les neutrophiles, grâce à des récepteurs à la surface, ont la capacité de reconnaître et d'envelopper des bactéries exprimant le LPS et les polysaccharides [280]. Ensuite, ces pathogènes sont emprisonnés dans des phagosomes et ils sont détruits par des enzymes [280, 281]. Deuxièmement, les neutrophiles peuvent également phagocyter des particules opsonisées, qui sont le résultat de l'enrobage par les IgG ou les fragments du complément [280, 281].

Roulement et extravasation



Initiation de l'extravasation

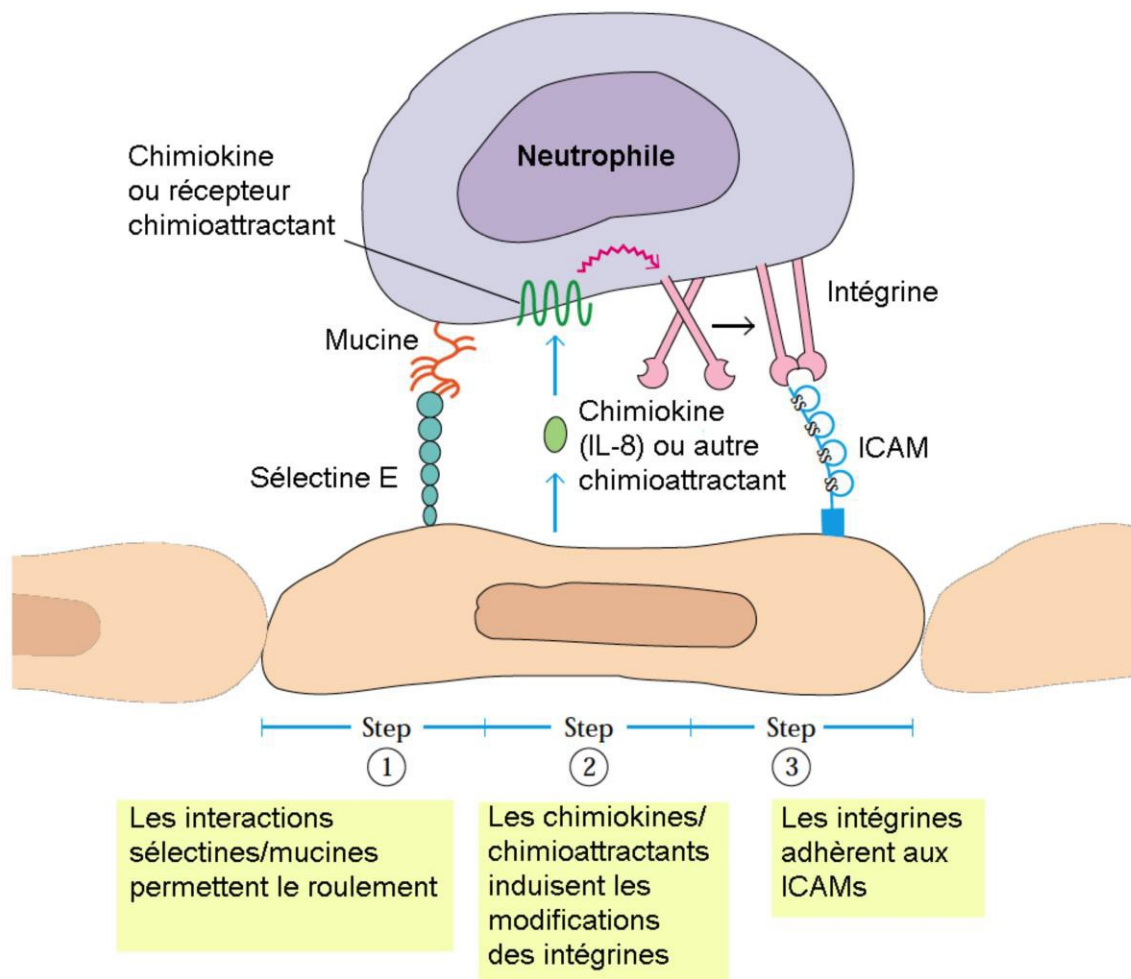


Figure 7. – Les étapes de la diapédèse des neutrophiles.

Adapté de [274].

6.2.3 Dégranulation

Les neutrophiles possèdent quatre types de granules qui sont catalogués selon leur contenu. Ces différentes classes de granules cytoplasmiques diffèrent de manière substantielle dans leur contenu luminal, la propriété de leurs membranes et leur capacité de dégranulation [282, 283].

Durant le développement des neutrophiles, les granules primaires ou azurophiles sont les premières granules à être formées. Ces granules sont rarement sécrétés à l'extérieur de la cellule. Ils fusionnent de manière prédominante avec la membrane de la vacuole phagocytaire pour détruire les micro-organismes ingérés, à l'aide entre autres, de la myéloperoxydase (MPO), des élastases, des défensines, des azurocidines et des lysozymes qu'ils contiennent [282-285]. Ainsi, les granules primaires jouent un rôle important dans le fusionnement avec les phagosomes et dans la dégradation des pathogènes phagocytés [286] [282].

Les granules secondaires ont plutôt un rôle antimicrobien puisqu'elles sont riches en particules antimicrobiennes qui sont sécrétées dans le milieu extracellulaire [286, 287]. Les principales particules antimicrobiennes sont la lactoferrine, le NGAL (*Neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) et le lysozyme. La lactoferrine est une glycoprotéine avec des propriétés antimicrobiennes grâce à sa capacité de séquestrer le fer, minimisant ainsi l'accès des bactéries à ce minéral essentiel [288-290]. Le lysozyme est une enzyme qui se trouve en concentration élevée dans les granules secondaires [291, 292]. Son effet bactériostatique est dû à sa capacité d'induire le clivage des polymères de peptidoglycane de la paroi bactérienne [293] et de lier le LPS [294].

Les deux dernières classes de granules sont formées vers la fin du développement des neutrophiles. Tout d'abord, il y a les granules tertiaires qui sont importantes dans le processus de migration des neutrophiles [295, 296]. En effet, les granules tertiaires, ou granules à gélatinase, possèdent une importante réserve de récepteurs nécessaire à la migration trans-endothéliale ainsi qu'une réserve d'enzymes utiles à la dégradation de la matrice extracellulaire, notamment les métalloprotéases MMP-8, -9 [297].

La dernière classe de granules est composée des vésicules sécrétoires. Ces vésicules sont les premières à être sécrétées à la suite d'un stimulus inflammatoire. Par ailleurs, ces vésicules sont importantes dans les étapes d'activation et d'adhésion irréversible de la migration puisqu'elles

possèdent une variété de récepteurs membranaires nécessaires à ces étapes comme la β 2-intégrine, le récepteur du FMLP (FRP), du LPS (CD14) et le récepteur Fc γ RIII [298]. En somme, les différentes classes de granules ont des rôles spécifiques qui permettent aux neutrophiles d'accomplir leurs rôles importants dans la réponse immunitaire et l'inflammation.

6.2.4 Explosion oxydative

Les neutrophiles sont d'importants producteurs d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Pour ce faire, les neutrophiles possèdent un complexe transmembranaire, la NADPH oxydase. La NADPH oxydase est capable de créer des ROS à partir d'anions superoxyde (O_2^-), qui sont par la suite secrétés de manière extracellulaire [299, 300]. Or, il y a également la présence de ROS intracellulaire. Effectivement, la NADPH oxydase est une composante de la membrane cytoplasmique qui est à l'origine de la formation du phagosome à la suite de l'invagination phagocytaire. Par conséquent, le ROS formé par la NADPH oxydase située sur le phagosome sera libéré à l'intérieur des neutrophiles [300-302]. Il est important de souligner que les anions superoxydes sont capables de générer plusieurs formes de ROS, telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^\bullet), qui sont nocifs et efficaces contre les pathogènes [303, 304]. En effet, la MPO provenant des neutrophiles catalyse la formation de l'acide hypochloreux (HOCl) (espèce réactive de l'oxygène), un bactéricide, à partir du peroxyde d'hydrogène [305].

6.2.5 Génération de médiateurs de l'inflammation

Outre les fonctions de défense contre les microorganismes, les neutrophiles peuvent également relâcher diverses molécules afin de mieux communiquer avec les cellules avoisinantes. En effet, cette fonction est primordiale pour les neutrophiles puisqu'ils sont parmi les premiers répondants lors de la réaction inflammatoire. Ainsi, ils peuvent moduler la continuation de la réponse immunitaire et contrôler les cellules proches du site d'inflammation. Les neutrophiles peuvent également mobiliser d'autres leucocytes vers le site inflammatoire à l'aide de la génération de médiateurs peptidiques et lipidiques. La figure 8 montre les différents médiateurs peptidiques et lipidiques produits par les neutrophiles et leurs cellules cibles.

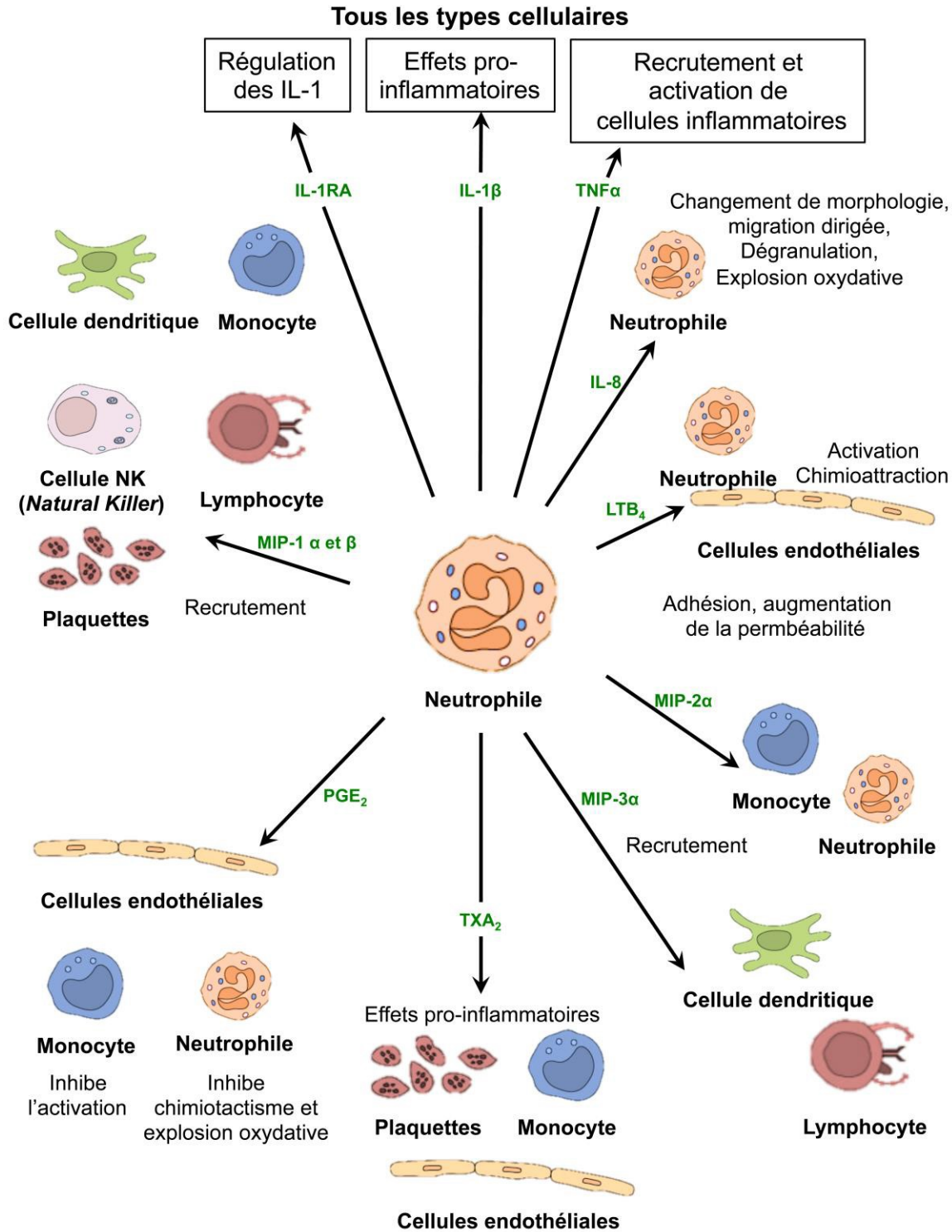


Figure 8. – Les différents médiateurs peptidiques et lipidiques produits par les neutrophiles.

6.2.5.1 Médiateurs peptidiques

Par le biais de la production des chimiokines et des cytokines, les neutrophiles peuvent influencer les cellules environnantes lorsqu'ils se retrouvent dans les sites d'inflammation. La production des molécules, telles que l'IL-1 β , l'IL-1RA, le TNF- α et l'IL-8, variera selon le type de stimulation des neutrophiles [306-310]. Membres de la famille de l'interleukine 1 (IL-1), l'IL-1 β et l'IL-1RA ont le potentiel de stimuler la plupart des types cellulaires, à l'aide d'autres cytokines ou d'autres messagers [311]. Or, ces cytokines doivent être rigoureusement régulées, particulièrement l'IL-1 β , à cause de l'amplitude de leurs effets pro-inflammatoires. Par exemple, l'IL-1RA peut altérer les effets de l'IL-1 à la suite d'une compétition pour les mêmes récepteurs, ce qui permet à l'IL-1RA de bloquer les voies de signalisation induite par l'IL-1 [311].

Le TNF- α (*Tumor Necrosis Factor α*) représente une autre importante cytokine qui est produite par diverses cellules, incluant les neutrophiles, mais majoritairement par les macrophages [312, 313]. Le TNF- α a la capacité d'agir sur la majorité des cellules puisqu'elles expriment à leur surface, les récepteurs de TNF- α , le p55 et p75 [312]. En effet, ces récepteurs devenus solubles peuvent se lier au TNF- α , ce qui a pour résultat d'empêcher sa liaison avec les récepteurs membranaires actifs. Par conséquent, la régularisation du TNF- α est primordiale puisque l'induction du TNF- α déclenche une réaction en chaîne menant au recrutement et à l'activation de la réponse inflammatoire. Cette cascade d'évènements se traduit par l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium, la dégranulation, l'explosion oxydative des neutrophiles ainsi que la génération des médiateurs de l'inflammation tels que les prostaglandines (PGI₂, PGE₂) et l'IL-1 [312]. De plus, le TNF- α peut également agir au niveau de la différenciation cellulaire, l'apoptose et la prolifération [312].

D'autre part, l'IL-8 est l'une des principales chimiokines sécrétées par les neutrophiles. Mais, elle peut aussi être générée par les cellules endothéliales et les monocytes [314]. Or, la principale cible de l'IL-8 est le neutrophile afin d'y induire la migration dirigée, la dégranulation, l'explosion oxydative et les changements morphologiques [314]. L'IL-8 est un puissant chimio attractant dédié presque uniquement aux neutrophiles puisque son action peut durer jusqu'à 10 heures. Le recrutement des neutrophiles au site inflammatoire se produit lorsqu'on retrouve une concentration élevée en chimiokines, créant ainsi un gradient chimiotactique et causant le

mouvement des cellules inflammatoires (neutrophiles, monocytes) vers ce site. *In vivo*, le gradient chimiotactique peut être induit par la liaison et l'ancrage de l'IL-8 aux protéines de la membrane basale, aidant l'orientation des cellules vers le site inflammatoire, ainsi que leur maintien local. L'interleukine-8, suite à sa liaison à l'un de ses deux récepteurs extracellulaires couplés aux protéines G, le CXCR1 ou le CXCR2, régule de nombreuses activités biologiques dont l'activité chimiotactique qui implique le couplage de ces récepteurs à la protéine G α i [315-317]. La phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) est une des principales cibles des sous-unités hétérotrimériques G $\alpha\beta\gamma$ i [318]. L'IL-8 peut également activer la voie de signalisation des MAPK (*mitogen activated protein kinase*), ce qui induit une augmentation de la survie des neutrophiles et la prolifération des cellules endothéliales (CE) et des cellules provenant de lignées tumorales [319-324].

Il a été démontré que l'IL-8 induit la phosphorylation du VEGFR2 (récepteur du VEGF localisé à la surface des CE) dans les CE par l'entremise de l'association du VEGFR2 avec les récepteurs CXCR-1 ou CXCR-2 activés préalablement par l'IL-8, ce qui module la perméabilité de la barrière endothéliale [325]. De plus, certaines cytokines pro-inflammatoires, telles l'IL-1 α et l'IL-6, induisent une hausse de l'expression génique et protéique du VEGF [326], ce qui est en lien avec la capacité de ce dernier à induire l'hyperperméabilité vasculaire et l'inflammation [326]. Le VEGF joue un rôle clé, par l'entremise de sa surexpression induite tant par l'ischémie, que par une multitude de facteurs de croissance et cytokines, dans de nombreuses pathologies, notamment l'infarctus du myocarde [327, 328], les accidents vasculaires cérébraux [329] et les maladies inflammatoires chroniques telles que le psoriasis [330] et l'arthrite rhumatoïde [331].

L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire relâchée lors de la phase inflammatoire aiguë qui contribue à l'hématopoïèse et les réactions immunitaires, suite à une infection ou dommage tissulaire [130]. De plus, l'IL-1, le TNF- α et l'IL-6 jouent un rôle important dans l'induction de diverses protéines inflammatoires, notamment la CRP par les cellules du foie, alors que les niveaux circulants de ces cytokines sont associés à plusieurs pathologies dont l'IC et le T2DM [130, 332, 333].

6.2.5.2 Médiateurs lipidiques

Les principales composantes des médiateurs lipidiques sont les phospholipides membranaires et la famille des éicosanoïdes comprenant les médiateurs lipidiques résultant du métabolisme de l'acide arachidonique qui est abondant dans les phospholipides [334, 335]. Le leucotriène B₄ (LTB₄), la prostaglandine E₂ (PGE₂) et le thromboxane A₂ (TXA₂) sont les principaux éicosanoïdes produits par les neutrophiles [334-336]. À la suite de l'activation des neutrophiles, le calcium intracellulaire est augmenté, ce qui entraîne une forte translocation de l'enzyme cytosolique phospholipase A₂ (cPLA₂) de type IV à la membrane nucléaire. Par la suite, cet enzyme clive les phospholipides possédant un acide arachidonique en position 2 préférablement et l'acide arachidonique, une fois libéré, peut servir dans plusieurs voies métaboliques dont les plus essentielles sont la formation des leucotriènes et la formation des prostanoides [337, 338].

6.2.6 Production de NETs

Un autre mécanisme inflammatoire et bactéricide des neutrophiles est la relâche des *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) [274, 302]. Il s'agit d'éléments essentiellement composée d'ADN sur lesquels adhèrent des protéines dont la majorité est des histones. Les autres protéines associées aux NETs proviennent des granules et du cytoplasme du neutrophile telle que : la NE, des protéines provenant des granules azurophiles (comme la cathepsine G et la MPO), des protéines de granules spécifiques (la lactoferrine) [339, 340]. Ces protéines à effets antibactériens contribuent à l'effet bactéricide des NETs. Diverses études ont démontré l'implication des NETs dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires telle que l'athérosclérose, l'IC et le T2DM [341-344]. En effet, les NETs activent l'agrégation des plaquettes aux CE, menant à la formation de thrombose et de lésions vasculaires [341, 342]. Plusieurs études ont démontré l'implication des NETs dans la pathogénèse de l'athérosclérose. Or, la présence de NETs (à l'aide de marqueurs tels que l'ADN double brin, le nucléosome, l'histone H3 citrullinée et le complexe MPO-ADN) a été associée à une aggravation de la vulnérabilité de la plaque.

6.3. Implications pathologiques des neutrophiles

6.3.1 Le rôle des neutrophiles dans l'athérosclérose.

Les maladies cardiovasculaires sont très répandues chez l'homme représentant également la principale cause de mortalité dans les pays développés. Des récentes études ont suggéré un rôle important des neutrophiles dans les maladies cardiovasculaires [345-348], plus spécifiquement dans le développement et la progression de l'athérosclérose [345-348], qui se définit comme une inflammation chronique de l'intima artérielle caractérisée par une formation graduelle d'une lésion de la néo-intima et un rétrécissement des artères affectées [349].

La compréhension de l'implication des neutrophiles dans le développement de l'athérosclérose serait un atout dans la prévention de cette maladie et la création de thérapies efficaces contre sa progression. Or, il a été démontré que les neutrophiles sont présents dans la plaque athéromateuse chez les humains et dans le modèle murin [345-348]. En effet, Naruko et al. ont observé la présence de neutrophiles dans la plaque athéromateuse en utilisant des anticorps dirigés contre les marqueurs de neutrophiles Ly6G (correspondant au CD66b chez l'humain), élastase et MPO [345]. De plus, il a été démontré que la déplétion des neutrophiles chez les murins athéromateux (ApoE^{-/-}) a significativement réduit la taille de la plaque durant les premières étapes de la formation de la lésion athéromateuse [347]. Ceci suggère un rôle important des neutrophiles au niveau de l'initiation, de la progression et de la déstabilisation de la plaque athéromateuse.

6.3.1.1 Le rôle des neutrophiles dans l'initiation de l'athérosclérose

La dysfonction endothéliale est une étape primordiale dans l'initiation de l'athérosclérose [350]. Cette dysfonction se manifeste par une réduction de la vasodilatation, une aggravation de l'état pro-inflammatoire due à une forte concentration de molécules d'adhésion et chimiokines, et finalement, une augmentation de la perméabilité vasculaire [350]. Des facteurs de risque cardiovasculaires tels que l'hyperlipidémie et l'hypercholestérolémie peuvent induire cette dysfonction [350, 351]. Parallèlement, l'augmentation de la concentration lipidique peut également induire l'activation des neutrophiles [350] qui peut aggraver la dysfonction endothéliale. En effet, une corrélation entre le nombre de neutrophiles et la réduction de la

vasodilatation a été rapportée [350], ce qui pourrait suggérer que l'activation des neutrophiles pourrait mener à la sécrétion d'espèces radicalaires et de protéines granuleuses. Effectivement, certaines études ont observé que certaines protéines sécrétées par les neutrophiles activés, telle que la MPO, induiraient une réduction de la vasodilatation [350].

Le maintien de l'état pro-inflammatoire aggrave la dysfonction endothéliale. L'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales via l'intégrine- β_2 induit la sécrétion de l'azurocidine et de la protéinase-3 qui stimulent la production de VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) et ICAM-1 via la PKC endothéliale. De plus, l' α -défensine sécrétée par les neutrophiles contribue à l'aggravation de la dysfonction endothéliale en induisant l'augmentation des produits radicalaires et la diminution du NO [351]. L'expression de molécules d'adhésion (ICAM-1, E- et P-sélectine) et de chimiokines plaquettaires (CXCL4, CCL5) mènerait également à l'intensification du recrutement et l'adhésion de neutrophiles au niveau artériel [351].

Finalement, les azurocidines, les médiateurs lipidiques, et les ROS dérivés des neutrophiles jouent un rôle important dans la perméabilisation vasculaire. Effectivement, les azurocidines sécrétées s'intercaleraient avec les protéoglycanes endothéliaux afin de stimuler l'activation des cellules endothéliales et modifier la perméabilité de ces cellules [351].

6.3.1.2 L'implication des neutrophiles dans l'activation et le recrutement des monocytes

L'accumulation de neutrophiles dans la lésion athéromateuse serait nécessaire pour le recrutement des monocytes ainsi que leur activation. En effet, les monocytes et les macrophages sont les leucocytes les plus abondamment trouvés dans la plaque athéromateuse. Il a été observé qu'une déficience de neutrophiles induisait une baisse significative du recrutement des monocytes et des macrophages dans la paroi artérielle [347]. Ainsi, la présence des neutrophiles servirait à l'accélération du recrutement des monocytes. Ce recrutement est régulé par la sécrétion de protéines telles que les azurocidines, les protéinases-3 (PR3) et les α -défensines [347]. Les azurocidines se déposent sur l'endothélium à cause de leur nature cationique et lorsqu'elles sont présentées aux monocytes en roulement sur l'endothélium, elles favoriseraient la ferme adhésion de ces derniers [352]. Les PR3 et les α -défensines favoriseraient l'expression de la CCL2 (*C-C Motif Chemokines Ligand 2*) ce qui amplifie le recrutement des monocytes [352].

Par ailleurs, les neutrophiles sécrèteraient des granules qui servent à attirer les monocytes telles que la cathépsine G et la cathélicidine (LL-37 chez les humains ou CRAMP dans le modèle murin) [353].

À la suite de leur recrutement, les monocytes se différencient en macrophages et en cellules spumeuses avec la contribution des neutrophiles [354]. En effet, la sécrétion d' α -défensines par les neutrophiles contribuerait à l'oxydation du LDL qui induit la différenciation des macrophages en cellules spumeuses à la suite de la capture de LDL oxydé [351]. Les neutrophiles peuvent également contribuer directement ou indirectement à la génération du LDL oxydé [351]. En effet, outre les granules, les neutrophiles produisent également beaucoup de ROS par le biais du MPO, des lipoxygénases et de la NADPH oxydase [351]. Or, les ROS sécrétés par les neutrophiles peuvent également contribuer à l'oxydation du LDL. De plus, la phagocytose du MPO dérivé des neutrophiles peut stimuler la sécrétion de ROS et de cytokines pro-inflammatoire (comme le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, etc.) par les macrophages. Ceci permettrait de maintenir la progression de l'inflammation à l'intérieur de la lésion [351].

Outre le rôle joué dans la formation de cellules spumeuses, les neutrophiles induisent également l'activation des macrophages qui sont des acteurs de premier plan tout au long de l'évolution de l'athérosclérose. Par exemple, les macrophages qui possèdent un phénotype M1 pro-inflammatoire sont importants dans les dernières phases de l'athérosclérose [350]. Or, plusieurs études ont démontré une relation entre la dégranulation des neutrophiles et le changement phénotypique des macrophages. En effet, la sécrétion d'azurocidin et d' α -défensine par les neutrophiles serait à l'origine du changement phénotypique vers les macrophages M1 [350].

6.3.1.3 Contribution des neutrophiles dans la déstabilisation de la plaque athéromateuse

La déstabilisation de la plaque athéromateuse est le fruit de l'érosion de la surface endothéliale ainsi que de la rupture de la chape fibreuse. Cette érosion est en corrélation avec l'apoptose des cellules endothéliales suivie de la desquamation endothéliale [350]. Le rôle des neutrophiles dans ces dernières étapes de l'athérosclérose commence à être élucidé. Certaines études ont démontré que les neutrophiles pourraient contribuer directement à l'induction du signal apoptotique dans les cellules endothéliales. En effet, il a été suggéré que les ROS dérivés des

neutrophiles étaient impliqués dans la mort des cellules endothéliales [350]. L'accumulation de ces corps apoptotiques est nécessaire pour la formation du centre nécrotique, qui représente une étape essentielle dans la vulnérabilité de la plaque puisque ce centre contient une forte concentration de médiateurs pro-inflammatoires et pro-thrombotiques [350]. Les macrophages et les cellules musculaires lisses sont considérés comme les principales sources de cellules nécrotiques, mais les neutrophiles peuvent également être impliqués dans la formation du centre nécrotique. Par ailleurs, le HOCl généré par le MPO dérivé des neutrophiles, pourrait contribuer à la desquamation endothéliale et l'induction d'un phénotype pro-thrombotique [350]. De plus, l'association du MPO avec CD11b/CD18 prolongerait la survie des neutrophiles afin de maintenir l'état d'inflammation [350, 355].

Les neutrophiles peuvent également contribuer à l'affaiblissement de la chape fibreuse. Une forte concentration de gélatinase (MMP-2 et -9) a été observée dans la plaque athéromateuse, plus spécifiquement dans les régions de la plaque sensibles à la rupture [350, 356]. En effet, les gélatinases qui sont présentes dans les granules secondaires et tertiaires des neutrophiles sont responsables de la dégradation du collagène type IV ainsi que d'autres composantes de la chape fibreuse telles que l'élastine, la fibronectine, la vitronectine, et la laminine [357]. Or, d'autres études ont démontré une relation entre les gélatinases et la vulnérabilité de la plaque [357-359]. Par conséquent, le niveau de gélatinases dans le sérum représente un marqueur potentiel de l'instabilité de la plaque [357].

6.3.2 Rôle des neutrophiles dans le diabète

Il existe deux types de diabète : le diabète de type 1 (T1DM), qui est une maladie auto-immunitaire, et le diabète de type 2 (T2DM), qui est une complication métabolique [302]. Les patients diabétiques sont majoritairement de type 2 avec une prévalence approximative de 85-95% [360]. Par conséquent, le T2DM représente un énorme défi pour le 21^e siècle à cause de la fréquence grandissante de l'obésité dans les pays développés. En effet, il est estimé que, d'ici 2035, 500 millions d'individus seraient diagnostiqués avec le diabète dans le monde [361]. Par ailleurs, il existe un lien étroit entre le T2DM et les maladies cardiovasculaires (MCV) puisque les patients diabétiques ont 2 à 4 fois plus de chances de développer une MCV et d'en mourir [361]. En effet, le diabète de type 2 (T2DM) est associé à des facteurs de risque cardiovasculaires tels

que l'HTA, la dyslipidémie, le tabagisme ainsi que l'obésité [244]. L'ensemble de ces facteurs confère un risque élevé de développer de l'athérosclérose, la cardiopathie ischémique, la dysfonction ventriculaire gauche, et évidemment une IC. D'autre part, la cardiomyopathie diabétique est une entité bien définie facilitée par l'hypertrophie ventriculaire, une dysfonction systolique, et/ou une diastolique, amenant alors une IC clinique [245]. L'hyperglycémie et la résistance à l'insuline induisent un état pro-inflammatoire, réduisent la biodisponibilité en NO, diminuent l'activité de la protéine kinase G, et augmentent les produits de glycation avancé (*advanced glycation and products-AGEs*) [245]. Ceci va induire une hypertrophie ventriculaire. Ces évènements ainsi que l'augmentation du dépôt de collagène augmentent la vulnérabilité du cœur diabétique à développer l'IC. Le T2DM est généralement le résultat de l'obésité et d'une résistance à l'insuline [362] et ces deux facteurs induisent une réponse pro-inflammatoire qui permet la progression du T2DM ainsi que le développement de MCV [362]. Les macrophages ont longtemps été considérés comme les principaux médiateurs de cette réponse pro-inflammatoire [302, 363], mais de récentes études ont démontré le rôle émergent des neutrophiles dans la progression du T2DM [362, 364, 365].

Ainsi, le groupe de Sefil, F. a récemment démontré, à la suite d'une comparaison entre des patients T2DM traités et des patients T2DM non traités, qu'il y avait une corrélation entre l'augmentation du NLR (ratio des neutrophiles par rapport aux lymphocytes) et l'augmentation de la concentration d'hémoglobine glycosylée (HbA_{1c}), un marqueur diagnostique du T2DM [302, 366]. Il a été démontré qu'il y avait une augmentation du recrutement des neutrophiles dans les tissus adipeux dans les premières phases d'un régime cétogène utilisé pour induire l'obésité dans le modèle murin [302, 367] et cette accumulation de neutrophiles peut mener au développement et à la progression du T2DM [302, 368]. Effectivement, l'accumulation des neutrophiles activés par un régime cétogène dans le modèle murin augmente la production de protéases spécifiques aux neutrophiles telle que l'élastase [364]. Cette protéase induirait une résistance à l'insuline, un des facteurs contributeurs au T2DM [302, 364]. Par ailleurs, les auteurs proposent que la résistance à l'insuline dans ce modèle soit due à la dégradation des substrats du récepteur de l'insuline 1 (IRS-1) par les élastases [364] qui affecterait la cascade de signalisation induite par l'insuline.

De plus, il a récemment été observé que les patients T2DM, outre un NLR élevé, avaient également une forte concentration de MPO plasmatique [365]. Le MPO sécrété par les neutrophiles joue un rôle important dans l'initiation de la réponse pro-inflammatoire dans le tissu adipeux [365]. Par conséquent, Wang et al. ont démontré que l'inhibition du MPO empêchait le développement de l'obésité et diminuait la résistance à l'insuline due à l'obésité [365]. Ainsi, l'inhibition du MPO a réduit le niveau d'expression de l'ARNm des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , IL-6 et l'IL-1 β et a empêché la modification post-transcriptionnelle du récepteur de l'insuline (IR- β) [365]. Ceci permettrait la réduction de la résistance à l'insuline en atténuant la dégradation rapide du récepteur [365]. L'analyse de l'activation des neutrophiles chez les patients diabétiques ou obèses a permis de découvrir le rôle d'autres protéines dérivées de ces cellules dans la progression de la maladie. Ainsi, l'équipe de Zurawaska-Plaksej et al. a démontré que les neutrophiles sont la source de protéines telles que la chitinase et les *chitinase-like proteins* (CLPs), plus spécifiquement le *chitinase 3-like protein* (YKL-40). Ces deux protéines avaient une concentration deux fois plus élevée chez les patients diabétiques en comparaison avec les volontaires sains [362]. De façon intéressante, ce niveau élevé des deux protéines, la chitinase et la YKL-40, est fortement corrélée avec l'activité des élastases [362]. La chitinase peut être utilisée comme un marqueur de la dysfonction endothéliale tandis que le YKL-40 est associé avec la résistance face à l'insuline [362].

Finalement, le stress oxydatif joue un rôle important dans la progression du T2DM [369]. Par ailleurs, il y a une corrélation entre le niveau du stress oxydatif et l'hyperglycémie [369]. Initialement, la source des ROS était considérée comme diversifiée, provenant des cellules endothéliales vasculaires, des macrophages, etc. [369], or les neutrophiles représentent la source principale du ROS [369]. Ainsi, Omori et al. ont démontré qu'il y avait une préformation des sous-unités de la NAPH oxydase dans les neutrophiles chez les patients diabétiques pour une induction rapide et efficace du stress oxydatif [369].

En somme, l'étude du rôle des neutrophiles dans le développement du T2DM est primordiale puisque ces cellules peuvent jouer un rôle dans l'initiation du T2DM ainsi que dans la physiopathologie du diabète. En effet, les neutrophiles peuvent également être impliqués dans l'aggravation des MCV. Cependant, il y a quelques ambiguïtés qui persistent, puisque le T2DM

peut également atténuer les fonctions des neutrophiles telles que la phagocytose, l'adhésion et les activités antimicrobiennes [344, 370]. Donc, ceci rendrait les patients diabétiques sensibles aux infections et affecterait la guérison [344]. Par conséquent, la détermination du rôle des neutrophiles dans les différentes phases du diabète permettra l'établissement de différents traitements thérapeutiques ciblés.

6.3.3 Rôle des neutrophiles dans l'insuffisance cardiaque

De récentes études ont suggéré que les neutrophiles et les monocytes jouent un rôle dans la physiopathologie de l'IC [371]. En effet, un niveau élevé de neutrophiles a été recensé chez les patients impliqués dans les essais SOLVD [100]. Les patients décédés durant l'étude présentaient une augmentation du décompte des neutrophiles lors du dernier prélèvement avant le décès que ceux ayant survécu. Cette augmentation des niveaux circulants de neutrophiles pourrait être attribuée à une survie plus longue de ces cellules chez les patients IC. En fait, une étude menée par Tracchi et al. suggère que la durée de vie des neutrophiles chez les patients IC est plus élevée comparativement aux sujets sains. De plus, il y avait une corrélation entre la durée de vie des neutrophiles, la classification fonctionnelle du NYHA et le niveau plasmatique de CRP [372]. D'autres études ont démontré une corrélation entre la viabilité des neutrophiles et la sévérité des symptômes de l'IC, ce qui suggère un rôle prépondérant des neutrophiles lors de la réponse inflammatoire chez ces patients. D'ailleurs, il a été également observé que la réponse apoptotique est retardée dans un modèle d'IC chez les rats [373]. Selon les auteurs, étant donné que les neutrophiles sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, telles que TNF- α , IL-6 et IL-8, le prolongement de leur survie pourrait être due aux hauts niveaux de TNF- α , IL-6 dans le modèle IC chez les rats [373]. Or, l'accumulation de molécules sécrétées par les neutrophiles, comme les ROS, le MPO, les MMP-8 et -9, et *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL) pourrait contribuer à l'aggravation des facteurs menant à l'IC [374]. Par exemple, le MPO sécrété par les neutrophiles a été associé au dysfonctionnement endothélial et une diminution de la contractilité du ventricule gauche. En effet, le niveau d'expression de l'ARNm du MPO provenant des leucocytes en circulation a été significativement augmenté chez les patients avec un dysfonctionnement du ventricule gauche. De plus, les BNP permettent l'élimination des ROS générés par les neutrophiles, mais ce mécanisme d'élimination a été altéré chez les patients

souffrant d'IC aiguë [374]. Ainsi, la présence significative de ROS pourrait contribuer à l'activation anormalement élevée des MMPs. Cette activation des MMPs mènerait à la dégradation de la matrice extracellulaire ce qui provoquerait le remodelage du ventricule gauche [375].

Un des effets de l'activation des neutrophiles est la génération de microvésicules extracellulaires (MVs). Les MVs représentent de petites vésicules membranaires qui sont sécrétées à la suite de l'activation cellulaire ou de la mort cellulaire [376]. Les MVs peuvent dériver également des plaquettes, de cellules endothéliales, des monocytes, et autres [376]. La libération des MVs peut mener, entre autres, à l'activation des plaquettes et à l'induction de la dysfonction endothéliale [376]. Ceci peut être associé aux facteurs de risque cardiovasculaire, à l'athérosclérose ou la thrombose[376]. Ainsi, selon Welsh et al., les MVs ont le potentiel de devenir des biomarqueurs des maladies cardiovasculaires [377]. Les microvésicules dérivées des neutrophiles (NMVs) sont caractérisées par la présence de CD45, CD4, CD8, CD66b ou CD14 sur leur surface [377, 378]. De plus, les NMVs induiraient l'inflammation et la coagulation [377]. Le rôle spécifique des NMVs dans l'IC demeure inconnu. En effet, les microvésicules dérivées des cellules endothéliales sont plus étudiées dans l'IC puisqu'elles sont le résultat de l'apoptose de ces cellules [377, 379]. Cependant, de récentes études ont démontrés que les NMVs expriment le MPO qui peut induire la lésion des cellules endothéliales [380], suggérant une possible participation à la dysfonction endothéliale, qui est une des étapes initiales de l'IC. En outre, il a été démontré que les NMVs participent au développement de vasculopathies telles que les vasculites et l'athérosclérose [381].

En somme, l'étude des mécanismes de libération des NMVs et leurs rôles potentiellement pro-inflammatoires pourrait permettre de comprendre leur impact dans la physiopathologie de l'IC. Ceci pourrait, par conséquent, être un nouvel objectif fort intéressant à envisager pour une thérapie de cette maladie.

7. Objectifs de recherche

Il a été démontré que l'IC qu'elle soit de phénotype IC-FER ou IC-FEP est caractérisé par un état inflammatoire sub-clinique [130, 131]. En effet, il existe de nombreuses évidences démontrant le rôle des cytokines dans l'inflammation sub-clinique qui caractérise l'IC. Par ailleurs, les

neutrophiles sont des acteurs de premier plan dans la production de cytokines pro-inflammatoires. Il a également été démontré que les neutrophiles jouent un rôle important dans les maladies cardiovasculaires. La libération de cytokines pro et anti-inflammatoires par les neutrophiles n'a pas été étudiée chez les patients IC-FER et IC-FEP.

Considérant les affirmations énumérées précédemment, les buts de ce travail sont : 1) de caractériser le profil sanguin pro- et anti-inflammatoire des biomarqueurs circulants et leur libération par les neutrophiles dérivés des patients IC-FER et IC-FEP et les comparer à ceux libérées par les neutrophiles des volontaires sains, 2) étudier les effets du diabète sur cette libération. Ces objectifs de recherche permettront de répondre à l'hypothèse stipulant que les biomarqueurs dérivés des neutrophiles sont anormaux et en condition pro-inflammatoire dans l'IC de phénotype réduit ou préservée. La présence de diabète contribue de façon significative et synergique à l'état pro-inflammatoire dans un contexte d'IC.

Chapitre 2 – Neutrophils pro and anti-inflammatory cytokine release in patients with heart failure and reduced ejection fraction

article acceptée au journal ESC-Heart Failure

Diana Char^{1,2}, Benjamin Dumont^{1,3}, Branka Vulesevic¹, Paul-Eduard Neagoe¹, Agnes Rakel^{2,4},
Martin G. Sirois^{1,3*} and Michel White^{1,2*}

¹Research center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8, ²Departments of medicine, ³pharmacology and physiology, Faculty of medicine, and ⁴Research Center - Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Université de Montréal, Montreal (Québec), Canada

Word count: 3252 (text only)

*Corresponding co-senior authors: Michel White and Martin G. Sirois, Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8. Tel: 514-376-3330

Fax: 514-376-1355

E-mail: m_white@icm-mhi.com

E-mail: martin.sirois@icm-mhi.org

Abstract:

Aims Heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF) is characterized by sub-clinical inflammation. The changes in selected biomarkers of inflammation concomitantly with the assessment of neutrophils pro- and anti-inflammatory cytokines release have not been investigated in patients with HFrEF.

Methods and results 52 patients with HFrEF, aged 68.8 ± 1.7 years, and left ventricular ejection fraction $28.7 \pm 1.0\%$, and 21 healthy controls (CTL) were recruited. Twenty-five HF patients had type 2 diabetes. Venous blood samples from HF and CTL were collected once. Plasma pro- and anti-inflammatory cytokines levels and produced by the neutrophils were assessed by ELISAs. Plasma biomarkers included, C-reactive protein (CRP), vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukins (IL)-6, -8, -1 receptor antagonist (-1RA), nitric oxide (NO), soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1) and E-Selectin (sE-Sel). Neutrophils were isolated and stimulated with various agonists to promote VEGF, IL-6, IL-8 and IL-1RA release.

Compared with CTL, HFrEF patients yielded a profound decrease in circulating VEGF (178.0 (IQR 99.6 ; 239.2) vs 16.2 (IQR 9.3 ; 20.2) pg/mL, $P \leq 0.001$) and NO (45.2 (IQR 42.1 ; 57.6) vs 40.6 (IQR 30.4 ; 47.1) pg/mL, $P = 0.0234$). All other circulating biomarkers were significantly elevated. Neutrophils from HF patients exhibited a greater release of IL-6 (LPS: 46.7 ± 3.9 [CTL] versus 165.8 ± 48.0 pg/mL [HF], $P = 0.1713$) and IL-8 (TNF- α : 0.6 ± 0.1 [CTL] versus 1.5 ± 0.1 ng/mL [HF], $P = 0.9937$; LPS: 1.2 ± 0.1 [CTL] versus 10.4 ± 1.6 ng/mL [HF], $P < 0.001$). In contrast, VEGF and IL-1RA release were significantly reduced (by 38.6% and 81.8% respectively) in HFrEF compared with CTL.

Conclusions Patients with HFrEF exhibit a significant decrease in circulating VEGF. The release of VEGF, and both pro- and anti-inflammatory cytokines from the stimulated neutrophils is markedly abnormal in these patients. The clinical significance of these findings deserves further investigation.

Keywords Heart failure; Diabetes; Neutrophil; Inflammation; Cytokines

Introduction:

Heart failure (HF) is characterized by a broad-spectrum increase in biomarkers related to neuro-humoral activation, extracellular matrix turnover, and myocardial remodeling.^{1, 2} Similarly, patients with HF exhibit a significant elevation of markers related to subclinical inflammation and oxidative stress.^{1,2} The increase in many of these markers has been related to an adverse outcome in these patients.^{3,4}

Neutrophils are leukocytes acting as the first line of host defense against pathogens but also in inflammation-mediated injury. More recently, neutrophilia (higher neutrophil count), lymphopenia (lower lymphocyte count) and a greater neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) have been associated with HF severity, complications following LVAD insertion, and overall mortality in patients with various etiologies of HF.⁵⁻⁸ An increase in neutrophil blood count has not only been shown to correlate with the severity of coronary damage in patients with coronary artery diseases (CAD),^{9,10} but also with the presence of heart failure.^{11,12} Despite the prominent role of neutrophils in inducing the chronic inflammatory response in the pathogenesis of many diseases,¹³ role in the pathophysiology of heart failure and the impact of neutrophils targeted therapy remains largely unknown.

Several clinical and biochemical parameters characterize higher risk HF patients. Among the clinical parameters, the presence of diabetes mellitus (DM) has been associated with an increase in early mortality following acute decompensated heart failure, overall hospitalizations and long-term events in patients with heart failure.^{14,15} High-risk patients, such as those with diabetes and HF, exhibit an increased activation of the innate system.^{16,17} Despite the mounting evidences regarding the significant role of diabetes on the pathophysiology of heart failure and more specifically on inflammation, the changes in circulating biomarkers with the concomitant assessment of neutrophils-mediated pro- and anti-inflammatory cytokine release have not been reported in HF patients with or without diabetes nor compared with healthy controls (CTL).

The primary objective of this study was to investigate the changes in circulating biomarkers and selected cytokines related to sub-clinical inflammation and their release from stimulated

neutrophils in patients with HF and reduced ejection fraction (HFrEF) compared with CTL. The secondary objective was to explore the effects of diabetes and HF on these responses.

Methods:

Population

The design of this mechanistic clinical study was a prospective non-randomized non-interventional investigation. A total of twenty-seven (27) patients with HF and 25 patients with HF and DM were prospectively studied at the Montreal Heart Institute (MHI). The blood collection from all patients (52) and 21 CTL was performed once. This study was approved by the Scientific Research Committee and the Ethics Committee of the MHI (ethics No. ICM #01-406 and No. ICM #12-1374) and conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Donors were informed about the procedures and signed a written informed consent before participating in the study.

Selection criteria of healthy control volunteers and patients

The CTL recruited for this study were eligible assuming they had no significant medical conditions nor were treated by any anti-inflammatory medication for at least 14 days prior to blood collection. Patients with HF and with NYHA classification of 2 or 3 were recruited from the MHI Heart Failure clinic. These patients were classified as HFrEF if their LVEF was $\leq 40\%$,^{18, 19} as documented by contrast ventriculography, magnetic resonance imaging, radionuclide ventriculography or echocardiography assessed within the previous 12 months if no significant cardiac events occurred since the initial LVEF assessment. The patients had to be optimally treated with A-II modulating agents, beta-blocker, and mineralocorticoid antagonist agents unless not tolerated or contra-indicated. In addition to the previous inclusion criteria outlined above, patients with HF and DM required an HbA1c $< 10\%$ (13.4 mmol/L) and good glycemic control by any available hypoglycaemic medications and treated with secondary preventive medication as per current guidelines. The most significant exclusion criteria were the presence of severe chronic pulmonary disease, chronic active inflammatory disease, severe renal failure (creatinine $> 250 \mu\text{mol/L}$), liver dysfunction (blood transaminases ≥ 3 -fold upper normal values), and ongoing malignancy. Other exclusion criteria comprised a recent myocardial infarction, stroke, or cardiac surgery (< 3 months), HF NYHA class IV and/or unstable clinical condition. Patients with HF and DM, and CTL having ongoing and/or recent infection within 2 weeks prior to

the study (as this would affect neutrophil counts) or had CRP values higher than 15 mg/L (suggesting some acute inflammatory status) were excluded from this study.

Study protocol – plasma, serum and neutrophil collection

Venous blood samples from CTL and patients with HF with or without DM were collected in one SST serum separation tube (3.5 mL blood volume) and in 30-mL syringes pre-filled with the anticoagulant citrate Dextrose solution USP (ACD) Formula A (ratio ACD: blood 1:5; 45 mL blood volume). Following a 200 g centrifugation of the anticoagulated blood, 4 mL of platelet-rich plasma (PRP in ACD) were re-centrifuged (11000 g, 2 min, 4°C) to obtain citrate platelet-free plasma (PPF). The SST tube was also centrifuged (1500 g, 15 minutes, RT) to obtain serum, and all serum and plasma samples were aliquoted and frozen at -80°C. Neutrophils were isolated by Dextran sedimentation followed by Ficoll-Paque density gradient and re-suspended in RPMI medium supplemented with 25 mM HEPES and 1% penicillin/streptomycin as described previously.²⁰ Contamination with peripheral blood mononuclear cells was <0.1% as determined by morphological analysis and flow cytometry (data not shown), and viability was >98% (Trypan blue dye exclusion).²⁰ Pure neutrophil population (>99% purity) was used for all *in vitro* studies.

Biomarkers quantification

Plasma levels of interleukin (IL)-1 receptor antagonist (IL-1RA), IL-6, IL-8 and total nitric oxide (NO) and serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) were analyzed by Quantikine ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). The plasmatic levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1) and E-Selectin (sE-Sel) were analyzed by a Luminex Assay multiplex kit using the Bio-Plex 200 analyzer (Bio-Rad Laboratories, Saint-Laurent, QC). High-sensitivity CRP (hsCRP) in serum samples was quantified by nephelometry by the Clinical Biochemistry Laboratory at the MHI.

Neutrophil stimulation and treatments

Purified neutrophils (5×10^6 /mL, 500 μ L) were incubated in RPMI – 1640 solution (Gibco, Carlsbad, CA) supplemented with 5 % fetal bovine serum (PAA laboratories, Etobicoke, ON) 1 % penicillin/Streptomycin/Glutamax (P/S) (Gibco) and 25 mM HEPES (Sigma, Oakville, ON), and

named RPMI (for complete RPMI-1640 solution). Neutrophils were then stimulated for 2 hours with control vehicle (PBS), tumor necrosis factor- α (TNF- α ; 10 ng/mL) (Peprotech, Rocky Hill, NJ) or bacterial lipopolysaccharide (LPS; Escherichia Coli 0111:B4; 1 μ g/mL) (Sigma) at 37°C, 5% CO₂. Upon stimulation, neutrophils were centrifuged at 900 g for 7 minutes and supernatants stored at -80°C. The selected aforementioned agonists (LPS or TNF- α) were used based on their corresponding capacity to promote VEGF, IL-1RA, IL-6 and IL-8 release by the neutrophils.^{21, 22}

Statistical analysis

Continuous variables are presented as mean \pm SEM (normally distributed data) or as medians and IQR and categorical values as proportions (%). Statistical comparisons were made using a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Tukey's multiple comparison test (normally distributed data) or using a Kruskal-Wallis test, followed by a Dunn's multiple comparisons test. For Table 1, continuous variables were compared using either a one-way ANOVA or Student's t-test, whereas categorical variables were compared using a χ^2 test or a Fisher's exact test. Analyses were performed using GraphPad Prism 9.1.0 and differences were considered significant at $P \leq 0.05$.

Results

The clinical characteristics of the study population are presented in *Table 1*. The study population consisted of 21 CTL, 27 patients with HF without DM (HFrEF) and 25 HF patients with HF and DM (HFrEF+DM). Most patients had a HF caused by ischemic heart disease. There was a higher proportion of patients with hypertension amongst patients with diabetes. There were no significant differences in LV size and ejection fraction between patients with or without diabetes. Patients with diabetes presented a higher use of A-II modulating agents and/or the combination of both ACE inhibitor and angiotensin receptor blockade. No patients were chronically treated by an angiotensin receptor/neprilysin inhibitor (ARNI). The levels of NT-proBNP were significantly elevated in patients with HF. By the time of recruitment in this study no patient were treated with a SGLT2 inhibitor. Both HF groups were significantly older than the CTL group. Pearson correlation analysis showed no significant correlation between all circulating biomarkers (except for CRP) and age for CTL.

The results for the circulating levels of selected biomarkers are presented in *Figures 1* and *2*. HF patients yielded a profound decrease (>90% reduction) in the circulating levels of VEGF. Similarly, circulating levels of nitric oxide (NO) were significantly reduced in HF patients regardless of the presence or absence of diabetes. Patients with HF exhibited significant increased levels of hsCRP, sICAM-1, sVCAM-1, sE-Sel (HFrEF+DM only), IL-6, and IL-8, as well as an elevation of the circulating levels of the anti-inflammatory cytokine IL-1RA. In addition, there was a significant increase in the circulating levels of IL-6, IL-8 and IL-1RA ($P<0.001$) and a non-significant decrease ($P=0.0617$) in circulating metabolites of NO in patients with HFrEF+DM as compared with patients with HFrEF without diabetes.

Effect of pro-inflammatory agonists on the release of selected cytokines by neutrophils

We assessed the capacity of selected pro-inflammatory agonists to induce the release of cytokines known to be expressed and released by human neutrophils.²²⁻²⁴ We assessed the effect of a 2-hr treatment with either TNF- α (10 ng/mL) and/or LPS (1 μ g/mL) compared to PBS-control

vehicle to induce the release of VEGF, IL-1RA, IL-8 and IL-6 by neutrophils ($5 \times 10^6/\text{mL}$, 500 μL) (*Figure 3*).

At baseline (PBS), we observed a non-significant increase of the neutrophils secretion of pro-inflammatory biomarkers (VEGF, IL-6 and IL-8) and a significant decrease of the anti-inflammatory IL-1RA in both HFrEF and HFrEF+DM patients compared to CTL (*Figure 3A-D*). No significant differences were observed in the basal biomarkers secretion between HFrEF and HFrEF+DM.

Upon stimulation with either TNF- α (10 ng/mL) or LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), all secreted biomarkers from CTL neutrophils were increased, with VEGF and IL-1RA being significant (*Figure 3A-D*).

VEGF release following TNF- α and LPS stimulation of HFrEF neutrophils was significantly reduced by 35.7 and 38.6% respectively while isolated neutrophils from patients with HFrEF+DM yielded a 38.7 (TNF- α) and 38.3% (LPS; not significant) decrease in VEGF compared with CTL (*Figure 3A*). No significant differences were observed in either TNF- α - or LPS-induced biomarkers secretion between HFrEF and HFrEF+DM.

Upon TNF- α and LPS stimulation, IL-1RA secretion from HFrEF neutrophils was significantly reduced by 81.8 and 87.0% respectively, and by 69.7 and 73.9% from HFrEF+DM neutrophils when compared to CTL neutrophils (*Figure 3B*). There was a higher but non-significant increase of IL-1RA secretion from HFrEF+DM, compared to HFrEF neutrophils, independently from the agonist used.

Neutrophils from HFrEF and HFrEF+DM patients were significantly more potent than CTL to secrete IL-8 by up to 10-fold following LPS stimulation (*Figure 3C*). No significant differences were observed in either TNF- α - or LPS-induced biomarkers secretion between HFrEF and HFrEF+DM.

Since TNF- α is unable to promote IL-6 release²⁵ we only used LPS as the main agonist. LPS-induced IL-6 secretion from HFrEF and HFrEF+DM neutrophils was increased by 4- and 8.5-fold respectively vs CTL neutrophils (*Figure 3D*). HFrEF+DM neutrophils secreted a significantly higher amount of IL-6 (2.4-fold) than HFrEF without diabetes.

Discussion

In this clinical mechanistic study, we reported a significant increase in the markers of vascular inflammation (sICAM-1, sVCAM-1 and sE-Sel), pro-inflammatory (IL-6 and IL-8) and anti-inflammatory (IL-1RA) interleukins in patients with HF. In contrast we observed a marked decrease in both circulating VEGF, a pro-angiogenic marker, and NO, a vascular relaxing factor in these patients. Under basal conditions, neutrophils from HF patients were primed to release VEGF, IL-6 and IL-8 in excess, while the release of the anti-inflammatory cytokine IL-1RA was significantly reduced. Neutrophils from patients with both HF and diabetes exhibited a greater response to LPS for IL-6 and IL-8 release, whereas they were less efficient to release VEGF and IL-1RA following LPS or TNF- α stimulation.

Systemic inflammation has been recognized as a pathobiologic feature of both acute and chronic HF. The presence of sub-clinical inflammation has been associated with the development, progression, and complication of HF, and has been predictive of poor outcome independently of other clinical parameters such as left ventricular ejection fraction or New York Heart Association functional class.²⁶ In addition, in patients with chronic HF, intestinal congestion and ischemia increase the number of pathogenic bacteria in the intestine and contribute to further promote low grade-inflammation.^{27, 28}

A significant and a broad spectrum increase in circulating neuro-hormones and pro-inflammatory and pro-thrombotic biomarkers have been reported in HF patients.³ Herein, we report a profound decrease in the circulating levels of VEGF in HF patients with advanced, yet stable disease. VEGF plays a significant role on angiogenesis upon vascular and tissue injury in humans.^{29, 30} In addition, VEGF may contribute to the growth of cardio-myofibroblasts, and has been reported to exert cytoprotective, anti-oxidative, and anti-apoptotic effects on the cardiomyocytes.^{31, 32} A decrease of circulating VEGF has been reported in animal models of advanced heart failure.^{32, 33} In the initial phases of HF, an increase of VEGF is observed in the myocardium, however, the exhaustion of VEGF release during prolonged hypoxia has been proposed as an important underlying factor contributing to a decrease of myocardial capillary density and decompensated heart failure.^{32, 34}

Our data are also in agreement with previous clinical studies reporting a decrease of circulating VEGF in patients with HF.^{30, 35}

The hemodynamic stress of HF such as an increase in wall tension and a decrease in peripheral blood flow trigger the release of an array of pro-inflammatory cytokines by cardiomyocytes, cardiac fibroblasts, endothelial cells and circulating leukocytes. In addition, bacteria and bacterial cell component such as LPS are transferred into the blood because of the abnormality of intestinal barrier function and an increase in central venous pressure.²⁸ The combination of low circulating VEGF and increased inflammation of the coronary microvascular endothelium most likely lead to a dysregulation of NO generation, and an increase in the production of reactive oxygen species (ROS).³⁶ These latter observations are in agreement with the data reported here showing a reduction of circulating NO levels in patients with HF.

As previously reported, we observed a marked increase of soluble endothelial adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1 and sE-Sel) in patients with HF.² This could be explained in part by an impaired synthesis and release of the VEGF-NO complex, as a decrease in endothelial NO synthesis induces the expression and translocation of endothelial adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and E-Sel).^{37, 38} This effect can also be exacerbated by the ability of CRP at concentrations known to be associated with an increased risk of cardiovascular events (>3 mg/L) to attenuate NO production.³⁹ In addition, CRP inhibits eNOS expression and NO synthesis, and upregulates the expression of adhesion molecules.^{39, 40}

Herein, we report a significant increase of both circulating pro-inflammatory interleukins (IL-6 and IL-8). Circulating levels of IL-6 and IL-8 were significantly increased in patients with HF and diabetes. These observations are in agreement with our previous published work and other independent studies, supporting the concept of a vascular and systemic inflammation in HF.^{26, 41-43} Both IL-6 and IL-8 are known to play a significant role in both HF and diabetes.^{26, 42, 43} In this study, we reported some small and inconsistent changes in the pro-inflammatory markers between diabetic and non-diabetic patients. These results may be explained by the differences in the etiology, gender, and the severity of heart failure. Furthermore, once the main disease (HF) has evolved to a certain point, the impact of DM on these biomarkers may be significantly

attenuated. Together, these data, along with a decrease in VEGF and NO are supportive of a significant impairment in vascular and microvascular function in HF patients, which is most likely intensified by the presence of diabetes.^{44, 45}

IL-1RA, a member of the IL-1 family, is an anti-inflammatory and anti-proliferation cytokine.⁴⁶ Here we reported a significant increase in circulating IL-1RA only in patients with HF and diabetes. The reason for this remains unclear. Nevertheless, this may be associated with an increase in inflammatory status in these high-risk patients and consequently with a reactive increase in some counteracting anti-inflammatory mediators such as IL-1RA. As such, the increased inflammatory status in patients with HF and DM may be associated with a parallel reactive increase in IL-1RA levels by the neutrophils.^{45, 47}

Patients with HF have an increasingly activated innate immune system.⁴⁸ Data from large clinical studies and some smaller mechanistic investigations have shown some abnormalities of leucocytes and neutrophils in human heart failure.^{5, 48, 49} Beyond circulating biomarkers, here we reported changes in the capability of the stimulated neutrophils to release some selected pro-angiogenic, and pro- and anti-inflammatory biomarkers in patients with HF with or without DM. Basal neutrophil-mediated VEGF release was slightly higher in HF patients when compared to CTL. However, upon stimulation with pro-inflammatory agonists, VEGF release from the stimulated neutrophils was markedly decreased in patients with HF. This latter observation is in agreement with previous reports showing an attenuation of VEGF release by diabetic cardiomyopathic animals^{50, 51} and by the neutrophils in human cardiac transplant recipients.⁵²

In this study, we further explore the impact of diabetes on neutrophils pro- and anti-inflammatory responses. Although neutrophil-mediated IL-8 release was not modulated by the presence of diabetes, HF patients with DM exhibited a higher pro and anti-inflammatory leukocyte response. Although IL-8 release was similar in both patient cohorts, LPS-induced IL-6 release was greater in HF patients with DM. IL-6 plays a pivotal role in the inflammatory response through its synthesis and secretion from the liver. In contrast, IL-8 is mostly produced by monocytes, endothelial cells and neutrophils. Since the most relevant cytokines involved in diabetes include IL-6, IL-1, IL-18

and TNF- α , the observations reported here are in agreement with a significant perturbation of IL-6 release in patients with both HF and diabetes.

Despite a significantly higher level of circulating IL-1RA, we observed a marked decrease in its release from the neutrophils harvested from patients with HF with or without DM either in basal condition or following stimulation. One explanation could be that the neutrophils from these patients are less efficient to promoting IL-1RA release, suggesting that the observed increase of circulating IL-1RA in these patients is not due to the contribution of neutrophils but most likely release by other cells such as monocytes, hepatocytes, epithelial cells and adipocytes.^{53, 54} In a previous study, we reported that the neutrophil basal release of IL-1RA from CTL was between 2-10% from its total cellular content, and even under LPS challenge the release of IL-1RA was only 35% of its total content. Thus, it is plausible that neutrophils are less efficient to induce IL-1RA synthesis or release in HF. The sub-cellular events involved with these observations would be a matter for further investigations.

Study limitations

This clinical mechanistic study consisted of a small sample size of patients with various duration and etiologies of HF. In addition, specific information on the level of congestion and hemodynamic changes and other relevant information such as the duration of diabetes and glycemic control were not readily available. The patients were enrolled only once, and the lack of follow-up did not allow for the assessment of the effects of dynamic changes in biomarkers as well as the clinical consequences of these findings. As such, this study does not support the routine use of these biomarkers in the clinical setting at the present time. Neutrophils-mediated release in selected pro- and anti-inflammatory cytokines was limited to a few agonists and selected cytokines. Other pro and anti-inflammatory cytokine such as IL-1, CCL-5 and IL-10, IL-30 and IL-33 are likely to play a significant role in this patient population and deserve further investigations.

Conclusion

HF with reduced ejection fraction is characterized by a significant increase in various pro-inflammatory markers and a decrease in circulating VEGF and IL-1RA. The release of VEGF and

other pro- and anti-inflammatory cytokines by the neutrophil is markedly abnormal in patients with chronic yet stable HF when compared with healthy controls. These observations support the significant role of neutrophils in HF and justify further studies to better understand the sub-cellular events and the clinical impacts of these findings in patients with various disease severity and HF phenotypes.

Acknowledgements

We are thankful to the volunteers for kindly providing blood samples. We thank the superb secretarial assistance of Lucie Lefebvre for the preparation and the submission of this manuscript.

Funding

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-97943 to MGS), *Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal* (FICM) (to MGS). BV was recipient of a fellowship from FRQS, MW is the recipient of the Carolyn and Richard Renaud Endowed Research Chair in Heart Failure of the Montreal Heart Institute.

Declaration of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

1. Dick SA, Epelman S. Chronic Heart Failure and Inflammation. *Circ Res* 2016;**119**:159-176.
2. White M, Cantin B, Haddad H, Kobashigawa JA, Ross H, Carrier M, Pflugfelder PW, Isaac D, Cecere R, Whittom L, Ali IS, Wang S-H, He Y, Groulx A, Touyz RM. Cardiac signaling molecules and plasma biomarkers after cardiac transplantation: Impact of tacrolimus versus cyclosporine. *J Heart Lung Transplant* 2013;**32**:1222-1232.
3. Welsh P, Kou L, Yu C, Anand I, van Veldhuisen DJ, Maggioni AP, Desai AS, Solomon SD, Pfeffer MA, Cheng S, Gullestad L, Aukrust P, Ueland T, Swedberg K, Young JB, Kattan MW, Sattar N, McMurray JJV. Prognostic importance of emerging cardiac, inflammatory, and renal biomarkers in chronic heart failure patients with reduced ejection fraction and anaemia: RED-HF study. *Eur J Heart Fail* 2018;**20**:268-277.
4. Bachschmid MM, Dupuy AM, Curinier C, Kuster N, Huet F, Leclercq F, Davy JM, Cristol JP, Roubille F. Multi-Marker Strategy in Heart Failure: Combination of ST2 and CRP Predicts Poor Outcome. *Plos One* 2016;**11**:e0157159.
5. Arruda-Olson AM, Reeder GS, Bell MR, Weston SA, Roger VrL. Neutrophilia Predicts Death and Heart Failure After Myocardial Infarction. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2009;**2**:656-662.
6. Durmus E, Kivrak T, Gerin F, Sunbul M, Sari I, Erdogan O. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Platelet-to-Lymphocyte Ratio are Predictors of Heart Failure. *Arq Bras Cardiol* 2015;**105**:606-613.
7. Hassan A, Zughul R, Villines D. Prognostic significance of Absolute Neutrophil Count in Patients with Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Asian Pac J Health Sci* 2016;**3**:104-108.
8. Uthamalingam S, Patvardhan EA, Subramanian S, Ahmed W, Martin W, Daley M, Capodilupo R. Utility of the Neutrophil to Lymphocyte Ratio in Predicting Long-Term Outcomes in Acute Decompensated Heart Failure. *Am J Cardiol* 2011;**107**:433-438.

9. Strassheim D, Dempsey EC, Gerasimovskaya E, Stenmark K, Karoor V. Role of Inflammatory Cell Subtypes in Heart Failure. *J Immunol Res* 2019;**2019**:1-9.
10. Sharma K, Patel AK, Shah KH, Konat A. Is Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio a Predictor of Coronary Artery Disease in Western Indians? *Int J Inflamm* 2017;**2017**:1-8.
11. Woitas RP, Schwab S. Neutrophil counts and their potential prognostic value in cardiovascular diseases. *J Lab Precis Med* 2017;**2**:30.
12. Pfister R, Sharp SJ, Luben R, Wareham NJ, Khaw KT. Differential white blood cell count and incident heart failure in men and women in the EPIC-Norfolk study. *Eur Heart J* 2011;**33**:523-530.
13. Mårdh CK, Root J, Uddin M, Stenvall K, Malmgren A, Karabelas K, Thomas M. Targets of Neutrophil Influx and Weaponry: Therapeutic Opportunities for Chronic Obstructive Airway Disease. *J Immunol Res* 2017;**2017**:1-13.
14. Kristensen SL, Preiss D, Jhund PS, Squire I, Cardoso JS, Merkely B, Martinez F, Starling RC, Desai AS, Lefkowitz MP, Rizkala AR, Rouleau JL, Shi VC, Solomon SD, Swedberg K, Zile MR, McMurray JJV, Packer M. Risk Related to Pre–Diabetes Mellitus and Diabetes Mellitus in Heart Failure With Reduced Ejection Fraction. *Circ Heart Fail* 2016;**9**:e002560.
15. Gerstein HC. The Hemoglobin A1c Level as a Progressive Risk Factor for Cardiovascular Death, Hospitalization for Heart Failure, or Death in Patients With Chronic Heart Failure. *Arch Intern Med* 2008;**168**:1699.
16. Maack C, Lehrke M, Backs J, Heinzl FR, Hulot J-S, Marx N, Paulus WJ, Rossignol P, Taegtmeyer H, Bauersachs J, Bayes-Genis A, Brutsaert D, Bugger H, Clarke K, Cosentino F, De Keulenaer G, Dei Cas A, González A, Huelsmann M, Iaccarino G, Lunde IG, Lyon AR, Pollesello P, Rena G, Rixen NP, Rosano G, Staels B, van Laake LW, Wanner C, Farmakis D, Filippatos G, Ruschitzka F, Seferovic P, de Boer RA, Heymans S. Heart failure and diabetes: metabolic alterations and therapeutic interventions: a state-of-the-art review from the Translational Research Committee of the Heart Failure Association–European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2018;**39**:4243-4254.

17. McHugh K, DeVore AD, Wu J, Matsouaka RA, Fonarow GC, Heidenreich PA, Yancy CW, Green JB, Altman N, Hernandez AF. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction and Diabetes. *J Am Coll Cardiol* 2019;**73**:602-611.
18. Grodin JL, Philips S, Mullens W, Nijst P, Martens P, Fang JC, Drazner MH, Tang WHW, Pandey A. Prognostic implications of plasma volume status estimates in heart failure with preserved ejection fraction: insights from TOPCAT. *Eur J Heart Fail* 2019;**21**:634-642..
19. Pitt B, Pfeffer MA, Assmann SF, Boineau R, Anand IS, Claggett B, Clausell N, Desai AS, Diaz R, Fleg JL, Gordeev I, Harty B, Heitner JF, Kenwood CT, Lewis EF, O'Meara E, Probstfield JL, Shaburishvili T, Shah SJ, Solomon SD, Sweitzer NK, Yang S, McKinlay SM, Investigators T. Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med* 2014;**370**:1383-1392.
20. Lavoie SS, Dumas E, Vulesevic B, Neagoe P-E, White M, Sirois MG. Synthesis of Human Neutrophil Extracellular Traps Contributes to Angiotensin-Mediated In Vitro Proinflammatory and Proangiogenic Activities. *J Immunol* 2018;**200**:3801-3813.
21. Cassatella MA, Östberg NK, Tamassia N, Soehnlein O. Biological Roles of Neutrophil-Derived Granule Proteins and Cytokines. *Trends Immunol* 2019;**40**:648-664.
22. Neagoe P-E, Dumas E, Hajjar F, Sirois MG. Angiotensin-1 but not angiotensin-2 induces IL-8 synthesis and release by human neutrophils. *J Cell Physiol* 2012;**227**:3099-3110.
23. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011;**11**:519-531.
24. Haddad LE, Sirois MG. Angiotensin-1 upregulates de novo expression of IL-1 β and IL-1Ra, and the exclusive release of IL-1Ra from human neutrophils. *PLoS One* 2014;**9**:e88980.
25. Zimmermann M, Aguilera FB, Castellucci M, Rossato M, Costa S, Lunardi C, Ostuni R, Girolomoni G, Natoli G, Bazzoni F, Tamassia N, Cassatella MA. Chromatin remodelling and autocrine TNF α are required for optimal interleukin-6 expression in activated human neutrophils. *Nat Commun* 2015;**6**:6061.

26. Murphy SP, Kakkar R, McCarthy CP, Januzzi JL. Inflammation in Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* 2020;**75**:1324-1340.
27. Pasini E, Aquilani R, Corsetti G, Dioguardi FS. Malnutrition and Gut Flora Dysbiosis: Specific Therapies for Emerging Comorbidities in Heart Failure. *BioMed Res Int* 2015;**2015**:1-5.
28. Pasini E, Aquilani R, Testa C, Baiardi P, Angioletti S, Boschi F, Verri M, Dioguardi F. Pathogenic Gut Flora in Patients With Chronic Heart Failure. *JACC Heart Fail* 2016;**4**:220-227.
29. Abraham D, Hofbauer R, Schäfer R, Blumer R, Paulus P, Miksovsky A, Traxler H, Kocher A, Aharinejad S. Selective Downregulation of VEGF-A165, VEGF-R1, and Decreased Capillary Density in Patients With Dilative but Not Ischemic Cardiomyopathy. *Circ Res* 2000;**87**:644-647.
30. Arakawa H. Decreased serum vascular endothelial growth factor concentrations in patients with congestive heart failure. *Heart* 2003;**89**:207-208.
31. Xu XH, Xu J, Xue L, Cao HL, Liu X, Chen YJ. VEGF attenuates development from cardiac hypertrophy to heart failure after aortic stenosis through mitochondrial mediated apoptosis and cardiomyocyte proliferation. *J Cardiothorac Surg* 2011;**6**:54.
32. Taimeh Z, Loughran J, Birks EJ, Bolli R. Vascular endothelial growth factor in heart failure. *Nat Rev Cardiol* 2013;**10**:519-530.
33. Tao Z, Chen B, Tan X, Zhao Y, Wang L, Zhu T, Cao K, Yang Z, Kan YW, Su H. Coexpression of VEGF and angiopoietin-1 promotes angiogenesis and cardiomyocyte proliferation reduces apoptosis in porcine myocardial infarction (MI) heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;**108**:2064-2069.
34. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;**380**:435-439.

35. Morine KJ, Paruchuri V, Qiao X, Mohammad N, McGraw A, Yunis A, Jaffe I, Kapur NK. Circulating multimarker profile of patients with symptomatic heart failure supports enhanced fibrotic degradation and decreased angiogenesis. *Biomarkers* 2015;**21**:91-97.
36. Paulus WJ, Tschope C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol* 2013;**62**:263-271.
37. Gimbrone MA, García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res* 2016;**118**:620-636.
38. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995;**96**:60-68.
39. Sproston NR, Ashworth JJ. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol* 2018;**9**:754.
40. Eisenhardt SU, Thiele JR, Bannasch H, Stark GB, Peter K. C-reactive protein: How conformational changes influence inflammatory properties. *Cell Cycle* 2014;**8**:3885-3892.
41. Vulesevic B, Lavoie SS, Neagoe PE, Dumas E, Rakel A, White M, Sirois MG. CRP Induces NETosis in Heart Failure Patients with or without Diabetes. *Immunohorizons* 2019;**3**:378-388.
42. Swirski FK, Nahrendorf M. Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* 2018;**18**:733-744.
43. Nymo SH, Hulthe J, Ueland T, McMurray J, Wikstrand J, Askevold ET, Yndestad A, Gullestad L, Aukrust P. Inflammatory cytokines in chronic heart failure: interleukin-8 is associated with adverse outcome. Results from CORONA. *Eur J Heart Fail* 2014;**16**:68-75.
44. Anker SD. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. *Heart* 2004;**90**:464-470.

45. Bajpai A, Tilley DG. The Role of Leukocytes in Diabetic Cardiomyopathy. *Front Physiol* 2018;**9**:1547.
46. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev* 2018;**281**:8-27.
47. Hatanaka E, Monteagudo PT, Marrocos MSM, Campa A. Neutrophils and monocytes as potentially important sources of proinflammatory cytokines in diabetes. *Clin Exp Immunol* 2006;**146**:443-447.
48. Ghaffari S, Nadiri M, Pourafkari L, Sepehrvand N, Movasagpoor A, Rahmatvand N, Rezazadeh Saatloo M, Ahmadi M, Nader ND. The predictive Value of Total Neutrophil Count and Neutrophil/Lymphocyte Ratio in Predicting In-hospital Mortality and Complications after STEMI. *J Cardiovasc Thorac Res* 2014;**6**:35-41.
49. Silvestre-Roig C, Braster Q, Ortega-Gomez A, Soehnlein O. Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation. *Nat Rev Cardiol* 2020;**17**:327-340.
50. Chou E, Suzuma I, Way KJ, Opland D, Clermont AC, Naruse K, Suzuma K, Bowling NL, Vlahos CJ, Aiello LP, King GL. Decreased Cardiac Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors in Insulin-Resistant and Diabetic States. *Circulation* 2002;**105**:373-379.
51. Han B, Baliga R, Huang H, Giannone PJ, Bauer JA. Decreased cardiac expression of vascular endothelial growth factor and redox imbalance in murine diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;**297**:H829-H835.
52. Vitiello D, Chaar D, Neagoe P-E, Ducharme A, Carrier M, Pelletier GB, Racine N, Liszkowski M, Sirois MG, White M. Decreased circulating and neutrophil mediated VEGF-A165 release in stable long-term cardiac transplant recipients. *Vasc Cell* 2015;**7**:4.
53. Arend WP. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. *Ann Rheum Dis* 2000;**59**:i60-i64.
54. Perrier S, Darakhshan F, Hajduch E. IL-1 receptor antagonist in metabolic diseases: Dr Jekyll or Mr Hyde? *FEBS Lett* 2006;**580**:6289-6294.

Figure legends

Figure 1. Measure of circulating endothelial biomarkers. Plasma from all 3 groups (healthy volunteers (CTL), HFrEF w/o DM (HFrEF) and HFrEF with DM (HFrEF+DM)) was analyzed by ELISA for NO (Nitrite/Nitrate) and by Luminex multiplex for sICAM-1, VCAM-1 and E-Selectin. (A) Plasmatic NO from all HFrEF patients decreased significantly, compared to healthy volunteers (CTL). On the other hand, all soluble adhesion molecules (sICAM-1 (B), sVCAM-1 (C) and sE-Selectin (D)) increased in all HFrEF patients, compared to CTL. Data are presented as medians and IQR. *P<0.05 and ***P<0.001 as compared to CTL.

Figure 2. Measure of circulating inflammation biomarkers. Plasma from all 3 groups (healthy volunteers (CTL), HFrEF w/o DM (HFrEF) and HFrEF with DM (HFrEF+DM)) was analyzed by ELISA for VEGF, IL-8, IL-6 and IL-1RA and by nephelometry for CRP. (A) Plasmatic VEGF from all HFrEF patients decreased significantly, compared to healthy volunteers (CTL). (B) Plasmatic CRP, (C) IL-8 and (D) IL-6 were significantly increased in both HFrEF and HFrEF+DM patients compared to CTL, whereas plasmatic IL-1RA was increased significantly only in HFrEF+DM patients, compared to CTL. HFrEF+DM had a significantly higher plasmatic concentration of (C) IL-8, (D) IL-6 and (E) IL-1RA, compared to HFrEF. Data are presented as medians and IQR. *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001 compared to CTL. ††† P<0.001 compared to HFrEF.

Figure 3. Effect of TNF- α and LPS on the release of inflammation biomarkers by human neutrophils. Isolated neutrophils from all 3 groups (healthy volunteers (CTL), HFrEF w/o DM (HFrEF) and HFrEF with DM (HFrEF+DM)) were stimulated with TNF- α (10 ng/mL) or LPS (1 μ g/mL) for 2 hours and released VEGF, IL-1RA, IL-8 and IL-6 were quantified by DuoSet ELISA. Neutrophils from CTL have seen their release of (A) VEGF, (B) IL-1RA and (C) IL-8 significantly increased following TNF- α and LPS stimulation. In all HFrEF groups, (A) VEGF and (B) IL-1RA release was lower, whereas (C) IL-8 release was significantly increased, compared to CTL. The release of IL-6 from neutrophils (D) was only achieved by LPS stimulation and it was significantly increased in HFrEF+DM, when compared to CTL and HFrEF. Data are presented as mean \pm SEM. **P<0.01 and ***P<0.001 compared to respective PBS. †††P<0.001 compared to CTL. ###P<0.001 compared to HFrEF.

Figures

Figure 1

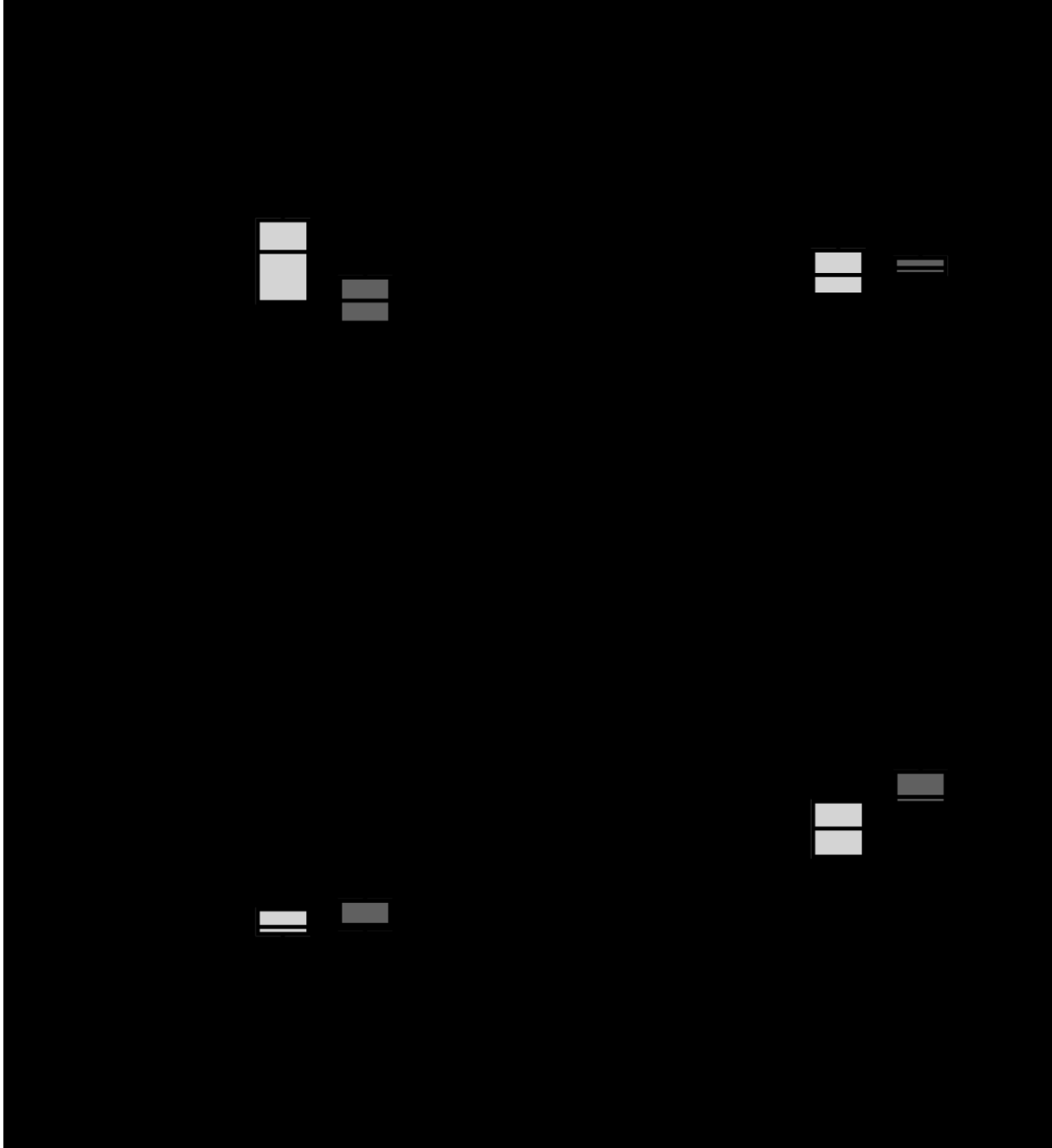


Figure 2

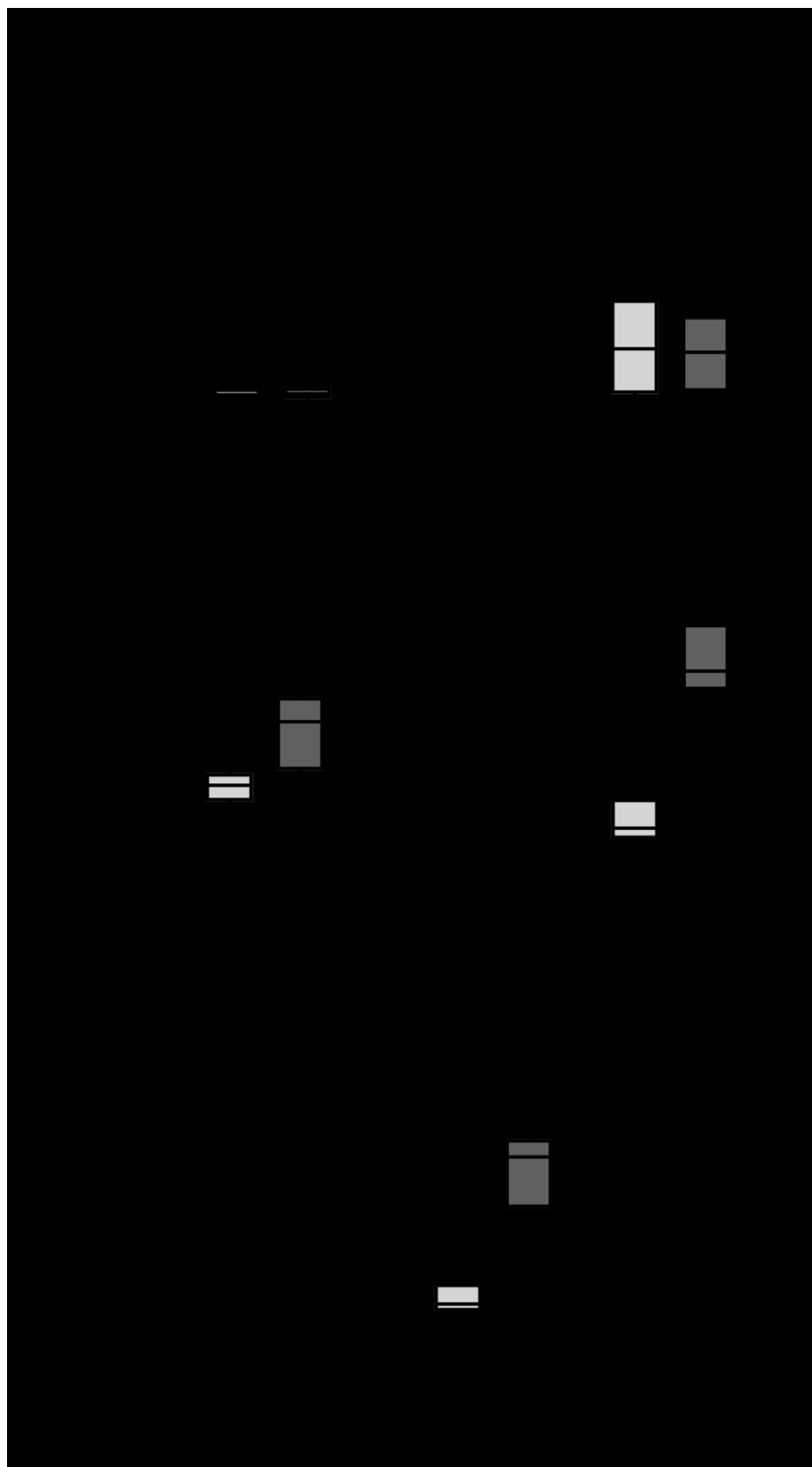
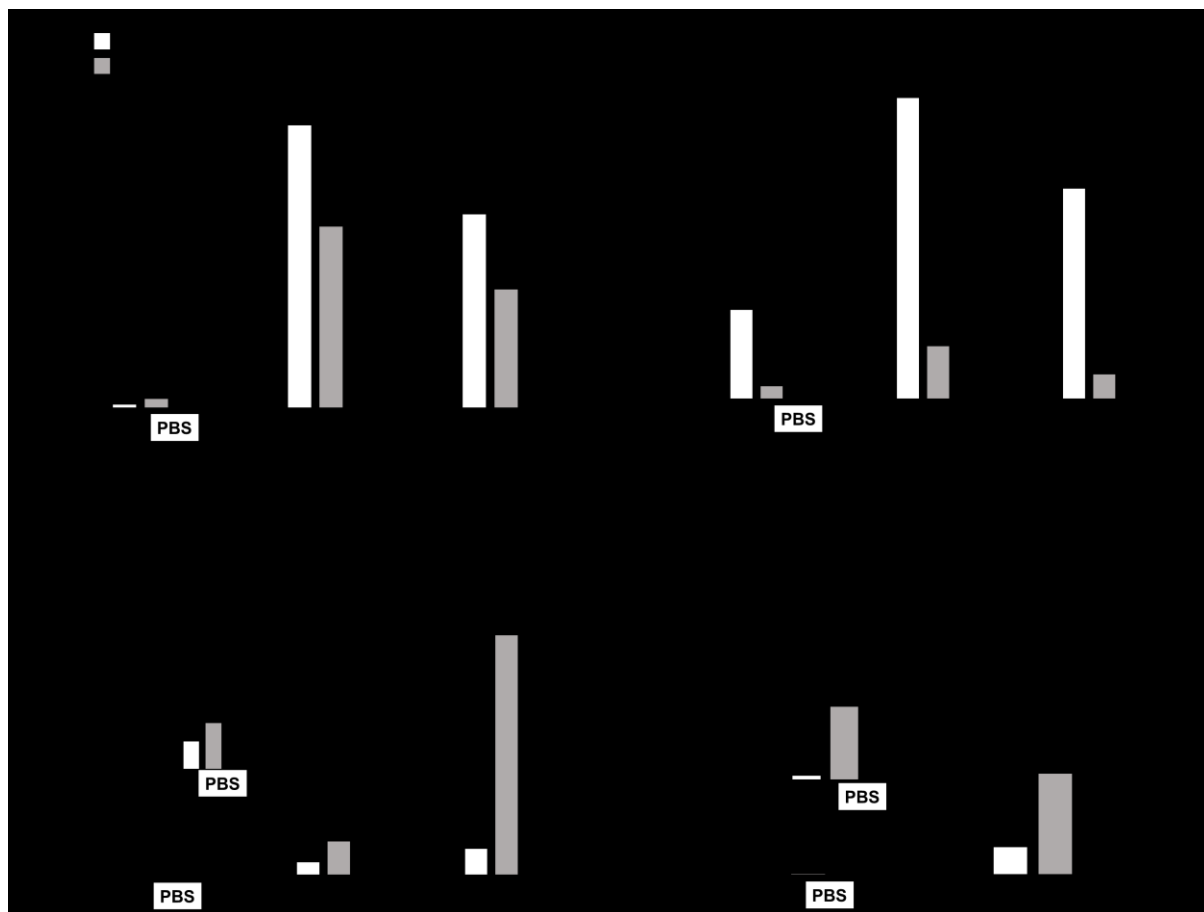


Figure 3



Tables

Table 1 Patient's demographics

	CTL	HFrEF	HFrEF+DM	<i>P value</i>
Age (years)	44.9±2.71	68.89±2.51	68.68±2.18	<0.001
Male	14 (66.6 %)	19 (70.4 %)	21 (84.0 %)	0.36
NYHA class				0.39
II	-	11 (40.7 %)	7 (28.0 %)	
III	-	16 (59.3 %)	18 (72.0 %)	
HFrEF duration (months)		77.00±15.52	88.28±16.70	0.62
Etiology				0.87
Ischemia	-	20 (74.1 %)	18 (72.0 %)	
Cardiomyopathy	-	4 (14.81 %)	2 (8.0 %)	
Valvular	-	1 (3.7 %)	1 (4.0 %)	
Others	-	2 (7.4 %)	4 (16.0 %)	
LVEF	-	30.15±1.39	27.08±1.21	0.10
LVIDD	-	60.96±1.75	61.12±1.71	0.95
LVIDS	-	50.25±2.36	49.71±2.01	0.86
Hypertension	-	15 (55.5 %)	24 (96.0 %)	<0.001
Dyslipidemia	-	21 (77.8%)	22 (88.0 %)	0.47
Stroke	-	3 (11.1%)	4 (16.0 %)	0.70
Hematology & Biochemistry				
Hemoglobin (g/L)	-	132.19±2.09	127.52±2.89	0.19
Leucocytes (x10 ⁹ /L)	-	7.75±0.43	7.96±0.34	0.71
Na (mmol/L)	-	137.62±0.61	137.12±0.63	0.57
K (mmol/L)	-	4.34±0.07	4.48±0.09	0.22
Urea (mmol/L)	-	11.58±1.10	11.36±0.90	0.88
Creatinine (µmol/L)	-	139.22±11.4	128.76±8.20	0.47
NT-proBNP	-	2754±567	2490±651	0.76
Medication				
ACEi	-	16 (59.3 %)	16 (64.0 %)	0.78
ARB	-	9 (33.3 %)	15 (60.0 %)	0.09
β-blockers	-	27 (100 %)	24 (96.0 %)	0.48
Diuretic agent	-	27 (100 %)	23 (92.0 %)	0.23
Statin	-	19 (70.4 %)	20 (80.0 %)	0.53
Anti-platelets	-	24 (88.9 %)	24 (96.0 %)	0.61
Metformin	-	-	8 (32.0 %)	
Sulfonylureas	-	-	8 (32.0 %)	
α-glucosidase inhibitors	-	-	-	
DPP-4 inhibitor	-	-	6 (24.0 %)	
GLP-1 agonist	-	-	1 (4.0 %)	
SGLT2 inhibitor	-	-	-	
Insulin	-	-	7 (28.0 %)	

ACEi, angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin receptor blocker; CTL, healthy controls; DM, type-2 diabetes mellitus; DPP-4, dipeptidyl peptidase 4; GLP-1, glucagon-like peptide 1; HFrEF, heart failure with reduced ejection fraction; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVIDD, left ventricular internal diameter end diastole; LVIDS, left ventricular internal diameter end systole; NYHA, New York Health Association; SGLT2, sodium-glucose co-transporter-2.

Continuous variables are shown as mean \pm standard error mean and categorical variables as number (%). Anti-platelets included aspirin, clopidogrel, prasugrel, or ticagrelor or a combination of these.

Response to reviewers

Dear Dr White,

Reviewers have now commented on your paper. You will see that they are advising that you revise your manuscript. We would consider it again if you could respond to the points that have been raised during the review process.

The reviewers' comments can be found at the end of this email or can be accessed by following the provided link.

This is your login information:

Your username is: m_white@icm-mhi.com

<https://www.editorialmanager.com/eschf/l.asp?i=95566&l=CMESZIOX>

To revise your manuscript, go to <https://www.editorialmanager.com/eschf/> and log in as an Author. You will see a menu item called 'Submissions Needing Revision'. You will also find your submission record there.

When revising your work, please submit a list of changes or a rebuttal against each point which is being raised when you submit the revised manuscript. Please make all changes in red and bold font (If you utilize the Track Changes for Word please accept all changes before saving). Please note that you should ensure the revised manuscript is complete, ie. it should include THE FULL TEXT, TITLE PAGE, ABSTRACT, ALL FIGURES, ALL TABLES AND LEGENDS. As this may be the finally accepted version to be sent to the type-setters you should ensure the figures are print quality and you should proof-read and check the quality of all components of the paper after it has been up-loaded.

Your revision is due by 05 Jun 2021.

Please make sure to submit your editable source files (i. e. Word, Text).

Unless we hear from you about this paper before 05 Jun 2021, we will presume you have withdrawn the manuscript from consideration for publication in ESC Heart Failure.

Yours sincerely,

Stephan von Haehling, MD PhD
Editor-in-Chief
ESC Heart Failure

Editorial comments:

The authors are required to pay particular attention to preparing their abstract as this is a reflection of their work and may be the only part that is read by some readers. Abstracts should be prepared in accordance with author guidelines. Authors are encouraged to check their abstract again whether the key messages are presented including important facts and figures, standard deviations and p-values supporting these messages. If in doubt, add more data rather than less. Please omit all "filling words"

used for style such as "thus", "therefore", "moreover" and the like. In addition, we ask you to pay particular attention for the abstract to be straight and to the point as well as in a correct English. Editors will check the abstract quality prior to final acceptance and may ask the authors to adjust according to the above criteria.

Answer: We have re-revised the abstract based on the suggestions outlined above. This section has been specifically reviewed by a native English speaker/writer (Dr Bruce Allen) to insure the correctness of the written English.

Reviewers' comments:

Reviewer #1: Reviewer comment

The authors adequately responded to the criticisms raised upon the previous review. The manuscript has been substantially improved. I have no further comments.

Answer: Many thanks

Reviewer #2: Chaar et al. significantly improved the manuscript. However, several issues remain.

Major issues

1. Statistics

Data are presented as mean \pm SEM and are evaluated by ANOVA > this implies Gaussian distribution. I really doubt that levels of cytokines follow Gaussian distribution.

Please confirm whether the distribution of presented parameters follow Gaussian distribution or re-analyze the results using non-parametric method (+ report non-parametrically, e.g. median \pm IQRs)

Answer: The statistics have been redone as suggested above. First, we tested for the circulating biomarkers normal distribution using the Shapiro-Wilk test and found that they were not normally distributed (non-Gaussian distribution). Therefore, we changed the initial ANOVA test followed by Bonferonni's t-test by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test, which is used for non-Gaussian distributed data statistical analyses. The graphs presentation in Figure 1 and Figure 2 were changed from bar graphs representing the mean \pm SEM to box and whiskers graphs representing the median \pm min to max. The new statistical significances were inserted in Figures 1 and 2. In the manuscript, we changed all values from Figures 1 and 2 from mean \pm SEM to median \pm IQR.

2. Figure 3

Authors evaluate the effect of 2 independent processes- HF and DM > in this case, 2-way ANOVA should be employed.

Answer: We thank the reviewer for this suggestion. As requested, the statistical analyses for Figure 3 have been re-computed using a 2-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparisons test. The new statistical significances were inserted in Figure 3 and corrected in the manuscript text accordingly.

3. Results

There was a higher proportion of patients with hypertension amongst patient with diabetes. (Text >Results) No p-values are given in Table 1.

I would assume p-values CTL vs. HF and HF vs. HF+DM should be given.

No hemoglobin, leu etc. is provided for controls.

Answer: We now provide p value for between group differences for patients with HF. Statistical analyses for continuous variables were done using either a one-way ANOVA or Student's t-test, whereas categorical variables were compared using a χ^2 test or a Fisher's exact test. The controls have consented for the neutrophils studies only. As such, other hematologic or biochemical analyses are not available. Please note that none of these controls had known medical condition nor were treated by any medication. Therefore the probability than any hematologic and/or other medical condition may have interfere with our observations is very low.

Minor issues

1. As already pointed out in the previous version of the manuscript:

- what is A-II modulating agents? (Methods), please explain
- in discussion, authors say they report a profound decrease in the circulating levels of VEGF in HF patients with advanced yet stable disease. Again, is your manuscript about "advanced HF"? If not, please delete.

Answer: A-II modulating agents include angiotensin converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers. As suggested we have deleted the wording "advanced".

2. Multiple grammatical errors

- neutrophil blood count has not only BEEN shown....(missing BEEN) - Introduction
- conformS (missing S) (Methods)
- ...IL-8 were significantly increaseD (not increases, Discussion)
- 3rd page of Discussion- Lines 10, 14 and 17- neutrophil should be replaced by neutrophils.
- 3rd page of Discussion- line 19- VEGF release IN diabetic cardiomyopathic animals

Answer: We have reviewed the manuscript and made the suggested changes

3. Discussion, 3rd page, last paragraph

Although IL-8 mediated neutrophil release..... is it IL-8 mediated neutrophil release or neutrophil-mediated IL-8 release?

Answer: We have revised the manuscript. The correct wording is: "neutrophil-mediated IL-8 release"

4. Results, last paragraph

This paragraph is difficult to read. There seems to be no significant difference between HFrEF and HFrEF+DM upon stimulation. If I am not mistaken (Fig3), the only difference between HFrEF and HFrEF+DM is when stimulated by placebo/PBS (Fig 3 B/C).

If so, I suggest to rephrase the paragraph, e.g.- At baseline, higher secretion of IL-1RA and IL-8 was observed in HFrEF+DM compared to HFrEF. Upon stimulation, both HF groups (without/with DM) showed similar response to stimulation.....

2-way ANOVA will show whether there is an interaction for DM or not.

Answer: As suggested, this section has been meticulously revised in this new version of the manuscript.

5. Methods

Hb1Ac- please report mmol/mol as well as %

DO WE HAVE THOSE?

Answer: We indicated in the Methods section, the equivalent mmol/L for % as follows: HbA1c <10% (13.4 mmol/L)

Chapitre 3 – Neutrophils and circulating pro- and anti-inflammatory biomarkers in diabetes and heart failure with preserved ejection fraction

Cet article a été soumis dans la revue ESC Heart Failure

Diana Chara^{1,2}, Benjamin Dumont^{1,3}, Branka Vulesevic¹, Paul-Eduard Neagoe¹, Agnes Rakel^{2,4},
Michel White^{1,2*} and Martin G. Sirois^{1,3*}

¹Research center, Montreal Heart Institute, Montreal, QC, Canada, Departments of medicine², pharmacology and physiology³, Faculty of medicine, and ⁴Research Center - Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

Word count: 3164 (text only)

*Corresponding co-senior authors: Michel White and Martin G. Sirois

Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger St., Montreal, QC, Canada, H1T 1C8.

Tel: 514-376-3330 (ext. 3583)

Fax: 514-376-1355

E-mail: m_white@icm-mhi.com

E-mail: martin.sirois@icm-mhi.org

Abstract

Aim: Heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) is characterized by low-grade chronic inflammation and endothelial dysfunction. Mounting evidences suggest that the presence of type 2 diabetes (DM) could exacerbate HF inflammatory condition. We hypothesized that neutrophils in DM and in HFpEF with/without DM patients contribute to the generation of persistent inflammation.

Methods and results: A total of 22 patients with DM, 15 HFpEF and 13 HFpEF+DM patients and 21 healthy controls (CTL) were studied. Venous blood samples from patients and CTL were collected once. Levels of pro- and anti-inflammatory cytokines found in plasma and produced by the neutrophils from these patients and CTL were assessed by ELISAs. Plasma biomarkers including nitric oxide (NO), soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1) and E-Selectin (sE-Sel), vascular endothelial growth factor (VEGF), C-reactive protein (CRP), interleukins (IL)-6, IL-8 and IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) were measured by ELISAs. Neutrophils were isolated and stimulated with control vehicle (PBS), tumor necrosis factor- α (TNF- α) or bacterial lipopolysaccharide (LPS) to promote VEGF, IL-6, IL-8 and IL-1RA release.

Compared with CTL, patients with DM, HFpEF and HFpEF+DM yielded a significant decrease in circulating NO (45.2 (IQR 42.3; 57.6) vs 29.1 (IQR 20.1; 33.8), 33.8 (IQR 32.0; 37.8) and 25.2 (IQR 22.6; 28.2) μmol , $P \leq 0.001$). Compared with CTL, circulating VEGF level was similar in DM patients (178.0 (IQR 99.6; 239.2) vs 184.7 (IQR 121.1; 322.0) pg/mL , $P > 0.999$), whereas it was significantly decreased in HFpEF patients with/without DM (10.2 (IQR 6.2; 13.2) and 12.0 (IQR 6.7; 12.8), $P \leq 0.001$). All other circulating pro- and anti-inflammatory cytokines (CRP, IL-6, IL-8 and IL-RA) were increased either in DM, HFpEF and/or HFpEF+DM. Neutrophils from DM and HFpEF+DM patients stimulated with either TNF- α or LPS induced a higher release of IL-6 (LPS: 46.7 \pm 3.9 [CTL] vs 134.4 \pm 80.9 [DM], $P = 0.094$ and 170.5 \pm 29.3 pg/mL [HFpEF+DM], $P \leq 0.001$) and IL-8 (TNF- α : 0.60 \pm 0.08 [CTL] vs 1.59 \pm 0.14 [DM], $P = 0.889$ and 2.14 \pm 0.26 ng/mL [HFpEF+DM], $P = 0.625$; LPS: 1.18 \pm 0.06 [CTL] vs 4.23 \pm 0.16 pg/mL [DM], $P \leq 0.001$ and 11.87 \pm 2.51 pg/mL [HFpEF+DM], $P \leq 0.001$).

In contrast, IL-1RA and VEGF release were significantly attenuated by up to 87.0% and 92.2% respectively in HFpEF compared with CTL.

Conclusions: Patients with either DM or HFpEF exhibit low-grade inflammation and neutrophils-mediated cytokines. These abnormalities can be amplified by the coexistence of both diseases.

Keywords: Heart failure; Diabetes; Neutrophil; Inflammation; Cytokines

Introduction

Heart failure (HF) is a complex disease accounting for a high rate of morbidity, hospitalizations and premature mortality ^{1, 2}. HF characterization is based on left ventricular ejection fraction (LVEF), either reduced (HFrEF, LVEF \leq 40%) or preserved (HFpEF, LVEF \geq 50%), both having distinct phenotypes ²⁻⁴. The pathophysiology of HFrEF is often consecutive to a direct injury of the myocardium (myocardial infarction) or a chronic disease state (hypertension), leading to cardiomyocyte cell death and reduced ventricles contractile capacity ⁴. In contrast, the HFpEF phenotype is characterized by multiple comorbidities including obesity, hypertension and type 2 diabetes mellitus (DM) that synergize to induce a low-grade chronic systemic inflammation ^{5, 6}.

The coexistence of DM and/or glucose dysregulation nearly reaches 50% in patients with HF-pEF. These patients are characterized by multimorbidity, increased inflammation, greater intravascular volume, increased hypertrophic remodeling, impaired chronotropic reserve, and presumed abnormalities in the periphery ⁷. Collectively, these and other factors predispose patients with diabetes mellitus to worse quality of life, worse exercise capacity, increased hospitalizations, and increased mortality, making them a higher risk subgroup of patients with HFpEF.

Patient-specific circulating biomarker measurements are useful for the purpose of monitoring disease severity and progression, to guide therapy, but also for characterizing the pathophysiology of HF ⁸⁻¹¹. Some of these pro-inflammatory biomarkers (e.g. interleukin-6; IL-6, tumor necrosis factor alpha; TNF- α and C-reactive protein; CRP) are higher and more predictive in HFpEF compared to HFrEF ¹²⁻¹⁴.

HFpEF patients have also elevated circulating levels of neutrophils and classical, intermediate, and non-classical monocytes, while circulating lymphocytes are not affected ^{15, 16}. This increase in circulating neutrophils is associated with a higher risk of cardiovascular events, incidence of acute decompensated heart failure (ADHF) and mortality rate in HF patients ¹⁷⁻²³. Although neutrophils are the most abundant type of white blood cell in the human circulation and the principal cell type during acute inflammatory reactions, they have, until 10 years ago, received only limited

attention in the context of cardiovascular inflammation ^{24, 25}. Thus, the understanding of neutrophil's activation and regulation in HFpEF patients is needed.

The primary objective of this study was to investigate the changes in selected biomarkers and the potency of isolated neutrophils to release pro- and anti-inflammatory cytokines in patients with HFpEF. The secondary objective of this investigation was to study the impacts of DM with or without HFpEF on these findings.

Methods

Population

The design of this mechanistic clinical study was a prospective non-randomized non-interventional investigation. This study enrolled patients with preserved ejection fraction (pEF) with or without DM. In addition, patients diagnosed with DM without any heart structural condition and healthy controls (CTL) without any CV condition were recruited. Fifteen (15) patients with HF and thirteen (13) patients with HF plus DM were recruited from the Heart Function Clinic at the Montreal Heart Institute (MHI). Twenty-two (22) DM patients with no symptoms or signs of HF and with no known structural heart disease were recruited from the *Clinique d'Endocrinologie de Montréal*. The blood collection from all patients (50) and the twenty-one (21) CTL was performed at the MHI. This study was approved by the Scientific Research Committee and the Ethics Committee of the MHI (ethics No. ICM #01-406 and No. ICM #12-1374) and conform to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Donors were informed about the procedures and signed a written informed consent before participating in the study. Data from the healthy volunteers were previously reported in a publication under review (with permission of European Society of Cardiology – Heart Failure).

Selection criteria of healthy control volunteers and patients

Healthy controls recruited in this study were enrolled assuming they had no significant medical conditions and were not treated by any anti-inflammatory medication for at least 14 days before blood collection. Patients with DM alone had an HbA1c <10% and no clinical evidences of structural heart disease. These DM patients were controlled by any available oral hypoglycemic medications and, as per guidelines and treated with preventive hypertension medication. HF patients with NYHA classification 2 or 3 symptoms were deemed eligible. These patients were classified as HFpEF if they presented with symptoms and signs of HF, had a LVEF \geq 50% assessed by echocardiography, MRI, or nuclear ventriculography completed within the preceding 12 months (European and Canadian Societies of Cardiology guidelines)^{2, 26}. These patients were optimally treated as per current guidelines^{27, 28}. In addition to the previous inclusion criteria outlined above, patients with HFpEF+DM required an HbA1c <10% and good glycemic control by

any available hypoglycaemic medications. The most significant exclusion criteria included the presence of severe chronic pulmonary disease, chronic active inflammatory disease, severe renal failure (creatinine >250 µmol/L), liver dysfunction (transaminases ≥3-fold upper normal values), and ongoing malignancy. Other exclusion criteria included recent stroke or recent myocardial infarction (<1 month) cardiac surgery (<3 months), HF functional NYHA class IV and/or clinically assessed as unstable, HV, DM, and HFpEF with or without DM patients having ongoing and/or recent infection within 2 weeks prior to the study (as this would affect neutrophil counts) or had CRP values higher than 25 mg/L (suggesting potential acute unrelated inflammatory status) were excluded from this study.

Study protocol – plasma, serum and neutrophil collection

Venous blood samples from CTL, DM and HFpEF with or without DM patients were collected in one SST serum separation tube (3.5 mL blood volume) and in 30-mL syringes pre-filled with the anticoagulant citrate Dextrose solution USP (ACD) Formula A (ratio ACD: blood 1:5; 45 mL blood volume). Following a 200 g centrifugation of the anticoagulated blood, 4 mL of platelet-rich plasma (PRP in ACD) were re-centrifuged (11000 g, 2 min, 4°C) to obtain citrate platelet-free plasma (PPF). The SST tube was also centrifuged (1500 g, 15 minutes, RT) to obtain serum, and all serum and plasma samples were aliquoted and frozen at -80°C. Neutrophils were isolated by Dextran sedimentation followed by Ficoll-Paque density gradient and re-suspended in RPMI medium supplemented with 25 mM HEPES and 1% penicillin/streptomycin as described previously²⁹. Contamination with peripheral blood mononuclear cells was <0.1% as determined by morphological analysis and flow cytometry (data not shown), and viability was >98% (Trypan blue dye exclusion)²⁹. Pure neutrophil population (>99% purity) was used for all *in vitro* studies.

Biomarkers quantification

Plasma levels of interleukin (IL)-1 receptor antagonist (IL-1RA), IL-6, IL-8 and total nitric oxide (NO) and serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) were analyzed by Quantikine ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). The plasmatic levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1) and E-Selectin (sE-Sel) were analyzed by a Luminex Assay multiplex kit using the Bio-Plex 200 analyzer (Bio-Rad Laboratories, Saint-

Laurent, QC). High-sensitivity CRP (hsCRP) in serum samples was quantified by nephelometry by the Clinical Biochemistry Laboratory at the MHI.

Neutrophil stimulation and treatments

Purified neutrophils ($5 \times 10^6/\text{mL}$, 500 μL) were incubated in RPMI – 1640 solution (Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 5% fetal bovine serum (PAA laboratories, Etobicoke, ON, Canada) 1% penicillin/ Streptomycin/ Glutamax (P/S) (Gibco) and 25 mM HEPES (Sigma, Oakville, ON, Canada), and termed RPMI (for complete RPMI-1640 solution). Neutrophils were then stimulated for 2 hours with control vehicle (PBS), tumor necrosis factor- α (TNF- α ; 10 ng/mL) (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) or bacterial lipopolysaccharide (LPS; Escherichia Coli 0111:B4; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma) at 37°C, 5% CO₂. Upon stimulation, neutrophils were centrifuged at 900 g for 7 minutes and supernatants stored at -80°C. The selected aforementioned agonists (LPS or TNF- α) were used based on their corresponding capacity to promote VEGF, IL-1RA, IL-6 and IL-8 release by the neutrophils^{30, 31}.

Statistical analysis

Continuous variables are presented as mean \pm SEM (normally distributed data) or as medians and IQR and categorical values as proportions (%). Statistical comparisons were made using a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Tukey's multiple comparison test (normally distributed data) or using a Kruskal-Wallis test, followed by a Dunn's multiple comparisons test. For Table 1, continuous variables were compared using either a one-way ANOVA or Student's t-test, whereas categorical variables were compared using a χ^2 test or a Fisher's exact test. Analyses were performed using GraphPad Prism 9.1.0 and differences were considered significant at $P \leq 0.05$.

Results

The clinical characteristics of the study population are presented in *Table 1*. The study population consisted of 21 healthy controls (CTL), 22 patients with DM, 15 patients with HFpEF without DM and 13 HFpEF patients with DM. About half of the patients had HF caused by ischemic heart disease. Most HFpEF with or without DM were diagnosed with hypertension and dyslipidemia. There was no significant difference in LVEF between patients with/without DM, although HFpEF+DM had a significant higher LV size than HFpEF without DM patients. By the time of recruitment in this study, only a few patients were treated with a sGLT2 inhibitor. The groups of patients with DM and HFpEF with/without DM were significantly older than the CTL group. Both HF groups were significantly older than the CTL group. Pearson correlation analysis showed no significant correlation between all circulating biomarkers (except for CRP) and age for CTL.

The results for the circulating levels of selected biomarkers are presented in *Figures 1 and 2*. Patients with DM and HFpEF with or without DM presented a significant decrease of circulating levels of nitric oxide (NO) as compared to CTL. In addition, the decrease of circulating NO levels in HFpEF+DM was even more important as compared to HFpEF alone (*Figure 1*). Patients with DM and both HFpEF and HFpEF+DM had significant increase of their circulating levels of sICAM-1, whereas only HFpEF with or without DM had a significant increase of sVCAM-1, There was a significant increase in sE-Sel only for HFpEF+DM patients (*Figure 1*).

Figure 2 presents the circulating levels of pro- and anti-inflammatory cytokines for the study population. Compared with CTL, circulating VEGF level was similar in DM patients, whereas it was markedly decreased by 94.3% in HFpEF patients with/without DM (*Figure 2A*). hsCRP levels were increased (but not significantly) in DM patients, whereas it was significantly increased in HFpEF patients with/without DM (*Figure 2B*). Patients with HFpEF+DM exhibited a significant increase in circulating levels of IL-8 and IL-6 as compared to HFpEF alone (*Figure 2C and D*). In addition, we observed a significant elevation of the circulating levels of the anti-inflammatory cytokine IL-1RA in DM and both HFpEF and HFpEF+DM patients compared with CTL (*Figure 2E*).

Effect of pro-inflammatory agonists on the release of selected cytokines by neutrophils

We assessed the capacity of selected pro-inflammatory agonists to induce the release of cytokines known to be expressed and released by human neutrophils³¹⁻³³. We assessed the effect of a 2-hr treatment with either TNF- α (10 ng/mL) or LPS (1 μ g/mL) compared to PBS-control vehicle to induce the release of VEGF, IL-1RA, IL-6 and IL-8 by neutrophils (5×10^6 /mL, 500 μ L) (*Figure 3*). Under basal condition (PBS), there was an increase of the release of VEGF in DM patients, IL-6 in HFpEF and HFpEF+DM, and a decrease in the release of the anti-inflammatory IL-1RA by the neutrophils from DM and both HFpEF and HFpEF+DM patients compared to neutrophils from CTL (*Figure 3A-D*).

A treatment with either TNF- α (10 ng/mL) or LPS (1 μ g/mL) increased the release of VEGF, IL-8 and IL-1RA from the neutrophils of CTL, T2DM, HFpEF and HFpEF+T2DM patients, and only LPS induced IL-6 release (*Figure 3A-D*). As compared to CTL, neutrophils from DM patients induced a lower release of VEGF by 29.9% following LPS stimulation. Similarly neutrophils from both HFpEF and HFpEF+DM showed a significant reduced capacity by up to 77.0% (under TNF- α treatment) and 92.2% (under LPS treatment) to release VEGF when compared to CTL (*Figure 3A-B*).

The capacity of neutrophils from DM patients to release IL-1RA was attenuated in the basal state (PBS) and was reduced significantly by 78.8% and 73.9% under TNF- α or LPS stimulation respectively compared to CTL (*Figure 3A-B*). Neutrophils from both HFpEF and HFpEF+DM exhibited similar potency to increase IL-1RA release in response to TNF- α or LPS, but showed also a reduced capacity to release IL-1RA by up to 87.0% as compared to CTL (*Figure 3A-B*).

Neutrophils from DM patients were more potent than CTL neutrophils to promote IL-8 release by 2.6-fold and 3.5-fold following TNF- α and LPS challenge respectively (*Figure 3C*), and neutrophils from HFpEF patients promoted IL-8 release similarly to neutrophils from CTL. However, we observed a significant synergistic capacity of the neutrophils from HFpEF+DM to promote the release of IL-8, which was increased by 3.5-fold (under TNF- α treatment) and 9.9-fold (under LPS treatment) as compared to neutrophils from CTL (*Figure 3C*).

Similarly, neutrophils from DM patients were also more potent than CTL neutrophils to promote IL-6 release by 2.9-fold upon LPS challenge (*Figure 3D*). IL-6 release from neutrophils of HFpEF patients was not significantly different from CTL, however, we observed a significant increase on the capacity of the neutrophils from HFpEF+T2DM to promote IL-6 release, which was 3.6-fold higher (under LPS treatment) as compared to neutrophils from CTL (*Figure 3D*).

Discussion

In the current study, we observe a marked decrease of circulating VEGF in HFpEF patients with/without DM, concomitant with a reduced capacity of their neutrophils to release VEGF. We also observe a significant reduction of circulating NO in DM and HFpEF patients, which is even more pronounced in HFpEF+DM patients. There is a marked increase of circulating endothelial biomarkers (sICAM-1 and sVCAM-1) in all HFpEF patients, there is an increase of circulating pro-inflammatory (IL-6, IL-8) and anti-inflammatory (IL-1RA) interleukins which is maximal in HFpEF+DM patients. Under basal conditions, neutrophils from HF patients were primed to release IL-6. Patients with both HFpEF and diabetes exhibited a greater response to LPS for IL-6 and IL-8 release, whereas their neutrophils were less efficient to release IL-1RA following LPS or TNF- α stimulation.

Non-cardiac comorbidities including obesity, hypertension and DM are highly prevalent in HFpEF. All these comorbidities have the ability to induce a systemic inflammatory state, promoting coronary microvascular rarefaction, reduced myocardial capillary density, and impairment of angiogenesis, which are all major factors participating in HFpEF development and progression. Microvascular rarefaction reduces endothelial nitric oxide synthase (eNOS), lowers nitric oxide (NO) bioavailability to the cardiomyocytes, both being exacerbated by excessive production of reactive oxygen species (ROS)^{34,35}, resulting in cardiomyocytes stiffness, cardiac hypertrophy and HFpEF^{34, 36-39}.

In our study, we observed a marked reduction of circulating NO metabolites in both DM and HFpEF patients. The magnitude of decrease was the highest in patients with HFpEF and DM. In addition, this reduction in circulating NO levels was even more important in HFpEF and HFpEF+DM patients when compared to both HFrEF and HFrEF+DM patients (Chaar et al., submitted manuscript). Here we report a significant decrease by 93.6% of circulating levels of VEGF. The magnitude of decrease in VEGF was in concordance with a significant reduction in the capacity of the neutrophils from HFpEF and even more so, from HFpEF+DM neutrophil to release VEGF (up to 92.2% reduction). Our data are in agreement with previous studies in which a decrease of circulating VEGF has been reported in animal models of heart failure.^{40, 41} and in

neutrophils from human cardiac transplant recipients⁴². In the initial phase of HF, an increase of VEGF is observed in the myocardium, however, the exhaustion of VEGF release during prolonged hypoxia has been proposed as an important underlying factor contributing to a decrease of myocardial capillary density and decompensated heart failure^{40, 43, 44}. Since VEGF stimulates endothelial NO synthesis⁴⁵⁻⁴⁷, a decrease in circulating VEGF levels concomitantly with a decrease in NO formation⁴⁸ is causing coincidental endothelial dysfunction with hypertension.⁴⁹ Together, these data support that a lower VEGF-mediated NO synthesis could be crucial for the development of HFpEF.^{50, 51}

In our study, we observed a significant increase of soluble endothelial adhesion molecules (sICAM-1) in DM, HFpEF and HFpEF+DM and sVCAM-1 in HFpEF and HFpEF+DM.⁵² This is in-line with previous studies showing that an impaired synthesis and release of VEGF and NO induces the expression and translocation of endothelial adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and E-Sel)⁵³⁻⁵⁵, favouring the activation and subendothelial migration of circulating leukocytes, LV remodeling, collagen deposition by myofibroblasts and diastolic LV dysfunction, the major cardiac functional deficit in HFpEF⁵⁶⁻⁵⁸. We also observed that when diabetes was present along with HFpEF condition, both IL-6 and IL-8 concentrations were synergistically increased. These observations are in agreement with our previous work and other independent studies, reporting that IL-6 and IL-8 play a significant role in both HF and diabetes^{5, 59, 60}.

In this study, we reported a significant increase of the circulating anti-inflammatory and anti-proliferation cytokine IL-1RA, a member of the IL-1 family⁶¹ in all patient's cohorts (DM, HFpEF and HFpEF+DM). Our data are in agreement with the Whitehall II prospective cohort study, in which, IL-1RA elevation was observed up to 13 years prior to DM onset, followed by a steep increase at the time of DM diagnosis⁶². In HF patients, one study reported that circulating IL-1RA level was increasing with the severity of HF symptoms^{63, 64}. Interestingly, despite a significantly higher level of circulating IL-1RA, we observed a marked decrease in its release from the neutrophils harvested from patients with DM, HFpEF with or without diabetes, both under basal condition and following stimulation. In previous studies, using neutrophils from healthy volunteers, IL-1RA was constitutively expressed intracellularly and was not completely released even upon stimulation with pro-inflammatory agonists^{33, 65, 66}. To the best of our knowledge, our

study is the first to report that neutrophils from DM, HFpEF and HFpEF+DM can release, but to a much lower extent IL-1RA as compared to CTL, suggesting that these patients' neutrophils are less efficient either to induce IL-1RA synthesis or its release. Thus, the observed increase of circulating IL-1RA in these patients is not due to neutrophils contribution, but from other cells such as monocytes, hepatocytes, epithelial cells and adipocytes^{67, 68}.

In this study, we further explore the impact of diabetes on neutrophil pro- and anti-inflammatory responses. IL-8 neutrophil release was significantly increased in DM and HFpEF+DM patients following LPS treatment. LPS-induced IL-6 release was maximal in HFpEF+DM isolated neutrophils. These data suggest that neutrophils from HFpEF and more so in HFpEF+DM patients are more prone to release pro-inflammatory cytokines along with an impaired capacity to release anti-inflammatory cytokines, namely, IL1-RA.

Study limitations

This clinical mechanistic study consisted of a small sample size of patients with various duration and etiologies of HFpEF. In addition, clinically relevant information such as the duration of diabetes and glycemic control were not readily available. Since this was not a longitudinal study, it did not allow for the assessment of the dynamic changes and/or the clinical consequences of our findings. Neutrophils-mediated release in selected pro- and anti-inflammatory cytokines was limited to a few agonists and selected cytokines.

Conclusion

HFpEF is characterized by a significant decrease in circulating VEGF and NO. The release of VEGF, pro- (IL-6 and IL-8) and anti-inflammatory (IL-1RA) cytokines by the neutrophil is markedly abnormal in patients with DM, HFpEF and HFpEF+DM when compared with healthy controls.

Acknowledgements

We are thankful to the volunteers for kindly providing blood samples.

Funding

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-97943 to MGS), *Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal* (FICM) (to MGS). BV was recipient of a fellowship from FRQS, MW is the recipient of the Carolyn and Richard Renaud Endowed Research Chair in Heart Failure of the Montreal Heart Institute.

Declaration of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

1. Dunlay SM, Roger VL, Redfield MM. Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nature Reviews Cardiology*. 2017;14(10):591-602.
2. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola V-P, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GMC, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European Heart Journal*. 2016;37(27):2129-200.
3. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, Gonzalez-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GMC, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P, Group ESCSD. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 2016;37(27):2129-200.
4. Bloom MW, Greenberg B, Jaarsma T, Januzzi JL, Lam CSP, Maggioni AP, Trochu JN, Butler J. Heart failure with reduced ejection fraction. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17058.
5. Murphy SP, Kakkar R, McCarthy CP, Januzzi JL. Inflammation in Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2020;75(11):1324-40.
6. Paulus WJ, Tschöpe C. A Novel Paradigm for Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(4):263-71.
7. Lindman BR. The Diabetic Heart Failure With Preserved Ejection Fraction Phenotype. *Circulation*. 2017;135(8):736-40.
8. Tromp J, Khan MAF, Klip IT, Meyer S, de Boer RA, Jaarsma T, Hillege H, van Veldhuisen DJ, van der Meer P, Voors AA. Biomarker Profiles in Heart Failure Patients With Preserved and Reduced Ejection Fraction. *Journal of the American Heart Association*. 2017;6(4).

9. Braunwald E. Biomarkers in Heart Failure. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(20):2148-59.
10. Sanders-van Wijk S, van Empel V, Davarzani N, Maeder MT, Handschin R, Pfisterer ME, Brunner-La Rocca HP. Circulating biomarkers of distinct pathophysiological pathways in heart failure with preserved vs. reduced left ventricular ejection fraction. *European Journal of Heart Failure*. 2015;17(10):1006-14.
11. Schmitter D, Cotter G, Voors AA. Clinical use of novel biomarkers in heart failure: towards personalized medicine. *Heart Failure Reviews*. 2013;19(3):369-81.
12. Simmonds SJ, Cuijpers I, Heymans S, Jones EAV. Cellular and Molecular Differences between HFpEF and HFrEF: A Step Ahead in an Improved Pathological Understanding. *Cells*. 2020;9(1):242.
13. Collier P, Watson CJ, Voon V, Phelan D, Jan A, Mak G, Martos R, Baugh JA, Ledwidge MT, McDonald KM. Can emerging biomarkers of myocardial remodelling identify asymptomatic hypertensive patients at risk for diastolic dysfunction and diastolic heart failure? *European Journal of Heart Failure*. 2011;13(10):1087-95.
14. Kalogeropoulos A, Georgiopoulou V, Psaty BM, Rodondi N, Smith AL, Harrison DG, Liu Y, Hoffmann U, Bauer DC, Newman AB, Kritchevsky SB, Harris TB, Butler J. Inflammatory Markers and Incident Heart Failure Risk in Older Adults. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;55(19):2129-37.
15. Hulsmans M, Sager HB, Roh JD, Valero-Muñoz M, Houstis NE, Iwamoto Y, Sun Y, Wilson RM, Wojtkiewicz G, Tricot B, Osborne MT, Hung J, Vinegoni C, Naxerova K, Sosnovik DE, Zile MR, Bradshaw AD, Liao R, Tawakol A, Weissleder R, Rosenzweig A, Swirski FK, Sam F, Nahrendorf M. Cardiac macrophages promote diastolic dysfunction. *Journal of Experimental Medicine*. 2018;215(2):423-40.
16. Glezeva N, Voon V, Watson C, Horgan S, McDonald K, Ledwidge M, Baugh J. Exaggerated Inflammation and Monocytosis Associate With Diastolic Dysfunction in Heart Failure With

Preserved Ejection Fraction: Evidence of M2 Macrophage Activation in Disease Pathogenesis. *Journal of Cardiac Failure*. 2015;21(2):167-77.

17. Tasal A, Erturk M, Uyarel H, Karakurt H, Bacaksiz A, Vatankulu MA, Turfan M, Sonmez O, Erdogan E, Ergelen M. Utility of the neutrophil to lymphocyte ratio for predicting in-hospital mortality after levosimendan infusion in patients with acute decompensated heart failure. *J Cardiol*. 2014;63(6):418-23.

18. Uthamalingam S, Patvardhan EA, Subramanian S, Ahmed W, Martin W, Daley M, Capodilupo R. Utility of the neutrophil to lymphocyte ratio in predicting long-term outcomes in acute decompensated heart failure. *Am J Cardiol*. 2011;107(3):433-8.

19. Durmus E, Kivrak T, Gerin F, Sunbul M, Sari I, Erdogan O. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Platelet-to-Lymphocyte Ratio are Predictors of Heart Failure. *Arq Bras Cardiol*. 2015;105(6):606-13.

20. Arruda-Olson AM, Reeder GS, Bell MR, Weston SA, Roger VL. Neutrophilia predicts death and heart failure after myocardial infarction: a community-based study. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2009;2(6):656-62.

21. Hassan A, Zughul R, Villines D. Prognostic significance of Absolute Neutrophil Count in Patients with Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Asian Pacific Journal of Health Sciences*. 2016;3(1):104-8.

22. Ommen SR, Hodge DO, Rodeheffer RJ, McGregor CG, Thomson SP, Gibbons RJ. Predictive power of the relative lymphocyte concentration in patients with advanced heart failure. *Circulation*. 1998;97(1):19-22.

23. Rudiger A, Burckhardt OA, Harpes P, Muller SA, Follath F. The relative lymphocyte count on hospital admission is a risk factor for long-term mortality in patients with acute heart failure. *Am J Emerg Med*. 2006;24(4):451-4.

24. Silvestre-Roig C, Braster Q, Ortega-Gomez A, Soehnlein O. Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation. *Nature Reviews Cardiology*. 2020;17(6):327-40.

25. Soehnlein O, Steffens S, Hidalgo A, Weber C. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2017;17(4):248-61.
26. Ezekowitz JA, O'Meara E, McDonald MA, Abrams H, Chan M, Ducharme A, Giannetti N, Grzeslo A, Hamilton PG, Heckman GA, Howlett JG, Koshman SL, Lepage S, McKelvie RS, Moe GW, Rajda M, Swiggum E, Virani SA, Zieroth S, Al-Hesayen A, Cohen-Solal A, D'Astous M, De S, Estrella-Holder E, Fremes S, Green L, Haddad H, Harkness K, Hernandez AF, Kouz S, LeBlanc M-H, Masoudi FA, Ross HJ, Roussin A, Sussex B. 2017 Comprehensive Update of the Canadian Cardiovascular Society Guidelines for the Management of Heart Failure. *Canadian Journal of Cardiology*. 2017;33(11):1342-433.
27. Grodin JL, Philips S, Mullens W, Nijst P, Martens P, Fang JC, Drazner MH, Tang WHW, Pandey A. Prognostic implications of plasma volume status estimates in heart failure with preserved ejection fraction: insights from TOPCAT. *Eur J Heart Fail*. 2019.
28. Pitt B, Pfeffer MA, Assmann SF, Boineau R, Anand IS, Claggett B, Clausell N, Desai AS, Diaz R, Fleg JL, Gordeev I, Harty B, Heitner JF, Kenwood CT, Lewis EF, O'Meara E, Probstfield JL, Shaburishvili T, Shah SJ, Solomon SD, Sweitzer NK, Yang S, McKinlay SM, Investigators T. Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*. 2014;370(15):1383-92.
29. Lavoie SS, Dumas E, Vulesevic B, Neagoe P-E, White M, Sirois MG. Synthesis of Human Neutrophil Extracellular Traps Contributes to Angiotensin-Mediated In Vitro Proinflammatory and Proangiogenic Activities. *The Journal of Immunology*. 2018.
30. Cassatella MA, Östberg NK, Tamassia N, Soehnlein O. Biological Roles of Neutrophil-Derived Granule Proteins and Cytokines. *Trends in Immunology*. 2019;40(7):648-64.
31. Neagoe P-E, Dumas E, Hajjar F, Sirois MG. Angiotensin-1 but not angiotensin-2 induces IL-8 synthesis and release by human neutrophils. *Journal of Cellular Physiology*. 2012;227(8):3099-110.
32. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(8):519-31.

33. Haddad LE, Sirois MG. Angiopoietin-1 upregulates de novo expression of IL-1 β and IL-1Ra, and the exclusive release of IL-1Ra from human neutrophils. *PLoS One*. 2014;9(2):e88980.
34. Zeng H, Chen J-X. Microvascular Rarefaction and Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2019;6.
35. Paolocci N, Biondi R, Bettini M, Lee C-I, Berlowitz CO, Rossi R, Xia Y, Ambrosio G, L'Abbate A, Kass DA, Zweier JL. Oxygen Radical-mediated Reduction in Basal and Agonist-evoked NO Release in Isolated Rat Heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2001;33(4):671-9.
36. Mohammed SF, Hussain S, Mirzoyev SA, Edwards WD, Maleszewski JJ, Redfield MM. Coronary Microvascular Rarefaction and Myocardial Fibrosis in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation*. 2015;131(6):550-9.
37. Boudina S, Abel ED. Diabetic Cardiomyopathy Revisited. *Circulation*. 2007;115(25):3213-23.
38. Seferović PM, Paulus WJ. Clinical diabetic cardiomyopathy: a two-faced disease with restrictive and dilated phenotypes. *European Heart Journal*. 2015;36(27):1718-27.
39. Stratmann B, Gawłowski T, Tschoepe D. Diabetic Cardiomyopathy – to Take a Long Story Serious. *Herz*. 2010;35(3):161-8.
40. Taimeh Z, Loughran J, Birks EJ, Bolli R. Vascular endothelial growth factor in heart failure. *Nature Reviews Cardiology*. 2013;10:519+.
41. Tao Z, Chen B, Tan X, Zhao Y, Wang L, Zhu T, Cao K, Yang Z, Kan YW, Su H. Coexpression of VEGF and angiopoietin-1 promotes angiogenesis and cardiomyocyte proliferation reduces apoptosis in porcine myocardial infarction (MI) heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(5):2064-9.
42. Vitiello D, Chaar D, Neagoe P-E, Ducharme A, Carrier M, Pelletier GB, Racine N, Liszkowski M, Sirois MG, White M. Decreased circulating and neutrophil mediated VEGF-A165 release in stable long-term cardiac transplant recipients. *Vascular Cell*. 2015;7(1).

43. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996;380(6573):435-9.
44. Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, Isner JM. Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor Enhances Vascular Permeability Via Nitric Oxide and Prostacyclin. *Circulation*. 1998;97(1):99-107.
45. Bouloumié A. Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Cardiovascular Research*. 1999;41(3):773-80.
46. Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1998;274(3):H1054-H8.
47. Zachary I. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovascular Research*. 2001;49(3):568-81.
48. Sandrim VC, Palei ACT, Metzger IF, Gomes VA, Cavalli RC, Tanus-Santos JE. Nitric Oxide Formation Is Inversely Related to Serum Levels of Antiangiogenic Factors Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase-1 and Soluble Endogline in Preeclampsia. *Hypertension*. 2008;52(2):402-7.
49. Maynard SE, Min J-Y, Merchan J, Lim K-H, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;111(5):649-58.
50. Schiattarella GG, Altamirano F, Tong D, French KM, Villalobos E, Kim SY, Luo X, Jiang N, May HI, Wang ZV, Hill TM, Mammen PPA, Huang J, Lee DI, Hahn VS, Sharma K, Kass DA, Lavandro S, Gillette TG, Hill JA. Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction. *Nature*. 2019;568(7752):351-6.
51. Chirinos JA, Zamani P. The Nitrate-Nitrite-NO Pathway and Its Implications for Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. *Current Heart Failure Reports*. 2016;13(1):47-59.

52. White M, Cantin B, Haddad H, Kobashigawa JA, Ross H, Carrier M, Pflugfelder PW, Isaac D, Cecere R, Whittom L, Ali IS, Wang S-H, He Y, Groulx A, Touyz RM. Cardiac signaling molecules and plasma biomarkers after cardiac transplantation: Impact of tacrolimus versus cyclosporine. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2013;32(12):1222-32.
53. Gimbrone MA, García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation Research*. 2016;118(4):620-36.
54. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *Journal of Clinical Investigation*. 1995;96(1):60-8.
55. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(3):159-75.
56. Paulus WJ, Tschope C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(4):263-71.
57. Westermann D, Lindner D, Kasner M, Zietsch C, Savvatis K, Escher F, von Schlippenbach J, Skurk C, Steendijk P, Riad A, Poller W, Schultheiss H-P, Tschöpe C. Cardiac Inflammation Contributes to Changes in the Extracellular Matrix in Patients With Heart Failure and Normal Ejection Fraction. *Circulation: Heart Failure*. 2011;4(1):44-52.
58. van Heerebeek L, Hamdani N, Handoko ML, Falcao-Pires I, Musters RJ, Kupreishvili K, Ijsselmuiden AJJ, Schalkwijk CG, Bronzwaer JGF, Diamant M, Borbély A, van der Velden J, Stienen GJM, Laarman GJ, Niessen HWM, Paulus WJ. Diastolic Stiffness of the Failing Diabetic Heart. *Circulation*. 2008;117(1):43-51.
59. Swirski FK, Nahrendorf M. Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2018;18(12):733-44.

60. Nymo SH, Hulthe J, Ueland T, McMurray J, Wikstrand J, Askevold ET, Yndestad A, Gullestad L, Aukrust P. Inflammatory cytokines in chronic heart failure: interleukin-8 is associated with adverse outcome. Results from CORONA. *European Journal of Heart Failure*. 2014;16(1):68-75.
61. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological Reviews*. 2018;281(1):8-27.
62. Carstensen M, Herder C, Kivimaki M, Jokela M, Roden M, Shipley MJ, Witte DR, Brunner EJ, Tabak AG. Accelerated Increase in Serum Interleukin-1 Receptor Antagonist Starts 6 Years Before Diagnosis of Type 2 Diabetes: Whitehall II Prospective Cohort Study. *Diabetes*. 2010;59(5):1222-7.
63. Buckley LF, Abbate A. Interleukin-1 blockade in cardiovascular diseases: a clinical update. *European Heart Journal*. 2018;39(22):2063-9.
64. Testa M, Yeh M, Lee P, Berman JW, Lejemtel TH, Fanelli R, Loperfido F. Circulating Levels of Cytokines and Their Endogenous Modulators in Patients With Mild to Severe Congestive Heart Failure Due to Coronary Artery Disease or Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 1996;28(4):964-71.
65. Scapini P, Bazzoni F, Cassatella MA. Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils. *Immunology Letters*. 2008;116(1):1-6.
66. McDonald PP, Gasperini S, Calzetti F, Cassatella MA. Modulation by Interferon- γ of the Production and Gene Expression of IL-1 Receptor Antagonist in Human Neutrophils. *Cellular Immunology*. 1998;184(1):45-50.
67. Arend WP. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2000;59(90001):60i-4.
68. Perrier S, Darakhshan F, Hajduch E. IL-1 receptor antagonist in metabolic diseases: Dr Jekyll or Mr Hyde? *FEBS Letters*. 2006;580(27):6289-94.

Figure legends

Figure 1. Measure of circulating endothelial biomarkers. Plasma from all 4 groups (healthy controls (CTL), DM, HFpEF and HFpEF+DM) was analyzed by ELISA for NO (Nitrite/Nitrate) and by Luminex multiplex for sICAM-1, sVCAM-1 and sE-Selectin. (A) Plasmatic NO from DM and all HFpEF patients decreased significantly, compared to healthy controls (CTL). On the other hand, sICAM-1 (B), increased significantly in DM and all HFpEF patients, sVCAM-1 (C) increased significantly in all HFpEF patients and sE-Selectin (D) only increased significantly in HFpEF+DM patients, all compared to CTL. Data are presented as median and IQR. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ as compared to CTL.

Figure 2. Measure of circulating inflammation biomarkers. Plasma from all 4 groups (healthy controls (CTL), DM, HFpEF and HFpEF+DM) was analyzed by ELISA for VEGF, IL-8, IL-6 and IL-1RA and by nephelometry for CRP. (A) Plasmatic VEGF from DM remained unchanged, whereas it decreased significantly in all HFpEF patients, compared to healthy controls (CTL). (B) Plasmatic CRP was only significantly increased in HFpEF and HFpEF+DM. (C) Plasmatic IL-8 increased significantly in DM and HFpEF+DM patients, compared to CTL and was also significantly higher in HFpEF+DM compared with HFpEF. (D) Plasmatic IL-6 increased significantly in HFpEF with or without DM patients, compared to CTL and was also significantly higher in HFpEF+DM compared with HFpEF. (E) IL-1RA was significantly increased in DM and all HFpEF patients compared to CTL. Data are presented as median and IQR. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to HV. † $P < 0.05$ and †† $P < 0.001$ compared to HFpEF.

Figure 3. Effect of TNF- α and LPS on the release of inflammation biomarkers by human neutrophils. Isolated neutrophils from all 4 groups (healthy controls (CTL), HFpEF and HFpEF+DM) were stimulated with TNF- α (10 ng/mL) or LPS (1 μ g/mL) for 2 hours and released VEGF, IL-1RA, IL-8 and IL-6 were quantified by DuoSet ELISA. Neutrophils from CTL have seen their release of (A) VEGF, (B) IL-1RA and (C) IL-6 significantly increased following TNF- α (A and B) and LPS stimulation. In all HFpEF groups, (A) VEGF and (B) IL-1RA release was significantly inhibited, whereas (D) IL-8 release was significantly increased in HFpEF+DM patients, compared to CTL. The release of IL-6 from neutrophils (D) was only achieved by LPS stimulation and it was significantly

increased in all HFpEF groups compared to CTL and also in HFpEF+DM compared to HFpEF. Data are presented as mean \pm SEM. *P<0.05; **P<0.01 and ***P<0.001 compared to respective PBS. †††P<0.001 compared to CTL. #P<0.05 and ####P<0.001 compared to HFpEF.

Figures

Figure 1

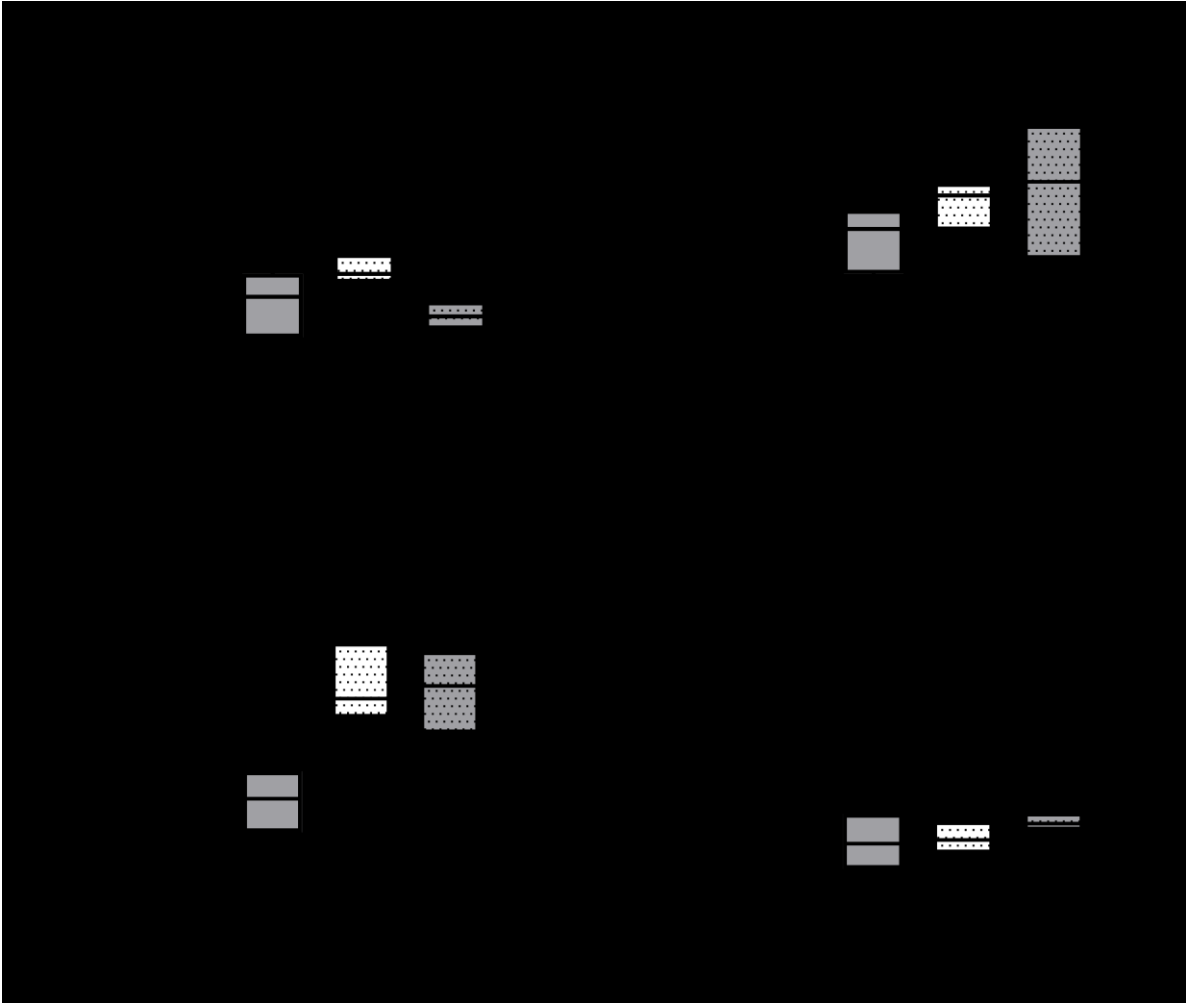


Figure 2

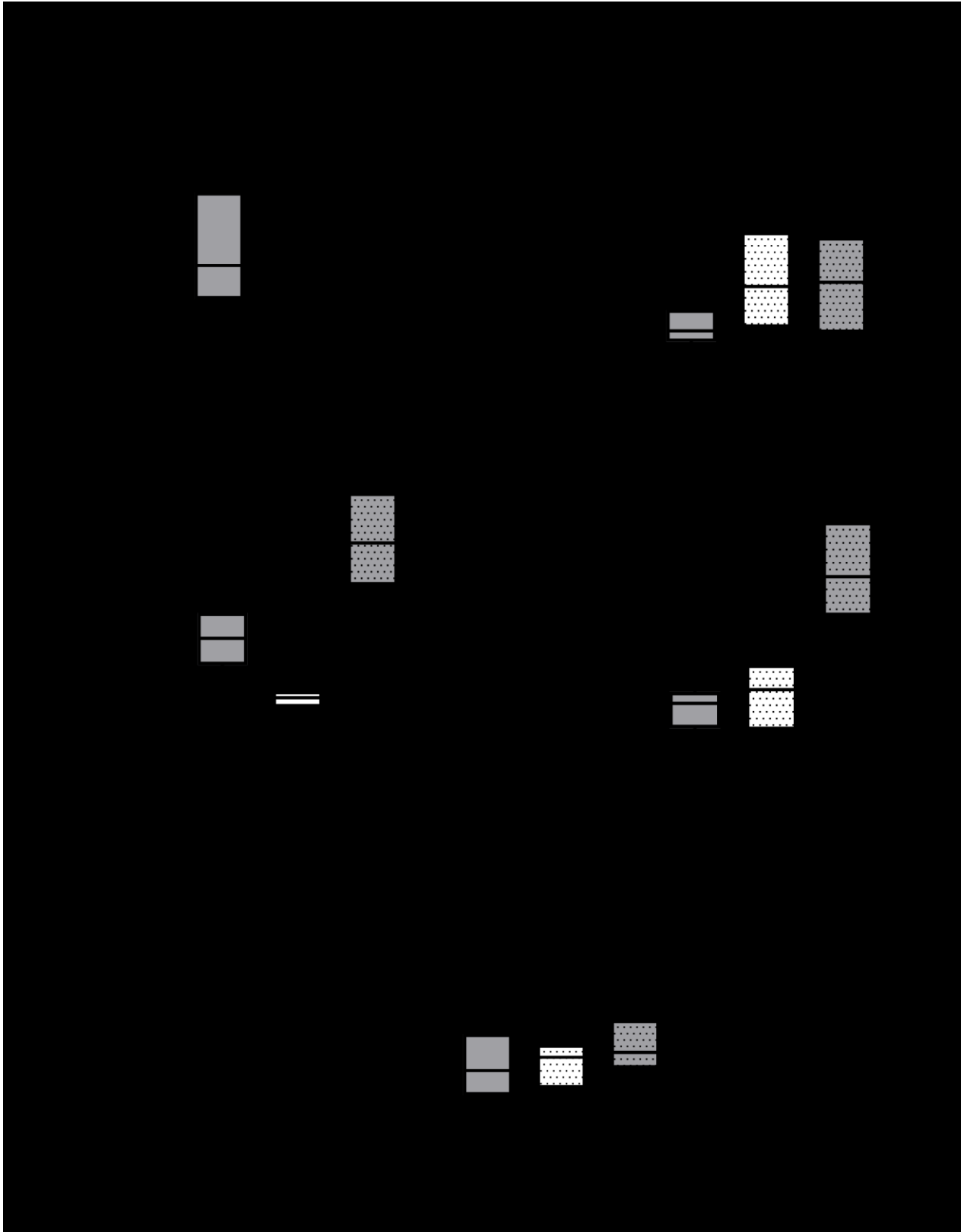
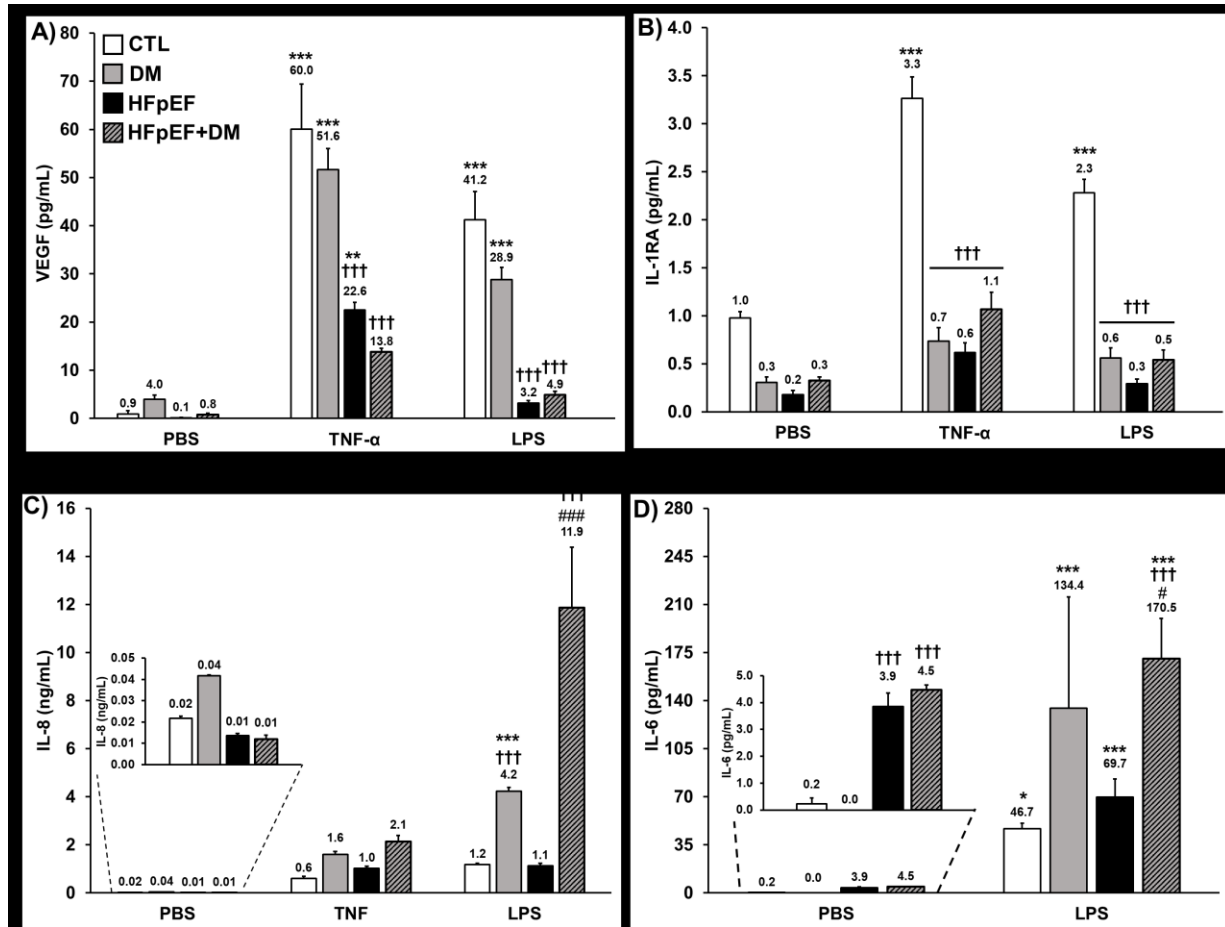


Figure 3



Tables

Table 1 Patient's demographics

	CTL	DM	HFpEF	HFpEF+DM	P-value
	(n = 21)	(n = 22)	(n = 15)	(n = 13)	
Age (years)	44.9 ± 2.7	66.2 ± 2.2*	75.8 ± 3.2*	73.5 ± 2.7*	<0.001
Male	14 (66.6 %)	13 (59.1 %)	6 (40.0 %)	9 (69.2 %)	0.346
NYHA class II	-	-	6 (40.0 %)	8 (61.5 %)	0.449
NYHA class III	-	-	9 (60.0 %)	5 (38.5 %)	
HF duration (months)	-	-	73.2 ± 17.9	74.8 ± 15.2	0.947
Etiology					0.255
Ischemia	-	-	5 (33.3 %)	8 (61.5 %)	
Cardiomyopathy	-	-	0 (0.0 %)	1 (7.7 %)	
Valvular	-	-	4 (26.7 %)	2 (15.4 %)	
Others	-	-	6 (40.0 %)	2 (15.4 %)	
LVEF	-	-	54.7 ± 1.5	55.5 ± 1.2	0.687
LVIDD	-	-	47.0 ± 1.1	51.5 ± 1.5	0.021
LVIDS	-	-	31.8 ± 1.6	38.2 ± 2.6	0.040
Hypertension	-	12 (54.5 %)	13 (86.7 %)	12 (92.3 %) [†]	0.027
Dyslipidemia	-	12 (54.5 %)	11 (73.3 %)	12 (92.3 %) [†]	0.027
Stroke	-	0 (0 %)	1 (6.7 %)	0 (0.0 %)	0.999
Hematology & Biochemistry					
Hemoglobin (g/L)	-	142.7 ± 3.5	126.9 ± 2.9	131.5 ± 4.4 ^{†/#}	<0.001
Leucocytes (x10 ⁹ /L)	-	6.7 ± 0.3	6.5 ± 0.5	8.1 ± 0.7	0.065
Na (mmol/L)	-	139.5 ± 0.4	136.9 ± 1.2	136.6 ± 0.8 [†]	0.042
K (mmol/L)	-	4.3 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.2 ± 0.1	0.705
Urea (mmol/L)	-	6.8 ± 0.3	14.7 ± 2.1	16.0 ± 2.4 [†]	<0.001
Creatinine (μmol/L)	-	83.3 ± 3.4	134.1 ± 12.4	153.2 ± 17.2 [†]	<0.001
NT-proBNP	-	-	2415 ± 526	1358 ± 355	0.119
Medication					
ACEi	-	9 (40.9 %)	10 (66.7 %)	5 (38.5 %)	0.222
ARB	-	7 (31.8 %)	3 (20.0 %)	5 (38.5 %)	0.999
β-blockers	-	1 (4.5 %)	15 (100 %)	12 (92.3 %) [†]	<0.001
Diuretic agent	-	2 (9.1 %)	15 (100 %)	13 (100 %) [†]	<0.001
Statin	-	16 (72.7 %)	10 (66.7 %)	10 (76.9 %)	0.999
Anti-platelets	-	0 (0 %)	15 (100 %)	13 (100 %) [†]	<0.001
Metformin	-	19 (86.4 %)	-	6 (46.2 %)	0.020
Sulfonylureas	-	7 (31.8 %)	-	5 (38.5 %)	0.726
α-glucosidase inhibitors	-	1 (4.5 %)	-	0 (0.0 %)	0.999
DPP-4 inhibitor	-	11 (50.0 %)	-	2 (15.4 %)	0.070
GLP-1 agonist	-	2 (9.1 %)	-	2 (15.4 %)	0.618
SGLT2 inhibitor	-	9 (40.9 %)	-	0 (0.0 %)	0.013
Insulin	-	7 (31.8 %)	-	5 (38.5 %)	0.726

CTL, healthy controls; HFpEF, heart failure with preserved ejection fraction; DM, type-2 diabetes mellitus; NYHA, New York Health Association; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVIDD, left ventricular internal diameter end diastole; LVIDS, left ventricular internal diameter end systole; ACEi, angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin receptor blocker; DPP-4,

dipeptidyl peptidase 4; GLP-1, glucagon-like peptide 1; SGLT2, sodium-glucose co-transporter-2. Continuous variables are shown as mean \pm standard error mean and categorical variables as number (%). Anti-platelets included aspirin, clopidogrel, prasugrel, or ticagrelor or a combination of these. *** $p < 0.001$ vs CTL and † $p < 0.05$ vs DM

Chapitre 4 – Discussion

Nos travaux ont démontré que l'IC qu'elle soit à FEVG réduite ou préservée est caractérisée par la présence d'une activation inflammatoire et des changements significatifs au niveau de l'immunité innée. Nos travaux complètent les observations publiées au cours des dernières années chez cette population [382-385]. En effet, IC-FER et IC-FEP sont caractérisés par un état pro-inflammatoire, une activation neurohumorale, une inflammation systémique ainsi qu'une augmentation du stress oxydatif. De récentes études ont suggéré que des anomalies des neutrophiles sont associées à la physiopathologie de l'IC [386, 387]. D'autres études ont également démontré une corrélation entre la viabilité des neutrophiles et la sévérité des symptômes de l'IC, ce qui suggère un rôle prépondérant des neutrophiles lors de la réponse inflammatoire chez ces patients. Au-delà des biomarqueurs circulants, nous avons étudié les changements dans la capacité du neutrophile stimulé à libérer certains biomarqueurs pro-angiogéniques, pro- et anti-inflammatoires chez des patients IC-FER, IC-FEP et des patients diabétiques. Dans le cadre de cette thèse de doctorat nous avons documenté des anomalies significatives au niveau des biomarqueurs de l'inflammation associés à une augmentation marquée de la capacité des neutrophiles isolées à libérer ces biomarqueurs ainsi que d'un « épuisement » du neutrophile activé à libérer l'IL-1RA, une puissante cytokine anti-inflammatoire. Voici les points clefs de même que l'importance de nos observations scientifiques.

1. Réduction de 90% des taux circulants du VEGF ainsi que de sa libération par les neutrophiles chez les patients IC

Une diminution marquée du VEGF circulant chez les patients IC-FEP ou IC-FER est une des observations les plus innovatrice et significative de nos études. La magnitude de diminution a atteint 90% chez les patients diabétiques sans insuffisance cardiaque de même que chez les patients souffrant d'IC-FER et IC-FEP avec ou sans diabète (DM) par rapport aux volontaires sains. En parallèle, nous avons observé une dysfonction significative des neutrophiles des patients diabétiques, IC-FER et IC-FEP et plus encore, chez les patients IC-FEP avec diabète à libérer le VEGF (jusqu'à 92% de réduction) par rapport aux neutrophiles des volontaires sains après une

stimulation avec des médiateurs pro-inflammatoires. Ceci pourrait être relié à la présence de comorbidités, notamment l'obésité, l'hypertension et le diabète chez IC-FEP associé à des anomalies vasculaires et micro-vasculaires plus marquées que chez les patients avec IC-FER. En effet, ces comorbidités ont la capacité d'induire un état inflammatoire systémique, favorisant la raréfaction microvasculaire coronaire, la réduction de la densité capillaire myocardique et l'altération de l'angiogenèse. Ces mécanismes sont le plus probablement d'importance dans le tableau clinique ainsi que la progression de l'IC-FEP. La libération basale de VEGF médiée par les neutrophiles était légèrement plus élevée chez les patients d'IC par rapport aux volontaires sains. Cependant, lors de la stimulation avec des agonistes pro-inflammatoires (TNF- α et LPS) la libération de VEGF était nettement diminuée chez les patients atteints d'IC avec ou sans diabète. Cette dernière observation est en accord avec les études précédentes complétées dans des modèles animaux dans lesquels les auteurs observent une diminution de la libération de VEGF à partir des cardiomyocytes de souris diabétiques cardiomyopathiques et de rats [359], et de neutrophiles de receveurs de transplantation cardiaque humaine. Le VEGF est un des facteurs de croissance essentiel et prédominant dans le processus angiogénique. Il agit aussi comme une cytokine pro-inflammatoire. Ainsi, le VEGF peut avoir un effet protecteur de par son effet pro-angiogénique, cependant il peut aussi avoir un effet négatif de par son effet pro-inflammatoire. Dans son rôle protecteur, le VEGF peut contribuer à la croissance des cardio-myofibroblastes et il a été rapporté qu'il exerce des effets cytoprotecteurs, anti-oxydants et anti-apoptotiques sur les cardiomyocytes des patients IC-FER [388, 389]. Le VEGF agit aussi comme facteur pro-angiogénique. Une diminution du VEGF a été associée à une raréfaction capillaire, jouant un rôle significatif dans la transition de l'hypertrophie VG à l'IC-FEP dans des modèles animaux [388, 390, 391]. De plus, Zisa et al ont découvert que l'injection intramyocardique de VEGF humain recombinant stimule la régénération des cardiomyocytes [392], la production de facteurs de croissance et la mobilisation des cellules progénitrices, aboutissant à une atténuation de la progression de la maladie et à une réparation robuste du cœur défaillant. En outre, le VEGF est important pour favoriser la formation de vaisseaux collatéraux après des événements ischémiques caractérisant l'IC-FER. En effet, après un infarctus du myocarde, la production de VEGF est déclenchée par l'hypoxie cardiaque pour induire une régénération endothéliale ou une

angiogénèse, qui conduisent à la restauration de la perfusion. En fait, des études récentes ont démontré que le recrutement du VEGF dans le myocarde réduisait les événements ischémiques [359]. Dans les modèles animaux, le transfert du gène VEGF induit une angiogénèse et améliore la perfusion tissulaire [360]. Baumgartner et ses collègues ont démontré que l'injection intramusculaire d'ADN plasmidique codant pour le VEGF améliorait l'ischémie en favorisant l'angiogénèse chez les patients atteints d'une maladie artérielle périphérique critique [393]. Pearlman et ses collègues ont démontré que la perfusion directe de VEGF améliorait la fraction d'éjection ventriculaire gauche globale et le mouvement de la paroi régionale après un infarctus aigu du myocarde chez un modèle animal [394]. En fait, il a été précédemment montré que l'application topique de VEGF sur la surface du cerveau d'un modèle de rat ischémie reperfusion réduisait significativement les lésions cérébrales ischémiques [359]. Chou et al. ont montré une réduction de deux fois du VEGF et du VEGF-R2 dans les ventricules des patients diabétiques par rapport aux donneurs non diabétiques [395]. En outre, l'administration de VEGF dans des modèles murins était en corrélation avec un œdème réduit et un volume d'infarctus réduit. De plus, le plasmide codant pour le VEGF a été administré directement dans le myocarde ischémique de patients pendant un pontage coronarien. L'administration de VEGF a entraîné une réduction des effets d'ischémie, une augmentation de la formation collatérale et une réduction de l'angine de poitrine [359]. Nos données suggèrent donc que la diminution circulante et médiée par le neutrophile activé jouent un rôle pathophysiologique important dans le diabète et dans l'IC avec FER ou FEP.

Malgré ces effets bénéfiques, le VEGF peut également être un élément important dans les complications microvasculaires pathologiques et en particulier dans la rétinopathie diabétique [396]. Le VEGF est un médiateur important des cellules progénitrices endothéliales (CPE), qui sont positives pour le VEGF-R2. Les CPE proviennent de la moelle osseuse et se différencient en cellules endothéliales circulantes. Un nombre réduit de CPE et leurs fonctions altérées sont associés au diabète, à l'hypertension et à un taux de cholestérol élevé, qui sont des facteurs de risque de maladie cardiaque chronique. Ainsi, cela suggère une implication du VEGF réduit entraînant un nombre réduit de CPE recrutés. Compte tenu de la diminution marquée du VEGF dans notre

population à haut risque, nous postulons que celle-ci joue un rôle significatif dans l'IC via la perte de l'activité pro-angiogénique.

Des informations limitées et controversées sont disponibles concernant les niveaux de cytokines angiogéniques chez les patients atteints d'IC. Alors que Cheng et al. ont rapporté une augmentation des taux plasmatiques de VEGF chez des patients atteints d'IC aiguë et chronique [397], Arakawa et al. ont montré exactement le contraire [398]. Arakawa et al. ont démontré une diminution des taux sériques de VEGF chez les patients atteints d'IC [398]. Notre laboratoire est le premier à démontrer que les niveaux plasmatiques diminués du VEGF sont associés à une dysfonction des neutrophiles à le libérer chez les patients IC. Alors que l'inhibition du VEGF en pathologie tumorale et oculaire semble être une voie thérapeutique prometteuse, à l'inverse promouvoir la prolifération vasculaire dans les territoires ischémiques surtout dans l'infarctus du myocarde, semble être une stratégie prometteuse. Nos observations suggèrent que la forte diminution du VEGF circulant et du VEGF libéré par le neutrophile pourraient être associés aux désordres microvasculaires qui caractérisent l'IC.

2. Réduction du NO plasmatique chez IC-FEP et IC-FER

Nous avons observé une réduction marquée des taux circulants de NO chez les patients diabétiques (DM) et chez les patients atteints d'IC en comparant avec des volontaires sains. Nous avons également observé une tendance à la réduction des taux de NO chez les patients IC + DM par rapport aux patients IC sans DM. En comparant IC-FER et IC-FEP, la réduction des taux circulants de NO est plus importante et plus significative chez les patients IC-FEP. Ceci pourrait être relié à la présence de comorbidités, notamment l'obésité, l'hypertension et le diabète chez IC-FEP associé à des anomalies vasculaires et micro-vasculaires plus marquées que chez les patients avec IC-FER. En effet, ces comorbidités ont la capacité d'induire un état inflammatoire systémique, favorisant la raréfaction microvasculaire coronarienne, la réduction de la densité capillaire myocardique et l'altération de l'angiogenèse. Ces mécanismes sont probablement d'importance dans le tableau clinique ainsi que la progression de l'IC-FEP. De plus, la combinaison d'un VEGF à faible circulation et d'une inflammation accrue de l'endothélium microvasculaire coronarien conduit très probablement à une dérégulation de la génération de NO et augmente la

production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)[4]. Nos données sont en accord avec l'étude qui a montré que les niveaux faibles de VEGF pourraient diminuer la production de NO en diminuant l'activité de l'endothélial NO synthase (eNOS) [4]. De ce fait, le VEGF maintient l'intégrité et la fonction endothéliale et diminue l'adhésion des leucocytes et l'agrégation plaquettaire. De plus, l'IC réduite ou préservée est associée à une diminution du flot périphérique entraînant des changements dans la structure et la fonction des vaisseaux et déclenchant ainsi la libération d'un réseau de cytokines pro-inflammatoires [4]. Ces cytokines pro-inflammatoires sont connues pour provoquer une faible biodisponibilité du NO. En effet, Le maintien de l'état pro-inflammatoire aggrave la dysfonction endothéliale. De même, l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales via l'intégrine- β_2 induit la sécrétion de l'azurocidine et de la protéinase-3 qui stimulent la production de VCAM-1 et ICAM-1 via la PKC endothéliale. De plus, l' α -défensine sécrétée par les neutrophiles contribue à l'aggravation de la dysfonction endothéliale en induisant l'augmentation des produits radicalaires et la diminution du NO [351]. L'augmentation du stress oxydatif pourrait ainsi contribuer à la diminution de la biodisponibilité du NO et par conséquent à la détérioration progressive du cœur défaillant [4]. En outre, l'hyperglycémie et la résistance à l'insuline induisent un état pro-inflammatoire, réduisant ainsi la biodisponibilité en NO.

3. Augmentation des molécules d'adhésion endothéliale solubles

Nous avons observé une augmentation marquée des molécules d'adhésion endothéliale solubles (sICAM-1, sVCAM-1 et sE-Sel) chez les patients atteints d'IC. Ces anomalies témoignent d'un état d'inflammation systémique associé à de la thrombo-inflammation. De plus, ceci pourrait s'expliquer par une synthèse et une libération altérée du complexe VEGF-NO, car une diminution de la synthèse endothéliale de NO induit l'expression et la translocation de molécules d'adhésion endothéliale (sICAM-1, sVCAM-1 et sE-Sel) [390, 399]. Cet effet peut également être exacerbé par la capacité de la CRP à des concentrations connues pour être associées à un risque accru d'événements cardiovasculaires (> 3 mg / L) à atténuer la production de NO. Finalement, la CRP inhibe l'expression d'eNOS et la synthèse de NO, et régule à la hausse l'expression des molécules d'adhésion. Les observations décrites ici sont en accord avec les publications d'importance sur le sujet. Or, une augmentation des taux circulants d'IL-1, IL-6, TNF- α et CRP, ainsi qu'une

augmentation des molécules d'adhésion solubles telles que sICAM-1 et sVCAM-1 ont été rapportées dans l'IC [132, 138-140]. Les auteurs ont montré que certains de ces marqueurs semblent corrélés avec la classe fonctionnelle NYHA ainsi que le pronostic chez les patients atteints d'IC-FER [135, 138]. D'autres études ont rapporté la présence de VCAM-1 et E-sélectine dans des biopsies endo-myocardiques récoltées chez des patients atteints de l'IC-FEP [144]. Nos travaux complètent les observations publiées au cours des dernières années chez les patients IC-FER et IC-FEP [382, 383] qui suggèrent que l'expression de ces molécules d'adhésion endothéliales conduit à l'activation et à la migration sous-endocardique des leucocytes circulants [144] et contribue à l'aggravation de la dysfonction endothéliale et par conséquent à la détérioration progressive du cœur défaillant.

4. Impact de l'insuffisance cardiaque sur la réponse inflammatoire et anti-inflammatoire du neutrophile

Dans le cadre de cette thèse, nous avons observé une augmentation significative des deux interleukines pro-inflammatoires circulantes (IL-6 et IL-8) chez les patients IC. Ces observations sont en accord avec nos travaux publiés précédemment et d'autres études indépendantes, soutenant le concept d'une inflammation vasculaire et systémique chez les patients atteints d'IC [130, 400]. L'IL-1RA, membre de la famille IL-1, est une cytokine anti-inflammatoire et anti-prolifération. Nous avons démontré une augmentation marquée de l'IL-1RA circulante chez les patients IC. Au-delà des niveaux circulants, nous avons investigué le rôle du neutrophile active à libérer ces biomarqueurs pro and anti-inflammatoires. Plus spécifiquement, nous avons évalué la capacité d'agonistes pro-inflammatoires à induire la libération d'IL-6; IL-8 et d'IL-1RA par les neutrophiles des patients IC. Ainsi, nous avons observé une augmentation significative de la capacité des neutrophiles provenant des patients IC à libérer des cytokines pro-inflammatoires IL-8 et IL-6. Cependant, nous avons observé une diminution marquée de la capacité des neutrophiles des patients IC à libérer de l'IL-1RA par rapport aux volontaires sains soit en condition basale, soit lors d'une stimulation avec TNF- α ou LPS. Ces données suggèrent que les neutrophiles ne sont pas les principaux contributeurs à l'augmentation de l'IL-1RA en circulation, mais d'autres cellules, à savoir les monocytes, les hépatocytes, les cellules épithéliales et les

adipocytes. Malgré les recherches en cours avec un antagoniste compétitif des récepteurs de l'IL-1, les modifications de l'IL-1RA n'ont pas été rapportées auparavant chez les patients atteints d'IC. Dans le cadre de cette thèse de doctorat nous avons documenté des anomalies significatives au niveau des biomarqueurs de l'inflammation (IL-8 et IL-6) associés à une augmentation marquée de la capacité des neutrophiles isolés à libérer ces biomarqueurs ainsi que d'un « épuisement » du neutrophile activé à libérer l'IL-1RA, une puissante cytokine anti-inflammatoire. IL-6 et IL-8 semblent jouer un rôle dans la pathophysiologie de l'IC. Ces marqueurs inflammatoires semblent être des biomarqueurs utiles dans le pronostic de l'IC. Des études ont démontré des concentrations élevées d'IL-6 dans le sérum des patients IC. Par ailleurs, IL-6 peut produire une hypertrophie myocytaire, un dysfonctionnement du myocarde et peut bloquer l'apoptose des myocytes cardiaques. IL-8, cytokine reconnue comme une protéine d'activation des neutrophiles sur la base de deux effets *in vitro*, le chimiotactisme et la libération d'enzymes granulaires. La libération médiée par les neutrophiles dans des cytokines pro et anti-inflammatoires sélectionnées était limitée à quelques agonistes et cytokines sélectionnées. D'autres cytokines pro et anti-inflammatoires telles que l'IL-1, la CCL-5 et l'IL-10, l'IL-30 et l'IL-33 sont susceptibles de jouer un rôle important dans cette population de patients et méritent des investigations complémentaires.

Les implications cliniques de nos observations sur les neutrophiles actives démontrent un rôle d'importance de ceux-ci dans l'IC chronique. Leurs rôles spécifiques dans la genèse et les complications de l'IC nécessiteront des investigations supplémentaires.

5. Impact du phénotype d'insuffisance cardiaque sur la réponse inflammatoire et anti-inflammatoire du neutrophile

L'originalité de nos travaux repose dans l'étude des changements des biomarqueurs circulants de même que des neutrophiles actives dans les deux phénotypes de l'IC les plus prévalent soient l'IC-FER et IC-FEP.

Le plasma provenant de 3 groupes (volontaires sains, IC-FER, IC-FEP) a été analysé par ELISA pour IL-8; IL-6 et IL-1RA. Les patients IC-FER présentent une augmentation de 1.6 fois d'IL-8 plasmatique par rapport aux volontaires sains (5.4 vs 3.3 pg/ml respectivement) et une augmentation de 4 fois d'IL-6 plasmatique par rapport aux volontaires sains (3.3 vs 0.8 pg/ml respectivement). De même, les patients IC-FEP présentent un niveau plasmatique d'IL-8 et d'IL-6 2 fois plus élevé que les volontaires sains. Nous avons démontré une augmentation marquée de l'IL-1RA circulante chez les patients IC-FER, IC-FEP par rapport aux volontaires sains. Nous avons également évalué la capacité d'agonistes pro-inflammatoires à induire la libération d'IL-6; IL-8 et d'IL-1RA par les neutrophiles des patients IC-FER et IC-FEP. Les neutrophiles des patients IC-FER ont une capacité plus élevée à relâcher IL-6 et IL-8.

Cette étude clinique a consisté en un petit échantillon de patients avec diverses durées et étiologies de l'IC. Les deux phénotypes d'IC présentent de différences marquées quant à l'état inflammatoire. L'IC-FEP est caractérisé par un état inflammatoire significatif. De plus, la présence de comorbidités contribue à l'amplification de l'état pro-inflammatoire avec une élévation des cytokines circulantes pro-inflammatoires telles que l'IL-6, la CRP, le TNF- α , et la ST-2 soluble (*soluble interleukin 1 receptor*). Cette inflammation systémique est caractérisée par une augmentation de ROS, VCAM-1 et E-sélectine. L'expression de ces molécules d'adhésion permet l'activation et la migration des leucocytes. Les cytokines pro-inflammatoires libérées, ainsi que la diminution de la biodisponibilité du NO et l'augmentation du peroxy-nitrite jouent un rôle dans la dysfonction endothéliale.

Dans l'IC-FER, le remodelage du ventricule gauche est causé par une perte progressive des cardiomyocytes. Cette mort cellulaire résulte de l'autophagie, l'apoptose ou la nécrose, stimulées par le stress oxydatif présent dans le cardiomyocyte. En raison de la perte des cardiomyocytes, des modifications au sein de la matrice extracellulaire contribuent d'une manière importante à la dilatation du ventricule gauche et ainsi à son remodelage excentrique. Des travaux additionnels sont nécessaires afin de mieux comprendre le rôle des neutrophiles dans les différents phénotypes d'IC.

6. L'impact du diabète sur les réponses pro- et anti-inflammatoires des neutrophiles

Nous avons observé que lorsque le diabète (DM) était associé à l'IC, les concentrations d'IL-6 et d'IL-8 augmentent de façon plus marquée. Nous avons observé que les taux circulants d'interleukines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8) dans le DM et l'IC-FEP étaient légèrement augmentés, cependant, lorsque le diabète était associé à la condition IC-FEP, à la fois les concentrations d'IL-6 et d'IL-8 ont été augmentées de manière plus marquée. Ces observations sont en accord avec nos travaux publiés précédemment et d'autres études indépendantes, soutenant le concept d'inflammation vasculaire et systémique chez les patients IC-FEP [130, 333, 401] chez lesquels la prévalence d'intolérance au glucose et de diabète atteint 50%. De même, nous avons démontré une augmentation marquée de l'IL-1RA circulante chez les patients IC-FEP+DM et chez les diabétiques sans présence d'IC. Ensemble, ces données, ainsi qu'une diminution du VEGF et du NO, soutiennent une altération significative de la fonction vasculaire et microvasculaire chez les patients IC-FEP, qui est très probablement intensifiée par la présence de diabète. Ces anomalies témoignent d'un état d'inflammation systémique associé à de la thrombo-inflammation. Les observations décrites ici sont en accord avec les publications d'importance sur le sujet et confirme un état thrombo-inflammatoire dans notre population d'étude.

La libération de neutrophiles d'IL-8 était significativement augmentée chez les patients DM et IC-FEP + DM après un traitement par TNF- α ou LPS. La libération d'IL-6 induite par le LPS était maximale chez les neutrophiles isolés par IC-FEP + DM. Ces données suggèrent que les neutrophiles des patients IC-FEP et plus encore chez les patients IC-FEP + DM sont plus enclins à libérer des cytokines pro-inflammatoires avec une capacité réduite à libérer des cytokines anti-inflammatoires, à savoir, IL1-RA. Ainsi, nous avons observé une diminution marquée de la capacité des neutrophiles des patients (DM, IC-FEP+DM) à libérer de l'IL-1RA par rapport aux volontaires sains soit en condition basale, soit lors d'une stimulation avec TNF- α ou LPS.

En somme, ces observations confirment que la présence de diabète est associée à une plus grande altération de la capacité des neutrophiles et induit un état inflammatoire avancé. En présence

d'IC l'impact du diabète est moindre mais demeure présent chez les patients avec phénotype de type IC-FEP.

Cette étude clinique a consisté en un petit échantillon de patients avec diverses durées et étiologies de l'IC. De plus, des informations cliniquement pertinentes telles que la durée du diabète et le contrôle glycémique, la nécessité de suivi clinique à plus long terme sont nécessaires afin d'évaluer les conséquences cliniques de nos observations. Finalement, notre étude incite à poursuivre des recherches, l'ajout des traitements potentiels innovants tels que les anti-cytokines (anti-IL-1, anti-IL6), isGLT2, agonistes des GLP1 pourrait, par conséquent, être un nouvel objectif fort intéressant à envisager dans notre étude.

Chapitre 5 : Conclusions

1. Conclusions et retour sur les objectifs

Les buts de ce travail étaient de caractériser le profil sanguin pro- et anti-inflammatoire des biomarqueurs circulants et leur libération par les neutrophiles dérivés des patients IC-FER et IC-FEP et les comparer à ceux libérées par les neutrophiles des volontaires sains, ainsi que de vérifier les effets du diabète sur cette libération. Nos travaux de recherche ont permis de caractériser les changements dans la libération de diverses cytokines pro and anti-inflammatoires par le neutrophile active dans les deux phénotypes principaux d'IC.

Au cours des travaux réalisés dans le contexte de cette thèse de doctorat, nous avons observé une réduction importante (>90% de réduction) des taux circulants de VEGF chez les patients IC-FER et IC-FEP avec ou sans diabète par rapport aux volontaires sains. En parallèle, nous avons observé une incapacité significative des neutrophiles des patients IC-FER et IC-FEP et plus encore, chez les patients IC-FEP avec diabète à libérer le VEGF (jusqu'à 92% de réduction) par rapport aux neutrophiles des volontaires sains après une stimulation avec des médiateurs pro-inflammatoires. De plus, nos études ont permis de déterminer que la combinaison d'un VEGF à faible circulation et d'une inflammation accrue de l'endothélium microvasculaire coronarien conduit très probablement à une dérégulation de la génération de NO, d'où on a démontré une réduction marquée des taux circulants de NO chez les patients diabétiques et chez les patients atteints d'IC en comparant avec des contrôles sains. Nous avons également observé une tendance à la réduction des taux de NO chez les patients IC + DM par rapport aux patients IC sans DM. En comparant IC-FER et IC-FEP, la réduction des taux circulants de NO était plus importante et plus significative chez les patients IC-FEP. Les niveaux circulants d'IL-6 et d'IL-8 étaient des augmentations significatives chez les patients IC (IC-FER et IC-FEP) et de diabète. Cependant, lorsque le diabète était associé à la condition IC-FEP, les concentrations d'IL-6 et d'IL-8 ont été augmentées de manière plus puissante. Ensemble, ces données, ainsi qu'une diminution du VEGF et du NO, soutiennent une altération significative de la fonction vasculaire et microvasculaire chez les patients IC-FEP, qui est très probablement intensifiée par la présence de diabète. Nous avons également observé que la libération de neutrophiles d'IL-8 était significativement augmentée

chez les patients DM et IC-FEP + DM après un traitement par TNF- α ou LPS. La libération d'IL-6 induite par le LPS était maximale chez les neutrophiles isolés des IC-FEP +DM. Ces données suggèrent que les neutrophiles de IC-FEP et plus encore chez les patients IC-FEP + DM sont plus enclins à libérer des cytokines pro-inflammatoires avec une capacité réduite à libérer l'IL1-RA. L'IL-1RA, membre de la famille IL-1, est une cytokine anti-inflammatoire et anti-prolifération. Nous avons démontré une augmentation marquée de l'IL-1RA circulante chez les patients IC-FER, IC-FEP et chez les diabétiques. Cependant, nous avons observé une diminution marquée de la capacité des neutrophiles des patients (DM, IC-FEP, IC-FEP+DM) à libérer de l'IL-1RA par rapport aux volontaires sains soit en condition basale, soit lors d'une stimulation avec TNF- α ou LPS. Ces données suggèrent que les neutrophiles ne sont pas les principaux contributeurs à l'augmentation de l'IL-1RA en circulation, mais d'autres cellules, à savoir les monocytes, les hépatocytes, les cellules épithéliales et les adipocytes.

2. Perspectives futures

Les biomarqueurs sont une source d'information inestimable. Ils permettent aux cliniciens de déterminer les risques, de gérer les maladies cardiovasculaires et d'élaborer des stratégies thérapeutiques efficaces. Ainsi, les implications cliniques de nos observations sur les neutrophiles démontrent un rôle d'importance de ceux-ci dans l'IC chronique. Cependant, leurs rôles spécifiques dans la genèse et les complications de l'IC nécessiteront des investigations supplémentaires. En effet, la libération médiée par les neutrophiles dans des cytokines pro- et anti-inflammatoires sélectionnées était limitée à quelques agonistes et cytokines sélectionnées. D'autres cytokines pro- et anti-inflammatoires telles que l'IL-1, la CCL-5 et l'IL-10, l'IL-30 et l'IL-33, la CT-1 sont susceptibles de jouer un rôle important dans cette population de patients et méritent des investigations complémentaires. A titre indicatif, la CT-1 une cytokine pro-inflammatoire faisant partie de la famille de l'IL-6, peut effectivement être une cible thérapeutique dans certaines formes de défaillances cardiaques. Par ailleurs, la CT-1 joue un rôle dans l'IC par sa persistance dans le système à la suite d'un problème cardiovasculaire. La CT-1 représente alors une belle cible thérapeutique. En effet, la réduction de cette cytokine dans le sang a des effets bénéfiques. En effet, une étude a démontré que l'utilisation de deux médicaments, valsartan (VAL) et spironolactone (SPL), pour le traitement de l'IC avait un effet cardioprotecteur pour les

rats dans lesquels on a induit chimiquement l'hypertrophie. Cette étude est intéressante puisque VAL et SPL, tout en rétablissant la masse du cœur par rapport à la masse du corps, ont inhibé l'expression de l'ARNm de CT-1. Par ailleurs, les auteurs rapportent que le losartan, un bloqueur du récepteur de l'Ang II, produit un effet similaire en diminuant l'hypertrophie induite par CT-1. Cependant, cette étude n'a pas démontré le mécanisme par lequel VAL et SPL inhibent l'induction de CT-1, ce qui mérite des investigations complémentaires. De l'autre côté, l'IC semble être caractérisée par un déséquilibre dans le réseau des cytokines pro- et anti-inflammatoires. Le rétablissement de ce déséquilibre inflammatoire pourrait, par conséquent, être un nouvel objectif fort intéressant à envisager pour une thérapie immuno-modulatrice de cette maladie.

En outre, notre étude clinique a consisté en un petit échantillon de patients avec diverses durées et étiologies de l'IC. De plus, des informations cliniquement pertinentes telles que la durée du diabète et le contrôle glycémique, la nécessité de suivi clinique à plus long terme sont nécessaires afin d'évaluer les conséquences cliniques de nos observations. Finalement, notre étude incite à poursuivre des recherches, l'ajout des traitements potentiels innovants tels que les anti-cytokines (anti-IL-1, anti-IL6), isGLT2, agonistes des GLP1 pourrait, par conséquent, être un nouvel objectif fort intéressant à envisager dans notre étude.

Références bibliographiques

1. McMurray, J.J., et al., *ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. Eur Heart J, 2012. **33**(14): p. 1787-847.
2. Hunt, S.A., C. American College of, and G. American Heart Association Task Force on Practice, *ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure)*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(6): p. e1-82.
3. Arnold, J.M., et al., *Canadian Cardiovascular Society consensus conference recommendations on heart failure 2006: diagnosis and management*. Can J Cardiol, 2006. **22**(1): p. 23-45.
4. 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.
5. Sharma, K. and D.A. Kass, *Heart failure with preserved ejection fraction: mechanisms, clinical features, and therapies*. Circ Res, 2014. **115**(1): p. 79-96.
6. Zile, M.R., et al., *Heart failure with a normal ejection fraction: is measurement of diastolic function necessary to make the diagnosis of diastolic heart failure?* Circulation, 2001. **104**(7): p. 779-82.
7. Bursi, F., et al., *Systolic and diastolic heart failure in the community*. JAMA, 2006. **296**(18): p. 2209-16.
8. Rosamond, W., et al., *Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee*. Circulation, 2008. **117**(4): p. e25-146.

9. Senni, M., et al., *New strategies for heart failure with preserved ejection fraction: the importance of targeted therapies for heart failure phenotypes*. Eur Heart J, 2014. **35**(40): p. 2797-815.
10. Ezekowitz, J.A., et al., *2017 Comprehensive Update of the Canadian Cardiovascular Society Guidelines for the Management of Heart Failure*. Can J Cardiol, 2017. **33**(11): p. 1342-1433.
11. McMurray, J.J. and M.A. Pfeffer, *Heart failure*. Lancet, 2005. **365**(9474): p. 1877-89.
12. Schocken, D.D., *Epidemiology and risk factors for heart failure in the elderly*. Clin Geriatr Med, 2000. **16**(3): p. 407-18.
13. Tsuyuki, R.T., et al., *Contemporary burden of illness of congestive heart failure in Canada*. Can J Cardiol, 2003. **19**(4): p. 436-8.
14. Levy, W.C., et al., *The Seattle Heart Failure Model: prediction of survival in heart failure*. Circulation, 2006. **113**(11): p. 1424-33.
15. Mozaffarian, D., et al., *Prediction of mode of death in heart failure: the Seattle Heart Failure Model*. Circulation, 2007. **116**(4): p. 392-8.
16. Pocock, S.J., et al., *Predictors of mortality and morbidity in patients with chronic heart failure*. Eur Heart J, 2006. **27**(1): p. 65-75.
17. Hunt, S.A., et al., *ACC/AHA Guidelines for the Evaluation and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: Executive Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation; Endorsed by the Heart Failure Society of America*. Circulation, 2001. **104**(24): p. 2996-3007.
18. Schrier, R.W. and W.T. Abraham, *Hormones and hemodynamics in heart failure*. N Engl J Med, 1999. **341**(8): p. 577-85.
19. Jessup, M. and S. Brozena, *Heart failure*. N Engl J Med, 2003. **348**(20): p. 2007-18.
20. Kurokawa, J. and H. Abriel, *Neurohormonal regulation of cardiac ion channels in chronic heart failure*. J Cardiovasc Pharmacol, 2009. **54**(2): p. 98-105.
21. Braunwald, E., *Biomarkers in heart failure*. N Engl J Med, 2008. **358**(20): p. 2148-59.

22. Denvir, M.A. and S.J. Leslie, *Best practice for chronic heart failure patients--writing guidelines is not enough*. Eur Heart J, 2008. **29**(14): p. 1706-8.
23. Pepine, C.J. and W.W. Nichols, *The pathophysiology of chronic ischemic heart disease*. Clin Cardiol, 2007. **30**(2 Suppl 1): p. I4-9.
24. Mann, D.L. and M.R. Bristow, *Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond*. Circulation, 2005. **111**(21): p. 2837-49.
25. Opie, L.H., et al., *Controversies in ventricular remodelling*. Lancet, 2006. **367**(9507): p. 356-67.
26. Frey, N. and E.N. Olson, *Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly*. Annu Rev Physiol, 2003. **65**: p. 45-79.
27. Chin, B.S., et al., *Vascular endothelial growth factor and soluble P-selectin in acute and chronic congestive heart failure*. Am J Cardiol, 2002. **90**(11): p. 1258-60.
28. Upadhyay, R.K., *Emerging risk biomarkers in cardiovascular diseases and disorders*. J Lipids, 2015. **2015**: p. 971453.
29. Zile, M.R., C.F. Baicu, and W.H. Gaasch, *Diastolic heart failure--abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle*. N Engl J Med, 2004. **350**(19): p. 1953-9.
30. 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.
31. Westermann, D., et al., *Role of left ventricular stiffness in heart failure with normal ejection fraction*. Circulation, 2008. **117**(16): p. 2051-60.
32. van Heerebeek, L. and W.J. Paulus, *Understanding heart failure with preserved ejection fraction: where are we today?* Neth Heart J, 2016. **24**(4): p. 227-36.
33. Franssen, C. and A. Gonzalez Miqueo, *The role of titin and extracellular matrix remodelling in heart failure with preserved ejection fraction*. Neth Heart J, 2016. **24**(4): p. 259-67.
34. Xiao, R.P., et al., *Subtype-specific alpha1- and beta-adrenoceptor signaling in the heart*. Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(6): p. 330-7.
35. Ahlquist, R.P., *A study of the adrenotropic receptors*. Am J Physiol, 1948. **153**(3): p. 586-600.

36. Docherty, J.R., *Subtypes of functional alpha1- and alpha2-adrenoceptors*. Eur J Pharmacol, 1998. **361**(1): p. 1-15.
37. Leier, C.V., P.F. Binkley, and R.J. Cody, *Alpha-adrenergic component of the sympathetic nervous system in congestive heart failure*. Circulation, 1990. **82**(2 Suppl): p. 168-76.
38. Endoh, M. and J.R. Blinks, *Actions of sympathomimetic amines on the Ca²⁺ transients and contractions of rabbit myocardium: reciprocal changes in myofibrillar responsiveness to Ca²⁺ mediated through alpha- and beta-adrenoceptors*. Circ Res, 1988. **62**(2): p. 247-65.
39. Zhang, Y.Y., K.M. Xu, and C. Han, *Alpha(1)-adrenoceptor subtypes mediating inotropic responses in rat heart*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **291**(2): p. 829-36.
40. Chakraborti, S., T. Chakraborti, and G. Shaw, *beta-adrenergic mechanisms in cardiac diseases: a perspective*. Cell Signal, 2000. **12**(8): p. 499-513.
41. Xiao, R.P., et al., *Recent advances in cardiac beta(2)-adrenergic signal transduction*. Circ Res, 1999. **85**(11): p. 1092-100.
42. Gauthier, C., et al., *The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle*. J Clin Invest, 1998. **102**(7): p. 1377-84.
43. Brodde, O.E. and M.C. Michel, *Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart*. Pharmacol Rev, 1999. **51**(4): p. 651-90.
44. Limbird, L.E., *Receptors linked to inhibition of adenylate cyclase: additional signaling mechanisms*. FASEB J, 1988. **2**(11): p. 2686-95.
45. Zhou, Y.Y., et al., *Localized cAMP-dependent signaling mediates beta 2-adrenergic modulation of cardiac excitation-contraction coupling*. Am J Physiol, 1997. **273**(3 Pt 2): p. H1611-8.
46. Schmieder, R.E., et al., *Renin-angiotensin system and cardiovascular risk*. Lancet, 2007. **369**(9568): p. 1208-19.
47. Fyhrquist, F. and O. Saijonmaa, *Renin-angiotensin system revisited*. J Intern Med, 2008. **264**(3): p. 224-36.
48. Unger, T., *The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease*. Am J Cardiol, 2002. **89**(2A): p. 3A-9A; discussion 10A.

49. Goldsmith, S.R., et al., *Increased plasma arginine vasopressin levels in patients with congestive heart failure*. J Am Coll Cardiol, 1983. **1**(6): p. 1385-90.
50. Tadevosyan, A., et al., *Nuclear-delimited angiotensin receptor-mediated signaling regulates cardiomyocyte gene expression*. J Biol Chem, 2010. **285**(29): p. 22338-49.
51. Touyz, R.M. and E.L. Schiffrin, *Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(4): p. 639-72.
52. Balakumar, P. and G. Jagadeesh, *A century old renin-angiotensin system still grows with endless possibilities: AT1 receptor signaling cascades in cardiovascular pathophysiology*. Cell Signal, 2014. **26**(10): p. 2147-60.
53. Dorn, G.W., 2nd and T. Force, *Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 527-37.
54. Ushio-Fukai, M., et al., *Angiotensin II receptor coupling to phospholipase D is mediated by the betagamma subunits of heterotrimeric G proteins in vascular smooth muscle cells*. Mol Pharmacol, 1999. **55**(1): p. 142-9.
55. Iadecola, C. and P.B. Gorelick, *Hypertension, angiotensin, and stroke: beyond blood pressure*. Stroke, 2004. **35**(2): p. 348-50.
56. Benigni, A., et al., *Disruption of the Ang II type 1 receptor promotes longevity in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(3): p. 524-30.
57. Burnier, M., *Angiotensin II type 1 receptor blockers*. Circulation, 2001. **103**(6): p. 904-12.
58. Benigni, A., P. Cassis, and G. Remuzzi, *Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging*. EMBO Mol Med, 2010. **2**(7): p. 247-57.
59. Farag, E., et al., *An update of the role of renin angiotensin in cardiovascular homeostasis*. Anesth Analg, 2015. **120**(2): p. 275-92.
60. Zablocki, D. and J. Sadoshima, *Solving the cardiac hypertrophy riddle: The angiotensin II-mechanical stress connection*. Circ Res, 2013. **113**(11): p. 1192-5.
61. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich, *Tumor necrosis factor signaling*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 45-65.

62. Palladino, M.A., et al., *Anti-TNF-alpha therapies: the next generation*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(9): p. 736-46.
63. Hehlhans, T. and K. Pfeffer, *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. Immunology, 2005. **115**(1): p. 1-20.
64. MacEwan, D.J., *TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences*. Cell Signal, 2002. **14**(6): p. 477-92.
65. Pobezinskaya, Y.L. and Z. Liu, *The role of TRADD in death receptor signaling*. Cell Cycle, 2012. **11**(5): p. 871-6.
66. Balkwill, F., *Tumor necrosis factor or tumor promoting factor?* Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(2): p. 135-41.
67. Tokito, A., et al., *Cardiotrophin-1 induces matrix metalloproteinase-1 in human aortic endothelial cells*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68801.
68. Garcia-Cenador, M.B., et al., *Effects and mechanism of organ protection by cardiotrophin-1*. Curr Med Chem, 2013. **20**(2): p. 246-56.
69. Calabro, P., et al., *Novel insights into the role of cardiotrophin-1 in cardiovascular diseases*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(2): p. 142-8.
70. Bristow, M.R. and C.S. Long, *Cardiotrophin-1 in heart failure*. Circulation, 2002. **106**(12): p. 1430-2.
71. Konii, H., et al., *Stimulatory effects of cardiotrophin 1 on atherosclerosis*. Hypertension, 2013. **62**(5): p. 942-50.
72. Demyanets, S., K. Huber, and J. Wojta, *Vascular effects of glycoprotein130 ligands--part II: biomarkers and therapeutic targets*. Vascul Pharmacol, 2012. **57**(1): p. 29-40.
73. Al-Mazroua, H.A., N.M. Al-Rasheed, and H.M. Korashy, *Downregulation of the cardiotrophin-1 gene expression by valsartan and spironolactone in hypertrophied heart rats in vivo and rat cardiomyocyte H9c2 cell line in vitro: a novel mechanism of cardioprotection*. J Cardiovasc Pharmacol, 2013. **61**(4): p. 337-44.
74. Bujak, M. and N.G. Frangogiannis, *The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2009. **57**(3): p. 165-76.

75. Thaik, C.M., et al., *Interleukin-1 beta modulates the growth and phenotype of neonatal rat cardiac myocytes*. J Clin Invest, 1995. **96**(2): p. 1093-9.
76. Francis, S.E., et al., *Interleukin-1 in myocardium and coronary arteries of patients with dilated cardiomyopathy*. J Mol Cell Cardiol, 1998. **30**(2): p. 215-23.
77. Minotti, J.R., et al., *Skeletal muscle size: relationship to muscle function in heart failure*. J Appl Physiol (1985), 1993. **75**(1): p. 373-81.
78. Mancini, D.M., et al., *Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure*. Circulation, 1992. **85**(4): p. 1364-73.
79. Sullivan, M.J., H.J. Green, and F.R. Cobb, *Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure*. Circulation, 1990. **81**(2): p. 518-27.
80. Belardinelli, R., et al., *Low intensity exercise training in patients with chronic heart failure*. J Am Coll Cardiol, 1995. **26**(4): p. 975-82.
81. Wang, H.J., et al., *Alteration in skeletal muscle afferents in rats with chronic heart failure*. J Physiol, 2010. **588**(Pt 24): p. 5033-47.
82. Maruhashi, T., et al., *Nitroglycerine-induced vasodilation for assessment of vascular function: a comparison with flow-mediated vasodilation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(6): p. 1401-8.
83. Raitakari, O.T. and D.S. Celermajer, *Flow-mediated dilatation*. Br J Clin Pharmacol, 2000. **50**(5): p. 397-404.
84. 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.
85. Bhatia, R.S., et al., *Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study*. N Engl J Med, 2006. **355**(3): p. 260-9.
86. Holubarsch, C., et al., *Existence of the Frank-Starling mechanism in the failing human heart. Investigations on the organ, tissue, and sarcomere levels*. Circulation, 1996. **94**(4): p. 683-9.
87. Hoffman, E.W., *Basics of cardiovascular hemodynamic monitoring*. Drug Intell Clin Pharm, 1982. **16**(9): p. 657-64.

88. Lee, D.S., et al., *Relation of disease pathogenesis and risk factors to heart failure with preserved or reduced ejection fraction: insights from the framingham heart study of the national heart, lung, and blood institute*. *Circulation*, 2009. **119**(24): p. 3070-7.
89. Vasan, R.S., et al., *Congestive heart failure in subjects with normal versus reduced left ventricular ejection fraction: prevalence and mortality in a population-based cohort*. *J Am Coll Cardiol*, 1999. **33**(7): p. 1948-55.
90. Fonarow, G.C., et al., *Characteristics, treatments, and outcomes of patients with preserved systolic function hospitalized for heart failure: a report from the OPTIMIZE-HF Registry*. *J Am Coll Cardiol*, 2007. **50**(8): p. 768-77.
91. Kitzman, D.W., et al., *Pathophysiological characterization of isolated diastolic heart failure in comparison to systolic heart failure*. *JAMA*, 2002. **288**(17): p. 2144-50.
92. Lympelopoulos, A., G. Rengo, and W.J. Koch, *Adrenal adrenoceptors in heart failure: fine-tuning cardiac stimulation*. *Trends Mol Med*, 2007. **13**(12): p. 503-11.
93. Lympelopoulos, A., G. Rengo, and W.J. Koch, *Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy*. *Circ Res*, 2013. **113**(6): p. 739-53.
94. Triposkiadis, F., et al., *The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications*. *J Am Coll Cardiol*, 2009. **54**(19): p. 1747-62.
95. Lympelopoulos, A., *Ischemic emergency?: endothelial cells have their own "adrenaline shot" at hand*. *Hypertension*, 2012. **60**(1): p. 12-4.
96. Thibonnier, M., *Signal transduction of V1-vascular vasopressin receptors*. *Regul Pept*, 1992. **38**(1): p. 1-11.
97. Goldsmith, S.R. and M. Gheorghide, *Vasopressin antagonism in heart failure*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **46**(10): p. 1785-91.
98. Thibonnier, M., et al., *Molecular pharmacology of human vasopressin receptors*. *Adv Exp Med Biol*, 1998. **449**: p. 251-76.
99. Reid, I.A., *Role of vasopressin deficiency in the vasodilation of septic shock*. *Circulation*, 1997. **95**(5): p. 1108-10.

100. Investigators, S., et al., *Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure*. N Engl J Med, 1991. **325**(5): p. 293-302.
101. Yanagisawa, M., et al., *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells*. Nature, 1988. **332**(6163): p. 411-5.
102. Rich, S. and V.V. McLaughlin, *Endothelin receptor blockers in cardiovascular disease*. Circulation, 2003. **108**(18): p. 2184-90.
103. Luscher, T.F. and M. Barton, *Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs*. Circulation, 2000. **102**(19): p. 2434-40.
104. Ivy, D., et al., *Endothelin B receptor deficiency potentiates ET-1 and hypoxic pulmonary vasoconstriction*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **280**(5): p. L1040-8.
105. Nishida, M., et al., *Role of endothelin ETB receptor in the pathogenesis of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. Eur J Pharmacol, 2004. **496**(1-3): p. 159-65.
106. Giaid, A., et al., *Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension*. N Engl J Med, 1993. **328**(24): p. 1732-9.
107. Rubens, C., et al., *Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension*. Chest, 2001. **120**(5): p. 1562-9.
108. Daniels, L.B. and A.S. Maisel, *Natriuretic peptides*. J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(25): p. 2357-68.
109. Mallick, A. and J.L. Januzzi, Jr., *Biomarkers in acute heart failure*. Rev Esp Cardiol (Engl Ed), 2015. **68**(6): p. 514-25.
110. Tzikas, S., et al., *MR-proANP and MR-proADM for risk stratification of patients with acute chest pain*. Heart, 2013. **99**(6): p. 388-95.
111. Tang, W.H., et al., *National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: clinical utilization of cardiac biomarker testing in heart failure*. Clin Biochem, 2008. **41**(4-5): p. 210-21.
112. Heart Failure Society Of, A., *HFSA 2006 Comprehensive Heart Failure Practice Guideline*. J Card Fail, 2006. **12**(1): p. e1-2.

113. Maisel, A.S., et al., *Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure*. N Engl J Med, 2002. **347**(3): p. 161-7.
114. Tang, W.H., et al., *Plasma B-type natriuretic peptide levels in ambulatory patients with established chronic symptomatic systolic heart failure*. Circulation, 2003. **108**(24): p. 2964-6.
115. Jourdain, P., et al., *Plasma brain natriuretic peptide-guided therapy to improve outcome in heart failure: the STARS-BNP Multicenter Study*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(16): p. 1733-9.
116. Omland, T., et al., *Prognostic value of B-Type natriuretic peptides in patients with stable coronary artery disease: the PEACE Trial*. J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(3): p. 205-14.
117. Logeart, D., et al., *Predischarge B-type natriuretic peptide assay for identifying patients at high risk of re-admission after decompensated heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(4): p. 635-41.
118. Fonarow, G.C., et al., *Admission B-type natriuretic peptide levels and in-hospital mortality in acute decompensated heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(19): p. 1943-50.
119. Vickery, S., et al., *B-type natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal proBNP in patients with CKD: relationship to renal function and left ventricular hypertrophy*. Am J Kidney Dis, 2005. **46**(4): p. 610-20.
120. Januzzi, J.L., Jr., et al., *The N-terminal Pro-BNP investigation of dyspnea in the emergency department (PRIDE) study*. Am J Cardiol, 2005. **95**(8): p. 948-54.
121. Cannon, P.J., *Prostaglandins in congestive heart failure and the effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. Am J Med, 1986. **81**(2B): p. 123-32.
122. Packer, M., *Neurohormonal interactions and adaptations in congestive heart failure*. Circulation, 1988. **77**(4): p. 721-30.
123. Lilly, L.S., et al., *Hyponatremia in congestive heart failure: implications for neurohumoral activation and responses to orthostasis*. J Clin Endocrinol Metab, 1984. **59**(5): p. 924-30.
124. Dzau, V.J., et al., *Prostaglandins in severe congestive heart failure. Relation to activation of the renin--angiotensin system and hyponatremia*. N Engl J Med, 1984. **310**(6): p. 347-52.

125. Packer, M., *Interaction of prostaglandins and angiotensin II in the modulation of renal function in congestive heart failure*. *Circulation*, 1988. **77**(6 Pt 2): p. 164-73.
126. Raines, K.W., et al., *Importance of nitric oxide synthase in the control of infection by Bacillus anthracis*. *Infect Immun*, 2006. **74**(4): p. 2268-76.
127. Rafikov, R., et al., *eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity*. *J Endocrinol*, 2011. **210**(3): p. 271-84.
128. Sulowska, Z., et al., *Flow cytometric evaluation of human neutrophil apoptosis during nitric oxide generation in vitro: the role of exogenous antioxidants*. *Mediators Inflamm*, 2005. **2005**(2): p. 81-7.
129. Kolluru, G.K., J.H. Siamwala, and S. Chatterjee, *eNOS phosphorylation in health and disease*. *Biochimie*, 2010. **92**(9): p. 1186-98.
130. Murphy, S.P., et al., *Inflammation in Heart Failure: JACC State-of-the-Art Review*. *J Am Coll Cardiol*, 2020. **75**(11): p. 1324-1340.
131. Rauchhaus, M., et al., *Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure*. *Circulation*, 2000. **102**(25): p. 3060-7.
132. Mann, D.L., *Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future*. *Circ Res*, 2002. **91**(11): p. 988-98.
133. Carlstedt, F., L. Lind, and B. Lindahl, *Proinflammatory cytokines, measured in a mixed population on arrival in the emergency department, are related to mortality and severity of disease*. *J Intern Med*, 1997. **242**(5): p. 361-5.
134. Sharma, R., A.J. Coats, and S.D. Anker, *The role of inflammatory mediators in chronic heart failure: cytokines, nitric oxide, and endothelin-1*. *Int J Cardiol*, 2000. **72**(2): p. 175-86.
135. Ide, T., et al., *Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium*. *Circ Res*, 2000. **86**(2): p. 152-7.
136. Anker, S.D. and M. Rauchhaus, *Insights into the pathogenesis of chronic heart failure: immune activation and cachexia*. *Curr Opin Cardiol*, 1999. **14**(3): p. 211-6.
137. Saadeddin, S.M., M.A. Habbab, and G.A. Ferns, *Markers of inflammation and coronary artery disease*. *Med Sci Monit*, 2002. **8**(1): p. RA5-12.

138. Tsutamoto, T., et al., *Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure*. J Am Coll Cardiol, 1998. **31**(2): p. 391-8.
139. Devaux, B., et al., *Upregulation of cell adhesion molecules and the presence of low grade inflammation in human chronic heart failure*. Eur Heart J, 1997. **18**(3): p. 470-9.
140. Hasper, D., et al., *Systemic inflammation in patients with heart failure*. Eur Heart J, 1998. **19**(5): p. 761-5.
141. Berton, G., et al., *C-reactive protein in acute myocardial infarction: association with heart failure*. Am Heart J, 2003. **145**(6): p. 1094-101.
142. Valgimigli, M., et al., *Hydroxyl radical generation, levels of tumor necrosis factor-alpha, and progression to heart failure after acute myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(11): p. 2000-8.
143. Ferrari, R., et al., *Tumor necrosis factor soluble receptors in patients with various degrees of congestive heart failure*. Circulation, 1995. **92**(6): p. 1479-86.
144. 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.
145. Steyers, C.M., 3rd and F.J. Miller, Jr., *Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(7): p. 11324-49.
146. Vitiello, D., et al., *Changes in cardiopulmonary reserve and peripheral arterial function concomitantly with subclinical inflammation and oxidative stress in patients with heart failure with preserved ejection fraction*. Int J Vasc Med, 2014. **2014**: p. 917271.
147. de Denus, S., et al., *Differences in biomarkers in patients with heart failure with a reduced vs a preserved left ventricular ejection fraction*. Can J Cardiol, 2012. **28**(1): p. 62-8.
148. Burke, M.A., et al., *Prognostic importance of pathophysiologic markers in patients with heart failure and preserved ejection fraction*. Circ Heart Fail, 2014. **7**(2): p. 288-99.

149. Zile, M.R. and C.F. Baicu, *Biomarkers of diastolic dysfunction and myocardial fibrosis: application to heart failure with a preserved ejection fraction*. J Cardiovasc Transl Res, 2013. **6**(4): p. 501-15.
150. Mallat, Z., et al., *Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure*. Circulation, 1998. **97**(16): p. 1536-9.
151. Sorescu, D. and K.K. Griendling, *Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure*. Congest Heart Fail, 2002. **8**(3): p. 132-40.
152. 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.
153. van Veldhuisen, D.J., et al., *B-type natriuretic peptide and prognosis in heart failure patients with preserved and reduced ejection fraction*. J Am Coll Cardiol, 2013. **61**(14): p. 1498-506.
154. Bishu, K., et al., *Biomarkers in acutely decompensated heart failure with preserved or reduced ejection fraction*. Am Heart J, 2012. **164**(5): p. 763-770 e3.
155. Braunwald, E., *Heart failure*. JACC Heart Fail, 2013. **1**(1): p. 1-20.
156. Tsutamoto, T., et al., *Attenuation of compensation of endogenous cardiac natriuretic peptide system in chronic heart failure: prognostic role of plasma brain natriuretic peptide concentration in patients with chronic symptomatic left ventricular dysfunction*. Circulation, 1997. **96**(2): p. 509-16.
157. Bhella, P.S., et al., *Abnormal haemodynamic response to exercise in heart failure with preserved ejection fraction*. Eur J Heart Fail, 2011. **13**(12): p. 1296-304.
158. Horwich, T.B., et al., *Cardiac troponin I is associated with impaired hemodynamics, progressive left ventricular dysfunction, and increased mortality rates in advanced heart failure*. Circulation, 2003. **108**(7): p. 833-8.

159. Wilson, S.R., et al., *Detection of myocardial injury in patients with unstable angina using a novel nanoparticle cardiac troponin I assay: observations from the PROTECT-TIMI 30 Trial.* Am Heart J, 2009. **158**(3): p. 386-91.
160. Xue, Y., et al., *Serial changes in high-sensitive troponin I predict outcome in patients with decompensated heart failure.* Eur J Heart Fail, 2011. **13**(1): p. 37-42.
161. Iqbal, N., et al., *Cardiac biomarkers: new tools for heart failure management.* Cardiovasc Diagn Ther, 2012. **2**(2): p. 147-64.
162. Kehl, D.W., et al., *Biomarkers in acute myocardial injury.* Transl Res, 2012. **159**(4): p. 252-64.
163. Arimoto, T., et al., *Prognostic value of elevated circulating heart-type fatty acid binding protein in patients with congestive heart failure.* J Card Fail, 2005. **11**(1): p. 56-60.
164. Hoffmann, U., et al., *Ischemic biomarker heart-type fatty acid binding protein (hFABP) in acute heart failure - diagnostic and prognostic insights compared to NT-proBNP and troponin I.* BMC Cardiovasc Disord, 2015. **15**: p. 50.
165. Sproston, N.R. and J.J. Ashworth, *Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection.* Front Immunol, 2018. **9**: p. 754.
166. Du Clos, T.W. and C. Mold, *C-reactive protein: an activator of innate immunity and a modulator of adaptive immunity.* Immunol Res, 2004. **30**(3): p. 261-77.
167. Pepys, M.B., et al., *Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease.* Nature, 2006. **440**(7088): p. 1217-21.
168. Pradhan, A.D., et al., *C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus.* JAMA, 2001. **286**(3): p. 327-34.
169. Baumeister, D., et al., *Childhood trauma and adulthood inflammation: a meta-analysis of peripheral C-reactive protein, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha.* Mol Psychiatry, 2016. **21**(5): p. 642-9.
170. Kaneko, K., et al., *C-Reactive protein in dilated cardiomyopathy.* Cardiology, 1999. **91**(4): p. 215-9.
171. Anker, S.D. and S. von Haehling, *Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview.* Heart, 2004. **90**(4): p. 464-70.

172. Yin, W.H., et al., *Independent prognostic value of elevated high-sensitivity C-reactive protein in chronic heart failure*. Am Heart J, 2004. **147**(5): p. 931-8.
173. Dickstein, K., *C-reactive protein in ischaemic cardiomyopathy: assessing vascular risk in heart failure*. Eur Heart J, 2005. **26**(21): p. 2218-9.
174. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem J, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.
175. Baune, B.T., et al., *Systemic inflammation (Interleukin 6) predicts all-cause mortality in men: results from a 9-year follow-up of the MEMO Study*. Age (Dordr), 2011. **33**(2): p. 209-17.
176. Jugdutt, B.I., *Preventing adverse remodeling and rupture during healing after myocardial infarction in mice and humans*. Circulation, 2010. **122**(2): p. 103-5.
177. Baggiolini, M., A. Walz, and S.L. Kunkel, *Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils*. J Clin Invest, 1989. **84**(4): p. 1045-9.
178. Colditz, I., et al., *In vivo inflammatory activity of neutrophil-activating factor, a novel chemotactic peptide derived from human monocytes*. Am J Pathol, 1989. **134**(4): p. 755-60.
179. Colditz, I.G., R.D. Zwahlen, and M. Baggiolini, *Neutrophil accumulation and plasma leakage induced in vivo by neutrophil-activating peptide-1*. J Leukoc Biol, 1990. **48**(2): p. 129-37.
180. March, C.J., et al., *Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs*. Nature, 1985. **315**(6021): p. 641-7.
181. Lomedico, P.T., et al., *Cloning and expression of murine interleukin-1 cDNA in Escherichia coli*. Nature, 1984. **312**(5993): p. 458-62.
182. Huisig, M.O., et al., *The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines; IL-18 in teleost fish*. Dev Comp Immunol, 2004. **28**(5): p. 395-413.
183. Allan, S.M., P.J. Tyrrell, and N.J. Rothwell, *Interleukin-1 and neuronal injury*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(8): p. 629-40.

184. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.
185. Tavazzi, L., *Clinical epidemiology of acute myocardial infarction*. Am Heart J, 1999. **138**(2 Pt 2): p. S48-54.
186. Zee, R.Y., et al., *IL-1 cluster genes and occurrence of post-percutaneous transluminal coronary angioplasty restenosis: a prospective, angiography-based evaluation*. Atherosclerosis, 2003. **171**(2): p. 259-64.
187. Elhage, R., et al., *Differential effects of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein on fatty-streak formation in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation, 1998. **97**(3): p. 242-4.
188. Isoda, K., et al., *Lack of interleukin-1 receptor antagonist modulates plaque composition in apolipoprotein E-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(6): p. 1068-73.
189. Nicklin, M.J., et al., *Arterial inflammation in mice lacking the interleukin 1 receptor antagonist gene*. J Exp Med, 2000. **191**(2): p. 303-12.
190. Henke, P.K., et al., *Viral IL-10 gene transfer decreases inflammation and cell adhesion molecule expression in a rat model of venous thrombosis*. J Immunol, 2000. **164**(4): p. 2131-41.
191. Mallat, Z., et al., *Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis*. Circ Res, 1999. **85**(8): p. e17-24.
192. Caligiuri, G., et al., *Interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis, and low-density lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice*. Mol Med, 2003. **9**(1-2): p. 10-7.
193. Potteaux, S., et al., *Leukocyte-derived interleukin 10 is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(8): p. 1474-8.
194. Batlle, M., et al., *Decreased expression of thrombospondin-1 in failing hearts may favor ventricular remodeling*. Transplant Proc, 2009. **41**(6): p. 2231-3.

195. Hofmann, U., et al., *Interleukin-13 deficiency aggravates healing and remodeling in male mice after experimental myocardial infarction*. *Circ Heart Fail*, 2014. **7**(5): p. 822-30.
196. Mehta, P.K. and K.K. Griendling, *Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **292**(1): p. C82-97.
197. Dzau, V.J., et al., *The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data*. *Am J Cardiol*, 2001. **88**(9A): p. 1L-20L.
198. Brown, N.J. and D.E. Vaughan, *Angiotensin-converting enzyme inhibitors*. *Circulation*, 1998. **97**(14): p. 1411-20.
199. Salazar, N.C., J. Chen, and H.A. Rockman, *Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1768**(4): p. 1006-18.
200. Hubbard, K.B. and J.R. Hepler, *Cell signalling diversity of the Gqalpha family of heterotrimeric G proteins*. *Cell Signal*, 2006. **18**(2): p. 135-50.
201. Dzau, V.J., *Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis*. *Hypertension*, 2001. **37**(4): p. 1047-52.
202. Uretsky, B.F., et al., *Modulation of hemodynamic effects with a converting enzyme inhibitor: acute hemodynamic dose-response relationship of a new angiotensin converting enzyme inhibitor, lisinopril, with observations on long-term clinical, functional, and biochemical responses*. *Am Heart J*, 1988. **116**(2 Pt 1): p. 480-8.
203. Stone, C.K., et al., *Hemodynamic effects of lisinopril after long-term administration in congestive heart failure*. *Am J Cardiol*, 1989. **63**(9): p. 567-70.
204. Ader, R., et al., *Immediate and sustained hemodynamic and clinical improvement in chronic heart failure by an oral angiotensin-converting enzyme inhibitor*. *Circulation*, 1980. **61**(5): p. 931-7.
205. LeJemtel, T.H., et al., *Hemodynamic effects of captopril in patients with severe chronic heart failure*. *Am J Cardiol*, 1982. **49**(6): p. 1484-8.
206. Packer, M., N. Medina, and M. Yushak, *Comparative hemodynamic and clinical effects of long-term treatment with prazosin and captopril for severe chronic congestive heart*

- failure secondary to coronary artery disease or idiopathic dilated cardiomyopathy.* Am J Cardiol, 1986. **57**(15): p. 1323-7.
207. Cody, R.J., et al., *Evaluation of a long-acting converting enzyme inhibitor (enalapril) for the treatment of chronic congestive heart failure.* J Am Coll Cardiol, 1983. **1**(4): p. 1154-9.
208. Weber, K.T., *Targeting pathological remodeling: concepts of cardioprotection and reparation.* Circulation, 2000. **102**(12): p. 1342-5.
209. Struthers, A.D., *The clinical implications of aldosterone escape in congestive heart failure.* Eur J Heart Fail, 2004. **6**(5): p. 539-45.
210. Pfeffer, M.A., et al., *Effect of captopril on progressive ventricular dilatation after anterior myocardial infarction.* N Engl J Med, 1988. **319**(2): p. 80-6.
211. Pfeffer, J.M., M.A. Pfeffer, and E. Braunwald, *Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat.* Circ Res, 1985. **57**(1): p. 84-95.
212. *Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. The SOLVD Investigators.* N Engl J Med, 1992. **327**(10): p. 685-91.
213. *Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The SOLVD Investigators.* N Engl J Med, 1991. **325**(5): p. 293-302.
214. *Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group.* N Engl J Med, 1987. **316**(23): p. 1429-35.
215. Cohn, J.N., et al., *A comparison of enalapril with hydralazine-isosorbide dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure.* N Engl J Med, 1991. **325**(5): p. 303-10.
216. Abdulla, J., et al., *Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on functional class in patients with left ventricular systolic dysfunction--a meta-analysis.* Eur J Heart Fail, 2006. **8**(1): p. 90-6.
217. Pitt, B., et al., *Randomised trial of losartan versus captopril in patients over 65 with heart failure (Evaluation of Losartan in the Elderly Study, ELITE).* Lancet, 1997. **349**(9054): p. 747-52.

218. Granger, C.B., et al., *Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Alternative trial*. Lancet, 2003. **362**(9386): p. 772-6.
219. Cohn, J.N., G. Tognoni, and I. Valsartan Heart Failure Trial, *A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure*. N Engl J Med, 2001. **345**(23): p. 1667-75.
220. Maggioni, A.P., et al., *Effects of valsartan on morbidity and mortality in patients with heart failure not receiving angiotensin-converting enzyme inhibitors*. J Am Coll Cardiol, 2002. **40**(8): p. 1414-21.
221. McMurray, J.J., et al., *Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure*. N Engl J Med, 2014. **371**(11): p. 993-1004.
222. Bristow, M.R., *Mechanistic and clinical rationales for using beta-blockers in heart failure*. J Card Fail, 2000. **6**(2 Suppl 1): p. 8-14.
223. Bristow, M.R., et al., *Carvedilol produces dose-related improvements in left ventricular function and survival in subjects with chronic heart failure*. MOCHA Investigators. Circulation, 1996. **94**(11): p. 2807-16.
224. Krum, H., et al., *Double-blind, placebo-controlled study of the long-term efficacy of carvedilol in patients with severe chronic heart failure*. Circulation, 1995. **92**(6): p. 1499-506.
225. Kukin, M.L., et al., *Prospective, randomized comparison of effect of long-term treatment with metoprolol or carvedilol on symptoms, exercise, ejection fraction, and oxidative stress in heart failure*. Circulation, 1999. **99**(20): p. 2645-51.
226. *Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF)*. Lancet, 1999. **353**(9169): p. 2001-7.
227. Eichhorn, E.J. and M.R. Bristow, *The Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival (COPERNICUS) trial*. Curr Control Trials Cardiovasc Med, 2001. **2**(1): p. 20-23.
228. Packer, M., et al., *Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure*. N Engl J Med, 2001. **344**(22): p. 1651-8.

229. Pitt, B., et al., *Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction*. N Engl J Med, 2003. **348**(14): p. 1309-21.
230. Pitt, B., et al., *The EPHESUS trial: eplerenone in patients with heart failure due to systolic dysfunction complicating acute myocardial infarction. Eplerenone Post-AMI Heart Failure Efficacy and Survival Study*. Cardiovasc Drugs Ther, 2001. **15**(1): p. 79-87.
231. Pitt, B., et al., *The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators*. N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 709-17.
232. Zannad, F., et al., *Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms*. N Engl J Med, 2011. **364**(1): p. 11-21.
233. 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.
234. Zi, M., N. Carmichael, and M. Lye, *The effect of quinapril on functional status of elderly patients with diastolic heart failure*. Cardiovasc Drugs Ther, 2003. **17**(2): p. 133-9.
235. Swedberg, K., et al., *Candesartan in heart failure--assessment of reduction in mortality and morbidity (CHARM): rationale and design. Charm-Programme Investigators*. J Card Fail, 1999. **5**(3): p. 276-82.
236. Carson, P., et al., *The irbesartan in heart failure with preserved systolic function (I-PRESERVE) trial: rationale and design*. J Card Fail, 2005. **11**(8): p. 576-85.
237. Bavishi, C., et al., *Beta-blockers in heart failure with preserved ejection fraction: a meta-analysis*. Heart Fail Rev, 2015. **20**(2): p. 193-201.
238. Liu, F., et al., *Effects of beta-blockers on heart failure with preserved ejection fraction: a meta-analysis*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e90555.
239. Flather, M.D., et al., *Randomized trial to determine the effect of nebivolol on mortality and cardiovascular hospital admission in elderly patients with heart failure (SENIORS)*. Eur Heart J, 2005. **26**(3): p. 215-25.
240. 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.

241. van Veldhuisen, D.J., et al., *Beta-blockade with nebivolol in elderly heart failure patients with impaired and preserved left ventricular ejection fraction: Data From SENIORS (Study of Effects of Nebivolol Intervention on Outcomes and Rehospitalization in Seniors With Heart Failure)*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(23): p. 2150-8.
242. Redfield, M.M., et al., *Isosorbide Mononitrate in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction*. N Engl J Med, 2015. **373**(24): p. 2314-24.
243. Kannel, W.B., M. Hjortland, and W.P. Castelli, *Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study*. Am J Cardiol, 1974. **34**(1): p. 29-34.
244. Lin, S.N., et al., *Heart Failure With Type 2 Diabetes Mellitus: Association Between Antihyperglycemic Agents, Glycemic Control, and Ejection Fraction*. Front Endocrinol (Lausanne), 2020. **11**: p. 448.
245. Fang, Z.Y., J.B. Prins, and T.H. Marwick, *Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications*. Endocr Rev, 2004. **25**(4): p. 543-67.
246. Snell-Bergeon, J.K., *Diabetes: Cardiovascular benefits of metformin in T1DM*. Nat Rev Endocrinol, 2017. **13**(10): p. 565-566.
247. Packer, M., et al., *Cardiovascular and Renal Outcomes with Empagliflozin in Heart Failure*. N Engl J Med, 2020. **383**(15): p. 1413-1424.
248. McMurray, J.J.V., et al., *Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction*. N Engl J Med, 2019. **381**(21): p. 1995-2008.
249. Zinman, B., J.M. Lachin, and S.E. Inzucchi, *Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes*. N Engl J Med, 2016. **374**(11): p. 1094.
250. Neal, B., et al., *Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes*. N Engl J Med, 2017. **377**(7): p. 644-657.
251. Komoroski, B., et al., *Dapagliflozin, a novel, selective SGLT2 inhibitor, improved glycemic control over 2 weeks in patients with type 2 diabetes mellitus*. Clin Pharmacol Ther, 2009. **85**(5): p. 513-9.
252. Solini, A., et al., *Dapagliflozin acutely improves endothelial dysfunction, reduces aortic stiffness and renal resistive index in type 2 diabetic patients: a pilot study*. Cardiovasc Diabetol, 2017. **16**(1): p. 138.

253. Ferrannini, E., M. Mark, and E. Mayoux, *CV Protection in the EMPA-REG OUTCOME Trial: A "Thrifty Substrate" Hypothesis*. *Diabetes Care*, 2016. **39**(7): p. 1108-14.
254. Baartscheer, A., et al., *Empagliflozin decreases myocardial cytoplasmic Na(+) through inhibition of the cardiac Na(+)/H(+) exchanger in rats and rabbits*. *Diabetologia*, 2017. **60**(3): p. 568-573.
255. Regan, T.J., et al., *Myocardial Metabolic and Contractile Response to Glucagon and Epinephrine*. *J Lab Clin Med*, 1964. **63**: p. 638-47.
256. Lee, T.M., N.C. Chang, and S.Z. Lin, *Dapagliflozin, a selective SGLT2 Inhibitor, attenuated cardiac fibrosis by regulating the macrophage polarization via STAT3 signaling in infarcted rat hearts*. *Free Radic Biol Med*, 2017. **104**: p. 298-310.
257. Mery, P.F., et al., *Glucagon stimulates the cardiac Ca²⁺ current by activation of adenylyl cyclase and inhibition of phosphodiesterase*. *Nature*, 1990. **345**(6271): p. 158-61.
258. Jones, B.J., T. Tan, and S.R. Bloom, *Minireview: Glucagon in stress and energy homeostasis*. *Endocrinology*, 2012. **153**(3): p. 1049-54.
259. Howlett, J.G., et al., *Canadian Cardiovascular Society Consensus Conference guidelines on heart failure, update 2009: diagnosis and management of right-sided heart failure, myocarditis, device therapy and recent important clinical trials*. *Can J Cardiol*, 2009. **25**(2): p. 85-105.
260. McKelvie, R.S., et al., *The 2012 Canadian Cardiovascular Society heart failure management guidelines update: focus on acute and chronic heart failure*. *Can J Cardiol*, 2013. **29**(2): p. 168-81.
261. *Antiarrhythmics versus Implantable Defibrillators, I., A comparison of antiarrhythmic-drug therapy with implantable defibrillators in patients resuscitated from near-fatal ventricular arrhythmias*. *N Engl J Med*, 1997. **337**(22): p. 1576-83.
262. Moss, A.J., et al., *Prophylactic implantation of a defibrillator in patients with myocardial infarction and reduced ejection fraction*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(12): p. 877-83.
263. Bardy, G.H., et al., *Amiodarone or an implantable cardioverter-defibrillator for congestive heart failure*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(3): p. 225-37.

264. Borregaard, N. and J.B. Cowland, *Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte*. *Blood*, 1997. **89**(10): p. 3503-21.
265. Witko-Sarsat, V., et al., *Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects*. *Lab Invest*, 2000. **80**(5): p. 617-53.
266. Malech, H.L. and J.I. Gallin, *Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases*. *N Engl J Med*, 1987. **317**(11): p. 687-94.
267. Lieschke, G.J., et al., *Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization*. *Blood*, 1994. **84**(6): p. 1737-46.
268. Ley, K., E. Smith, and M.A. Stark, *IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes*. *Immunol Res*, 2006. **34**(3): p. 229-42.
269. Stark, M.A., et al., *Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17*. *Immunity*, 2005. **22**(3): p. 285-94.
270. von Vietinghoff, S. and K. Ley, *IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice*. *J Immunol*, 2009. **183**(2): p. 865-73.
271. Iking-Konert, C., et al., *Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils: acquisition of CD83 and other functional characteristics of dendritic cells*. *J Mol Med (Berl)*, 2001. **79**(8): p. 464-74.
272. Iking-Konert, C., et al., *Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils to dendritic-like cells at the site of inflammation in rheumatoid arthritis: evidence for activation by T cells*. *Ann Rheum Dis*, 2005. **64**(10): p. 1436-42.
273. Iking-Konert, C., et al., *Up-regulation of the dendritic cell marker CD83 on polymorphonuclear neutrophils (PMN): divergent expression in acute bacterial infections and chronic inflammatory disease*. *Clin Exp Immunol*, 2002. **130**(3): p. 501-8.
274. Kolaczkowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(3): p. 159-75.
275. Borregaard, N., O.E. Sorensen, and K. Theilgaard-Monch, *Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins*. *Trends Immunol*, 2007. **28**(8): p. 340-5.

276. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
277. Zarbock, A., et al., *Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow*. Blood, 2011. **118**(26): p. 6743-51.
278. Sadik, C.D., N.D. Kim, and A.D. Luster, *Neutrophils cascading their way to inflammation*. Trends Immunol, 2011. **32**(10): p. 452-60.
279. Sanz, M.J. and P. Kubers, *Neutrophil-active chemokines in in vivo imaging of neutrophil trafficking*. Eur J Immunol, 2012. **42**(2): p. 278-83.
280. Lee, W.L., R.E. Harrison, and S. Grinstein, *Phagocytosis by neutrophils*. Microbes Infect, 2003. **5**(14): p. 1299-306.
281. Vieira, O.V., R.J. Botelho, and S. Grinstein, *Phagosome maturation: aging gracefully*. Biochem J, 2002. **366**(Pt 3): p. 689-704.
282. Chertov, O., et al., *Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses*. Immunol Rev, 2000. **177**: p. 68-78.
283. Faurischou, M. and N. Borregaard, *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation*. Microbes Infect, 2003. **5**(14): p. 1317-27.
284. Rice, W.G., et al., *Defensin-rich dense granules of human neutrophils*. Blood, 1987. **70**(3): p. 757-65.
285. Ganz, T., et al., *Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils*. J Clin Invest, 1985. **76**(4): p. 1427-35.
286. Joiner, K.A., et al., *The opsonizing ligand on Salmonella typhimurium influences incorporation of specific, but not azurophil, granule constituents into neutrophil phagosomes*. J Cell Biol, 1989. **109**(6 Pt 1): p. 2771-82.
287. Mollinedo, F., et al., *Major co-localization of the extracellular-matrix degradative enzymes heparanase and gelatinase in tertiary granules of human neutrophils*. Biochem J, 1997. **327 (Pt 3)**: p. 917-23.
288. Cramer, E., et al., *Ultrastructural localization of lactoferrin and myeloperoxidase in human neutrophils by immunogold*. Blood, 1985. **65**(2): p. 423-32.

289. Masson, P.L., J.F. Heremans, and E. Schonke, *Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes*. J Exp Med, 1969. **130**(3): p. 643-58.
290. Oram, J.D. and B. Reiter, *Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents*. Biochim Biophys Acta, 1968. **170**(2): p. 351-65.
291. Cowland, J.B. and N. Borregaard, *The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(6): p. 989-95.
292. Lollike, K., et al., *Purification of lysozyme from human neutrophils, and development of an ELISA for quantification in cells and plasma*. Leukemia, 1995. **9**(1): p. 206-9.
293. Selsted, M.E. and R.J. Martinez, *Lysozyme: primary bactericidin in human plasma serum active against Bacillus subtilis*. Infect Immun, 1978. **20**(3): p. 782-91.
294. Tanida, N., et al., *Modification of immunopharmacological activities of synthetic monosaccharide lipid A analogue, GLA60, by lysozyme*. J Biochem, 1992. **112**(5): p. 616-23.
295. Sengelov, H., et al., *Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils*. J Immunol, 1995. **154**(8): p. 4157-65.
296. Sengelov, H., L. Kjeldsen, and N. Borregaard, *Control of exocytosis in early neutrophil activation*. J Immunol, 1993. **150**(4): p. 1535-43.
297. Lazarus, G.S., et al., *Human granulocyte collagenase*. Science, 1968. **159**(3822): p. 1483-5.
298. Borregaard, N., L.J. Miller, and T.A. Springer, *Chemoattractant-regulated mobilization of a novel intracellular compartment in human neutrophils*. Science, 1987. **237**(4819): p. 1204-6.
299. Leto, T.L. and M. Geiszt, *Role of Nox family NADPH oxidases in host defense*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(9-10): p. 1549-61.
300. Rada, B.K., et al., *Dual role of phagocytic NADPH oxidase in bacterial killing*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2947-53.
301. Rada, B.K., et al., *Consequences of the electrogenic function of the phagocytic NADPH oxidase*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005. **360**(1464): p. 2293-300.

302. Mocsai, A., *Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond*. J Exp Med, 2013. **210**(7): p. 1283-99.
303. Roos, D., R. van Bruggen, and C. Meischl, *Oxidative killing of microbes by neutrophils*. Microbes Infect, 2003. **5**(14): p. 1307-15.
304. Gougerot-Pocidallo, M.A., et al., *[Regulation of human neutrophil oxidative burst by pro- and anti-inflammatory cytokines]*. J Soc Biol, 2002. **196**(1): p. 37-46.
305. Nathan, C., *Neutrophils and immunity: challenges and opportunities*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(3): p. 173-82.
306. Scapini, P., et al., *Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein-3alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19*. Eur J Immunol, 2001. **31**(7): p. 1981-8.
307. Cassatella, M.A., *The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils*. Immunol Today, 1995. **16**(1): p. 21-6.
308. Tessier, P.A., et al., *Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha*. J Immunol, 1997. **159**(7): p. 3595-602.
309. Hachicha, M., et al., *Regulation of chemokine gene expression in human peripheral blood neutrophils phagocytosing microbial pathogens*. J Immunol, 1998. **160**(1): p. 449-54.
310. Lapinet, J.A., et al., *Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL-1beta), IL-8, macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles*. Infect Immun, 2000. **68**(12): p. 6917-23.
311. Dinarello, C.A., *Biologic basis for interleukin-1 in disease*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2095-147.
312. Driscoll, K.E., *TNFalpha and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress*. Toxicol Lett, 2000. **112-113**: p. 177-83.
313. Rich, E.A., et al., *Dyscoordinate expression of tumor necrosis factor-alpha by human blood monocytes and alveolar macrophages*. Am Rev Respir Dis, 1989. **139**(4): p. 1010-6.

314. Baggiolini, M. and I. Clark-Lewis, *Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine*. FEBS Lett, 1992. **307**(1): p. 97-101.
315. Holmes, W.E., et al., *Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor*. Science, 1991. **253**(5025): p. 1278-80.
316. Murphy, P.M. and H.L. Tiffany, *Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor*. Science, 1991. **253**(5025): p. 1280-3.
317. Moser, B. and P. Loetscher, *Lymphocyte traffic control by chemokines*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 123-8.
318. Knall, C., G.S. Worthen, and G.L. Johnson, *Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(7): p. 3052-7.
319. Glynn, P.C., E. Henney, and I.P. Hall, *The selective CXCR2 antagonist SB272844 blocks interleukin-8 and growth-related oncogene-alpha-mediated inhibition of spontaneous neutrophil apoptosis*. Pulm Pharmacol Ther, 2002. **15**(2): p. 103-10.
320. Li, A., et al., *IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3369-76.
321. MacManus, C.F., et al., *Interleukin-8 signaling promotes translational regulation of cyclin D in androgen-independent prostate cancer cells*. Mol Cancer Res, 2007. **5**(7): p. 737-48.
322. Venkatakrisnan, G., R. Salgia, and J.E. Groopman, *Chemokine receptors CXCR-1/2 activate mitogen-activated protein kinase via the epidermal growth factor receptor in ovarian cancer cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(10): p. 6868-75.
323. Luppi, F., et al., *Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation*. Lung Cancer, 2007. **56**(1): p. 25-33.
324. Kamohara, H., et al., *Induction of interleukin-8 (CXCL-8) by tumor necrosis factor-alpha and leukemia inhibitory factor in pancreatic carcinoma cells: Impact of CXCL-8 as an autocrine growth factor*. Int J Oncol, 2007. **31**(3): p. 627-32.

325. Petreaca, M.L., et al., *Transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-2 by interleukin-8 (IL-8/CXCL8) is required for IL-8/CXCL8-induced endothelial permeability*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(12): p. 5014-23.
326. Neufeld, G., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. FASEB J, 1999. **13**(1): p. 9-22.
327. Li, J., et al., *VEGF, flk-1, andflt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis*. Am J Physiol, 1996. **270**(5 Pt 2): p. H1803-11.
328. Ren, G., et al., *Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts*. J Histochem Cytochem, 2002. **50**(1): p. 71-9.
329. Stowe, A.M., et al., *VEGF protein associates to neurons in remote regions following cortical infarct*. J Cereb Blood Flow Metab, 2007. **27**(1): p. 76-85.
330. Detmar, M., et al., *Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis*. J Exp Med, 1994. **180**(3): p. 1141-6.
331. Fava, R.A., et al., *Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue*. J Exp Med, 1994. **180**(1): p. 341-6.
332. Swirski, F.K. and M. Nahrendorf, *Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(12): p. 733-744.
333. Nymo, S.H., et al., *Inflammatory cytokines in chronic heart failure: interleukin-8 is associated with adverse outcome. Results from CORONA*. Eur J Heart Fail, 2014. **16**(1): p. 68-75.
334. Ford-Hutchinson, A.W., et al., *Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes*. Nature, 1980. **286**(5770): p. 264-5.
335. Zurier, R.B., *Prostaglandin release from human polymorphonuclear leukocytes*. Adv Prostaglandin Thromboxane Res, 1976. **2**: p. 815-8.
336. Goldstein, I.M., et al., *Thromboxane generation by human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes*. J Exp Med, 1978. **148**(3): p. 787-92.

337. Dennis, E.A., *Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2*. J Biol Chem, 1994. **269**(18): p. 13057-60.
338. Clark, J.D., et al., *A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP*. Cell, 1991. **65**(6): p. 1043-51.
339. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
340. Urban, C.F., et al., *Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against Candida albicans*. PLoS Pathog, 2009. **5**(10): p. e1000639.
341. Brill, A., et al., *Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice*. J Thromb Haemost, 2012. **10**(1): p. 136-44.
342. Martinod, K., et al., *Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(21): p. 8674-9.
343. Alexandraki, K.I., et al., *Cytokine secretion in long-standing diabetes mellitus type 1 and 2: associations with low-grade systemic inflammation*. J Clin Immunol, 2008. **28**(4): p. 314-21.
344. Wong, S.L., et al., *Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing*. Nat Med, 2015. **21**(7): p. 815-9.
345. Naruko, T., et al., *Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes*. Circulation, 2002. **106**(23): p. 2894-900.
346. Ionita, M.G., et al., *High neutrophil numbers in human carotid atherosclerotic plaques are associated with characteristics of rupture-prone lesions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(9): p. 1842-8.
347. Drechsler, M., et al., *Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis*. Circulation, 2010. **122**(18): p. 1837-45.
348. Rotzius, P., et al., *Distinct infiltration of neutrophils in lesion shoulders in ApoE^{-/-} mice*. Am J Pathol, 2010. **177**(1): p. 493-500.

349. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1685-95.
350. Soehnlein, O., *Multiple roles for neutrophils in atherosclerosis*. Circ Res, 2012. **110**(6): p. 875-88.
351. Hartwig, H., et al., *Neutrophils in atherosclerosis. A brief overview*. Hamostaseologie, 2015. **35**(2): p. 121-7.
352. Taekema-Roelvink, M.E., et al., *Proteinase 3 enhances endothelial monocyte chemoattractant protein-1 production and induces increased adhesion of neutrophils to endothelial cells by upregulating intercellular cell adhesion molecule-1*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(5): p. 932-40.
353. Soehnlein, O., L. Lindbom, and C. Weber, *Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment*. Blood, 2009. **114**(21): p. 4613-23.
354. Moore, K.J. and I. Tabas, *Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis*. Cell, 2011. **145**(3): p. 341-55.
355. El Kebir, D., et al., *Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation*. Circ Res, 2008. **103**(4): p. 352-9.
356. Lenglet, S., et al., *Fatty acid amide hydrolase deficiency enhances intraplaque neutrophil recruitment in atherosclerotic mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(2): p. 215-23.
357. Carbone, F., F. Mach, and F. Montecucco, *Update on the role of neutrophils in atherosclerotic plaque vulnerability*. Curr Drug Targets, 2015. **16**(4): p. 321-33.
358. de Nooijer, R., et al., *Lesional overexpression of matrix metalloproteinase-9 promotes intraplaque hemorrhage in advanced lesions but not at earlier stages of atherogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(2): p. 340-6.
359. Gough, P.J., et al., *Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice*. J Clin Invest, 2006. **116**(1): p. 59-69.
360. Hodgson, K., et al., *Immunological mechanisms contributing to the double burden of diabetes and intracellular bacterial infections*. Immunology, 2015. **144**(2): p. 171-85.
361. King, R.J. and P.J. Grant, *Diabetes and cardiovascular disease: pathophysiology of a life-threatening epidemic*. Herz, 2016. **41**(3): p. 184-92.

362. Zurawska-Plaksej, E., et al., *Neutrophils as a Source of Chitinases and Chitinase-Like Proteins in Type 2 Diabetes*. PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0141730.
363. Olefsky, J.M. and C.K. Glass, *Macrophages, inflammation, and insulin resistance*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 219-46.
364. Talukdar, S., et al., *Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase*. Nat Med, 2012. **18**(9): p. 1407-12.
365. Wang, Y., et al., *Increased neutrophil elastase and proteinase 3 and augmented NETosis are closely associated with beta-cell autoimmunity in patients with type 1 diabetes*. Diabetes, 2014. **63**(12): p. 4239-48.
366. Sefil, F., et al., *Investigation of neutrophil lymphocyte ratio and blood glucose regulation in patients with type 2 diabetes mellitus*. J Int Med Res, 2014. **42**(2): p. 581-8.
367. Hadad, N., et al., *Induction of cytosolic phospholipase a2alpha is required for adipose neutrophil infiltration and hepatic insulin resistance early in the course of high-fat feeding*. Diabetes, 2013. **62**(9): p. 3053-63.
368. Rensen, S.S., et al., *Increased hepatic myeloperoxidase activity in obese subjects with nonalcoholic steatohepatitis*. Am J Pathol, 2009. **175**(4): p. 1473-82.
369. Omori, K., et al., *Priming of neutrophil oxidative burst in diabetes requires preassembly of the NADPH oxidase*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(1): p. 292-301.
370. Alba-Loureiro, T.C., et al., *Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus*. Braz J Med Biol Res, 2007. **40**(8): p. 1037-44.
371. Mantovani, A., et al., *Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(8): p. 519-31.
372. Tracchi, I., et al., *Increased neutrophil lifespan in patients with congestive heart failure*. Eur J Heart Fail, 2009. **11**(4): p. 378-85.
373. Li, W., et al., *Heart-resident CCR2(+) macrophages promote neutrophil extravasation through TLR9/MyD88/CXCL5 signaling*. JCI Insight, 2016. **1**(12).
374. Shinagawa, H. and S. Frantz, *Cellular immunity and cardiac remodeling after myocardial infarction: role of neutrophils, monocytes, and macrophages*. Curr Heart Fail Rep, 2015. **12**(3): p. 247-54.

375. Weirather, J., et al., *Foxp3+ CD4+ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation*. *Circ Res*, 2014. **115**(1): p. 55-67.
376. Cui, Y., et al., *Circulating microparticles in patients with coronary heart disease and its correlation with interleukin-6 and C-reactive protein*. *Mol Biol Rep*, 2013. **40**(11): p. 6437-42.
377. Welsh, J.A., et al., *Extracellular Vesicle Flow Cytometry Analysis and Standardization*. *Front Cell Dev Biol*, 2017. **5**: p. 78.
378. Mooberry, M.J. and N.S. Key, *Microparticle analysis in disorders of hemostasis and thrombosis*. *Cytometry A*, 2016. **89**(2): p. 111-22.
379. Berezin, A.E., et al., *Pattern of endothelial progenitor cells and apoptotic endothelial cell-derived microparticles in chronic heart failure patients with preserved and reduced left ventricular ejection fraction*. *EBioMedicine*, 2016. **4**: p. 86-94.
380. Pitanga, T.N., et al., *Neutrophil-derived microparticles induce myeloperoxidase-mediated damage of vascular endothelial cells*. *BMC Cell Biol*, 2014. **15**: p. 21.
381. Sinning, J.M., et al., *Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes*. *Eur Heart J*, 2011. **32**(16): p. 2034-41.
382. Dick, S.A. and S. Epelman, *Chronic Heart Failure and Inflammation: What Do We Really Know?* *Circ Res*, 2016. **119**(1): p. 159-76.
383. White, M., et al., *Cardiac signaling molecules and plasma biomarkers after cardiac transplantation: impact of tacrolimus versus cyclosporine*. *J Heart Lung Transplant*, 2013. **32**(12): p. 1222-32.
384. Maack, C., et al., *Heart failure and diabetes: metabolic alterations and therapeutic interventions: a state-of-the-art review from the Translational Research Committee of the Heart Failure Association-European Society of Cardiology*. *Eur Heart J*, 2018. **39**(48): p. 4243-4254.
385. McHugh, K., et al., *Heart Failure With Preserved Ejection Fraction and Diabetes: JACC State-of-the-Art Review*. *J Am Coll Cardiol*, 2019. **73**(5): p. 602-611.

386. Arruda-Olson, A.M., et al., *Neutrophilia predicts death and heart failure after myocardial infarction: a community-based study*. Circ Cardiovasc Qual Outcomes, 2009. **2**(6): p. 656-62.
387. Durmus, E., et al., *Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Platelet-to-Lymphocyte Ratio are Predictors of Heart Failure*. Arq Bras Cardiol, 2015. **105**(6): p. 606-13.
388. Xu, X.H., et al., *VEGF attenuates development from cardiac hypertrophy to heart failure after aortic stenosis through mitochondrial mediated apoptosis and cardiomyocyte proliferation*. J Cardiothorac Surg, 2011. **6**: p. 54.
389. Taimeh, Z., et al., *Vascular endothelial growth factor in heart failure*. Nat Rev Cardiol, 2013. **10**(9): p. 519-30.
390. Adamcova, M. and F. Simko, *Multiplex biomarker approach to cardiovascular diseases*. Acta Pharmacol Sin, 2018. **39**(7): p. 1068-1072.
391. Tao, Z., et al., *Coexpression of VEGF and angiopoietin-1 promotes angiogenesis and cardiomyocyte proliferation reduces apoptosis in porcine myocardial infarction (MI) heart*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(5): p. 2064-9.
392. Zisa, D., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a key therapeutic trophic factor in bone marrow mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **390**(3): p. 834-8.
393. Baumgartner, I. and J.M. Isner, *Stimulation of peripheral angiogenesis by vascular endothelial growth factor (VEGF)*. Vasa, 1998. **27**(4): p. 201-6.
394. Pearlman, J.D., et al., *Magnetic resonance mapping demonstrates benefits of VEGF-induced myocardial angiogenesis*. Nat Med, 1995. **1**(10): p. 1085-9.
395. Chou, M.T., J. Wang, and D.J. Fujita, *Src kinase becomes preferentially associated with the VEGFR, KDR/Flk-1, following VEGF stimulation of vascular endothelial cells*. BMC Biochem, 2002. **3**: p. 32.
396. Gupta, N., et al., *Diabetic retinopathy and VEGF*. Open Ophthalmol J, 2013. **7**: p. 4-10.
397. Cheng, D., et al., *Vascular endothelial growth factor in pleural fluid*. Chest, 1999. **116**(3): p. 760-5.

398. Arakawa, H., et al., *Decreased serum vascular endothelial growth factor concentrations in patients with congestive heart failure*. *Heart*, 2003. **89**(2): p. 207-8.
399. Chirinos, J.A. and P. Zamani, *The Nitrate-Nitrite-NO Pathway and Its Implications for Heart Failure and Preserved Ejection Fraction*. *Curr Heart Fail Rep*, 2016. **13**(1): p. 47-59.
400. Seta, Y., et al., *Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis*. *J Card Fail*, 1996. **2**(3): p. 243-9.
401. Vulesevic, B., et al., *CRP Induces NETosis in Heart Failure Patients with or without Diabetes*. *Immunohorizons*, 2019. **3**(8): p. 378-388.

