



**HAL**  
open science

## Recherche de biomarqueurs pronostiques dans l'insuffisance cardiaque

Gilles Lemesle

► **To cite this version:**

Gilles Lemesle. Recherche de biomarqueurs pronostiques dans l'insuffisance cardiaque. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2015. Français. NNT : 2015LIL2S028 . tel-01326631

**HAL Id: tel-01326631**

**<https://theses.hal.science/tel-01326631>**

Submitted on 4 Jun 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE LILLE 2  
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE – SANTE DE LILLE**

**THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE  
en Sciences de la Vie et de la Santé**

**RECHERCHE DE BIOMARQUEURS PRONOSTIQUES  
DANS L'INSUFFISANCE CARDIAQUE**

Soutenue publiquement le 8 avril 2015 par

**Gilles Lemesle**

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Philippe AMOUYEL  
Monsieur le Professeur Fabrice PRUNIER  
Monsieur le Professeur Patrick ROSSIGNOL  
Monsieur le Docteur Philippe ROUET  
Madame le Docteur Florence PINET  
Monsieur le Professeur Christophe BAUTERS

Président du Jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse

# Remerciements

Je dédie ce travail,

A mon président de thèse,  
Monsieur le Professeur Philippe AMOUYEL,

*Vous me faites l'honneur de présider cette thèse.*

*Vous m'avez accueilli au sein de l'unité INSERM UMR 1167, dans votre laboratoire  
d'Epidémiologie et de Santé publique. Merci de votre confiance.*

*Soyez assuré de mon plus profond respect.*

A mon directeur de thèse,  
Monsieur le Professeur Christophe BAUTERS,

*Votre disponibilité et vos conseils toujours avisés ont beaucoup compté dans mon cursus.*

*Votre rigueur scientifique reste pour moi un exemple.*

*J'ai eu la chance de pouvoir réaliser cette thèse sous votre direction.*

*Merci de votre soutien.*

*Que ce travail soit le reflet de ma reconnaissance et de mon plus profond respect.*

A mes juges,  
Madame le Docteur Florence PINET,

*Votre dynamisme, votre disponibilité et vos conseils m'ont aidé à mener à bien ce travail.*

*Sans vous rien de tout cela n'aurait été possible.*

*Merci de votre aide précieuse.*

*Que ce travail soit le reflet de ma reconnaissance et de mon plus profond respect.*

Monsieur le Professeur Patrick ROSSIGNOL,  
Monsieur le Professeur Fabrice PRUNIER,  
Monsieur le Docteur Philippe ROUET,

*Vous me faites l'honneur d'accepter de juger mon travail.*

*Soyez assurés de mon plus profond respect.*

A mes confrères,  
Monsieur le Docteur de GROOTE

*Ton approche clinique et ta rigueur sont pour moi un exemple.  
Merci pour ton aide inestimable dans la réalisation de ce travail.*

Monsieur le Professeur LAMBLIN,

*Ton amitié, ton expérience et tes conseils ont été très précieux.  
Je t'en suis très reconnaissant. Merci de ton soutien.  
Je me réjouis de pouvoir continuer à travailler à tes côtés.*

Marjorie, Guillaume, Philou, Cédric, Augustin, Henri, et Arnaud

*Je vous remercie pour votre soutien, votre simplicité et votre sympathie.  
Plus que des confrères, je vous considère comme de véritables amis.  
Ah oui, j'allais oublié, merci pour les petites soirées ...*

Tous les membres de l'unité INSERM UMR 1167,

*Merci pour votre sympathie, votre bonne humeur et votre accueil.*

*Avec une mention toute particulière pour Olivia qui m'a initié à l'analyse protéomique et au SELDI-TOF-MS et pour Fleur, la spécialiste des analyses statistiques. Sans vous, ce travail n'aurait jamais pu être réalisé. Merci également à Xavier, Maggy, Marion, Annie et Lionel.*

Tous les membres du centre hémodynamique,

*Merci pour votre sympathie, votre bonne humeur et votre accueil.*

Tous les membres du service des soins intensifs de Cardiologie,

*Merci pour votre sympathie, votre bonne humeur et votre accueil.*

A ma femme, Magalie,

*Merci pour ta patience tout au long de ces années.*

*Tu m'as toujours soutenu et encouragé au cours de mon cursus professionnel.*

*T'avoir à mes côtés est un réel bonheur.*

*Tu m'as aussi fait le plus beau cadeau, notre petite puce ... Léa*

A ma puce ... Léa,

*Mon rayon de soleil et ma joie de vivre.*

*Merci pour les bisous, les câlins, les rires, les jeux et les guiliguilis ...*

A mes parents, Maman, Papa,

*Vous m'avez toujours aidé, soutenu et encouragé.*

*Sans vous, rien n'aurait été possible.*

A mes frères, Vincent et Benoît, et mes belles sœurs, Manuella et Pauline,

*Merci de m'avoir supporté dans les moments difficiles.*

*Je vous souhaite une vie pleine de bonheur.*

A mes filleuls et ma nièce, Tino, Lou-Ann, Enzo et bébé

*Je vous souhaite tout le bonheur du monde.*

A mes beaux-parents, Régine et Jean-Luc,

*Pour votre soutien et vos encouragements.*

A ma belle-sœur, Sandrine,

*Pour ta sympathie.*

# Liste des publications et des communications

## Publications

- Fertin M, Lemesle G, Turkieh A, Beseme O, Chwastyniak M, Amouyel P, Bauters C, Pinet F. Serum MMP-8: a novel indicator of left ventricular remodeling and cardiac outcome in patients after acute myocardial infarction. *PLoS One* 2013;8:e71280.
- Kumarswamy R, Bauters C, Volkmann I, Maury F, Fetisch J, Holzmann A, Lemesle G, de Groote P, Pinet F, Thum T. Circulating long noncoding RNA, LIPCAR, predicts survival in patients with heart failure. *Circ Res* 2014;114:1569-75.
- Lemesle G, Maury F, Beseme O, Ovarit L, Amouyel P, Lamblin N, de Groote P, Bauters C, Pinet F. Multimarker Proteomic Profiling For The Prediction Of Cardiovascular Mortality In Patients With Chronic Heart Failure. *PLoS One*. Sous presse.
- Schurtz G, Lamblin N, Bauters C, Goldstein P, Lemesle G. Copeptin in acute coronary syndrome and heart failure management: state of the art and future directions. *ACVD*. Soumis pour publication.

## Communications orales

- Gilles Lemesle, Fleur Maury, Olivia Beseme, Lionel Ovarit, Marion Bouvet, Aude Belliard, Annie Turkieh, Philippe Amouyel, Pascal De Groote, Nicolas Lamblin, Marie Fertin, Christophe Bauters, Florence Pinet. A Proteomic Score Improves Risk Stratification in Stable Chronic Heart Failure Patients. Congrès JESFC, Paris, France, 2015

## Communications affichées

- Gilles Lemesle, Fleur Maury, Olivia Beseme, Lionel Ovarit, Marion Bouvet, Aude Belliard, Annie Turkieh, Philippe Amouyel, Pascal De Groote, Christophe Bauters, Florence Pinet. SELDI-TOF-MS Peaks identified as independent biomarkers of mid-term cardiac mortality in patients with stable chronic heart failure: Design and validation of a statistical score. Congrès ESC, Barcelona, Spain, 2014

- Gilles Lemesle, Olivia Beseme, Fleur Maury, Lionel Ouart, Marion Bouvet, Aude Belliard, Annie Turkieh, Philippe Amouyel, Pascal De Groot, Christophe Bauters, Florence Pinet. The m/z peaks 113729, 15150, 29000 and 28321 identified as independent prognostic biomarkers in plasma of patients with stable chronic heart failure: A SELDI-TOF-MS analysis.  
Congrès du Printemps de la Cardiologie, Strasbourg, France, 2014
  
- Gilles Lemesle, Olivia Beseme, Fleur Maury, Lionel Ouart, Marion Bouvet, Nicolas Lamblin, Annie Turkieh, Philippe Amouyel, Pascal De Groot, Christophe Bauters, Florence Pinet. Is the use of several proteinchip arrays worth it for proteomic profiling using the surface enhanced laser desorption ionization - time of flight - mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) technique?  
Congrès du Printemps de la Cardiologie, Toulouse, France, 2015

# Résumé

**Rationnel** – La stratification du risque des patients atteints d'insuffisance cardiaque (IC) systolique chronique est essentielle afin d'identifier ceux qui pourront bénéficier de stratégies invasives telles que la transplantation cardiaque. En dépit des avancées récentes, cette stratification nécessite d'être encore améliorée. En effet, certains patients caractérisés à faible risque vont décéder précocement ; et inversement, d'autres identifiés à haut risque auront une survie prolongée.

**Objectif** – Notre objectif était d'étudier la place d'une analyse protéomique du plasma dans la stratification du risque des patients IC et de découvrir des biomarqueurs circulants associés à la mortalité cardiovasculaire précoce de ces patients.

**Méthodes et résultats** – Pour ce faire, nous avons d'abord conçu 2 populations : une population test et une de validation. Ces 2 populations étaient issues de la population INsuffisance CARdique (INCA) constituée de l'ensemble des patients référés dans le service de cardiologie dirigé par le docteur de Grootte pour une évaluation pronostique extensive d'une IC systolique chronique (FEVG <45%) entre novembre 1998 et mai 2010. Pour la phase test (population cas/témoins), nous avons sélectionné 198 patients entre novembre 1998 et décembre 2005 : 99 patients décédés de cause cardiovasculaire dans les 3 ans suivant l'inclusion (cas) ont été comparés à 99 survivants à 3 ans appariés sur l'âge, le sexe et la cause de l'IC (témoins). Pour la phase de validation, nous avons évalué une cohorte de 344 patients consécutifs inclus entre janvier 2006 et mai 2010. Chaque patient a eu un bilan cardiaque exhaustif. La mortalité cardiovasculaire était définie comme un décès de cause cardiovasculaire, une transplantation en urgence (critère *United Network for Organ Sharing status 1*) ou une assistance cardiaque en urgence.

Une analyse protéomique utilisant la technique SELDI-TOF-MS a ensuite été réalisée dans la population test sur des échantillons de plasma prélevés à l'inclusion. Les échantillons ont été déplétés des protéines majoritaires et analysés après randomisation en double en utilisant des puces CM10 (échange de cations) et H50 (hydrophobe).

Au total, 42 pics  $m/z$  étaient différentiellement abondants entre les cas et les témoins et ont été utilisés pour développer des scores protéomiques prédictifs de la mortalité cardiovasculaire à l'aide de 3 méthodes statistiques de régression : machine à vecteur de support, régression

des moindres carrés partiels et régression logistique de Lasso. Les scores protéomiques ont ensuite été testés dans la population de validation et étaient significativement plus élevés chez les patients qui vont décéder dans les 3 ans avec les 3 méthodes. Ces scores protéomiques persistaient associés à la mortalité cardiovasculaire après ajustement sur les facteurs confondants. De plus, l'utilisation de ces scores permettait une amélioration significative de la discrimination des patients IC par rapport à une évaluation pronostique classique selon les index suivants : « *integrated discrimination improvement* » et « *net reclassification improvement* ».

L'étape suivante a été de sélectionner les pics *m/z* significativement différenciellement abondants dans les 2 populations (test et validation) qui étaient au nombre de 13. Nous avons pu purifier, identifier et valider l'identification des protéines pour 8 de ces pics *m/z*, tous faisant partie de la famille des apolipoprotéines (Apo). Ainsi, 2 pics correspondaient à l'Apo A1, 4 pics à l'Apo C1 et 2 pics à l'Apo C3. Nous avons donc choisi de quantifier ces 3 Apos ainsi que 13 autres Apos dans la population *INCA* par une technique de spectrométrie de masse quantitative (*mass reaction monitoring*). En effet, cette technique va nous permettre de quantifier 16 Apos à partir d'un faible volume d'échantillon (40 µL).

**Conclusion** – Un profil protéomique du plasma semble améliorer la stratification du risque de mortalité précoce chez les patients atteints d'une IC chronique.

**Perspectives** – Lorsque les 16 Apos auront été quantifiées dans la population *INCA*, nous déterminerons celles qui permettent d'améliorer significativement la stratification du risque de décès de ces patients par rapport aux paramètres pronostiques déjà connus dans la littérature. Nous développerons des équations de score de risque incluant ces Apos d'intérêt.

**Mots clés** – Insuffisance cardiaque ; Pronostic ; Biomarqueurs ; Protéomique.

# Abstract

**Background** – Risk stratification of patients with systolic chronic heart failure (HF) is critical to better identify those who may benefit the most from invasive therapeutic strategies such as cardiac transplantation. In spite of recent advances, risk stratification of HF patients needs to be further improved. Indeed, there remains variability in the prognosis with some patients who are categorized at low risk but experience early mortality; and conversely, patients categorized as severe but have an unexpectedly prolonged survival. Proteomics has been used to provide prognostic information in various diseases.

**Aim** – Our aim was to investigate the potential value of plasma proteomic profiling for risk stratification in HF and to find new circulating biomarkers that are associated with early cardiovascular mortality of chronic HF patients.

**Methods and results** – For that purpose, we first designed 2 populations: a discovery and a validation population. Both populations issued from the INsuffisance CARdiaque (*INCA*) cohort, which is constituted of all consecutive patients referred to the cardiology unit leaded by doctor de Groote for extensive prognostic evaluation of systolic chronic HF (LVEF <45%) between November 1998 and May 2010. For the discovery phase (case/control population), we selected 198 patients included between November 1998 and December 2005: 99 patients who died from cardiovascular cause within 3 years after the initial evaluation (cases) were individually matched for age, sex, and HF etiology with 99 patients who were still alive at 3 years (controls). For the validation phase, we evaluated a cohort of 344 consecutive patients included between January 2006 and May 2010. Study populations were carefully phenotyped. Cardiovascular death included cardiovascular-related death, urgent transplantations defined as United Network for Organ Sharing status 1 and urgent assist device implantation.

A proteomic profiling using surface enhanced laser desorption ionization - time of flight - mass spectrometry was then performed in the case/control discovery population on plasma samples collected at inclusion. Plasma samples were depleted for major proteins and randomly analyzed in duplicate using CM10 (Weak Cation Exchanger) and H50 (Reverse Phase) proteinchip arrays. Altogether, 42 ion  $m/z$  peaks were found differentially abundant between cases and controls in the discovery population and were used to develop proteomic scores predicting cardiovascular death using 3 statistical regression methods: support vector

machine, sparse partial least square discriminant analysis and lasso logistic regression. The proteomic scores were then tested in the validation population and score levels were significantly higher in patients who subsequently died within 3 years with the 3 methods. Proteomic scores remained significantly associated with cardiovascular mortality after adjustment on confounders. Furthermore, use of the proteomic scores allowed a significant improvement in discrimination of HF patients as determined by integrated discrimination improvement and net reclassification improvement indexes on top of classic prognostic evaluation.

The next step was to select the 13 ion  $m/z$  peaks that were found significantly differentially abundant in both populations (discovery and validation). We purified, identified and validated the identification of proteins for 8 of these ion  $m/z$  peaks, all identified as apolipoproteins (Apo). Thus, 2 peaks were Apo A1, 4 peaks Apo C1 and 2 peaks Apo C3. We then decided to quantify these 3 Apos and 13 others in the *INCA* population using a technique of quantitative mass spectrometry (mass reaction monitoring). Indeed, this technique allows quantifying 16 Apos with a low quantity of sample (40  $\mu$ L).

**Conclusion** – Proteomic profiling of plasma proteins may help to improve risk prediction of early mortality in HF patients.

**Perspectives** – Once the 16 Apos will be quantified in the *INCA* population, we will determine those able to bring additional information to improve risk stratification of these patients on top of classic prognostic evaluation. We will then develop risk scores including these targeted Apos.

**Keywords** – Heart failure; prognosis; biomarkers; proteomics.

# Table des matières

<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>23</b>
<b>1.1. PARTIE 1 : L’insuffisance cardiaque gauche systolique chronique .....</b>	<b>24</b>
1.1.1. Définition .....	24
1.1.2. Epidémiologie .....	24
1.1.3. Traitement .....	25
1.1.3.1. Traitement de l’étiologie .....	25
1.1.3.2. Traitements pharmacologiques .....	25
1.1.3.2.1. Inhibiteurs de l’enzyme de conversion de l’angiotensine .....	25
1.1.3.2.2. Bêta-bloquants .....	27
1.1.3.2.3. Antagonistes du récepteur à l’aldostérone.....	28
1.1.3.2.4. Antagonistes du récepteur à l’angiotensine 2.....	29
1.1.3.2.5. Ivabradine.....	29
1.1.3.2.6. Le LCZ696 .....	30
1.1.3.2.7. Diurétiques de l’anse de Henlé.....	31
1.1.3.3. Traitements non pharmacologiques .....	31
1.1.3.3.1. La rééducation cardiaque et l’exercice physique .....	31
1.1.3.3.2. Le défibrillateur.....	32
1.1.3.3.3. La resynchronisation .....	33
1.1.3.3.4. La transplantation cardiaque .....	34
1.1.3.3.5. Les techniques d’assistance cardiaque .....	36
1.1.3.3.6. Le cœur artificiel .....	37
1.1.3.4. Synthèse sur le traitement de l’IC .....	38
1.1.4. Evaluation pronostique .....	40
1.1.4.1. Généralités.....	40
1.1.4.2. Les paramètres démographiques et cliniques.....	41
1.1.4.2.1. L’âge.....	41
1.1.4.2.2. Le sexe.....	41
1.1.4.2.3. La cause ischémique.....	41
1.1.4.2.4. La classe NYHA.....	42
1.1.4.2.5. Le diabète .....	43
1.1.4.2.6. Antécédent de mort subite ressuscitée.....	43
1.1.4.2.7. Antécédent d’hospitalisations pour IC .....	43
1.1.4.2.8. La dépression.....	44
1.1.4.3. Les paramètres électrocardiographiques .....	44
1.1.4.3.1. La largeur du QRS et le bloc de branche gauche .....	44
1.1.4.3.2. La survenue de troubles du rythme ventriculaire .....	45
1.1.4.3.3. La survenue d’une fibrillation atriale .....	45
1.1.4.4. Les paramètres biologiques.....	46
1.1.4.4.1. BNP et NT-proBNP.....	46
1.1.4.4.2. Troponines.....	48
1.1.4.4.3. Hyponatrémie .....	49
1.1.4.4.4. Insuffisance rénale.....	50
1.1.4.4.5. Anémie .....	51
1.1.4.5. Les paramètres d’imagerie .....	51
1.1.4.5.1. La fraction d’éjection ventriculaire gauche .....	51
1.1.4.5.2. La fraction d’éjection ventriculaire droite .....	52
1.1.4.5.3. Le remodelage et la dilatation du ventricule gauche .....	52
1.1.4.5.4. Les pressions de remplissage ventriculaires gauches .....	53
1.1.4.5.5. La taille de l’oreillette gauche .....	53
1.1.4.5.6. L’insuffisance mitrale.....	54
1.1.4.5.7. L’hypertension pulmonaire .....	55
1.1.4.6. Les paramètres fonctionnels.....	55
1.1.4.6.1. Les paramètres de l’épreuve d’effort métabolique.....	55
1.1.4.6.2. Le test de marche de 6 minutes .....	57

1.1.4.7.	Les données du cathétérisme cardiaque .....	57
1.1.4.7.1.	Débit et index cardiaque.....	57
1.1.4.7.2.	Hypertension pulmonaire et résistances pulmonaires .....	57
1.1.4.8.	En résumé.....	58
<b>1.2.</b>	<b>PARTIE 2 : La recherche de nouveaux biomarqueurs pronostiques circulants.....</b>	<b>62</b>
1.2.1.	Stratégie de recherche des biomarqueurs.....	62
1.2.1.1.	Choix de la cible.....	62
1.2.1.2.	Choix de l'échantillon .....	63
1.2.1.3.	Choix de l'approche .....	63
1.2.1.4.	Le critère d'évaluation .....	64
1.2.1.5.	Synthèse .....	64
1.2.2.	Approche « candidate ».....	65
1.2.2.1.	Généralités.....	65
1.2.2.2.	Les données de la littérature.....	65
1.2.2.2.1.	Activation neurohormonale.....	65
1.2.2.2.2.	Marqueurs d'apoptose et/ou nécrose myocytaire.....	67
1.2.2.2.3.	Insuffisance rénale.....	68
1.2.2.2.4.	Stress myocytaire .....	69
1.2.2.2.5.	Matrice extracellulaire.....	70
1.2.2.2.6.	Stress Oxydatif .....	73
1.2.2.2.7.	Inflammation .....	74
1.2.2.3.	Synthèse .....	76
1.2.3.	Approche de protéomique différentielle .....	77
1.2.3.1.	Complexité du protéome plasmatique, accès au « <i>deep proteome</i> ».....	77
1.2.3.1.1.	Technique d'immunodéplétion.....	78
1.2.3.1.2.	Technique de dilution/compression : combinatory peptide ligand library (CPLL) .....	78
1.2.3.2.	Les méthodes d'analyse protéomique différentielle.....	79
1.2.3.2.1.	Electrophorèse 2D .....	79
1.2.3.2.2.	SELDI-TOF-MS.....	80
1.2.3.2.3.	Spectrométrie de masse .....	82
1.2.3.3.	Application à l'évaluation pronostique des patients avec IC systolique.....	83
1.2.4.	Les ARNs non codants circulants .....	85
1.2.4.1.	Les MiRNAs .....	85
1.2.4.1.1.	Généralités.....	85
1.2.4.1.2.	Synthèse des miRNAs.....	85
1.2.4.1.3.	Mode d'action.....	86
1.2.4.1.4.	Mécanismes de relargage dans la circulation sanguine.....	87
1.2.4.1.5.	Applications dans le domaine de l'IC systolique .....	88
1.2.4.2.	Les ARNs longs non codants .....	90
1.2.4.2.1.	Généralités.....	90
1.2.4.2.2.	Synthèse.....	91
1.2.4.2.3.	Mode d'action.....	91
1.2.4.2.4.	Mécanismes de relargage dans la circulation sanguine.....	92
1.2.4.2.5.	Applications dans le domaine de l'IC systolique .....	92
1.2.5.	Approche multi marqueurs et statistiques.....	95
1.2.5.1.	L'approche multi marqueurs .....	95
1.2.5.2.	Méthodes statistiques appliquées aux techniques de l'omique .....	96
1.2.5.2.1.	<i>Le nombre de variables explicatives</i> .....	96
1.2.5.2.2.	<i>La colinéarité et la redondance</i> .....	96
1.2.5.2.3.	<i>Les méthodes statistiques</i> .....	97
<b>2.</b>	<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>100</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTATS.....</b>	<b>103</b>
<b>3.1.</b>	<b>PARTIE 1 : Description de la population INCA .....</b>	<b>104</b>
3.1.1.	Généralités .....	104
3.1.2.	La population test (n=198 patients) .....	105
3.1.3.	La population de validation (n=344 patients) .....	106
<b>3.2.</b>	<b>PARTIE 2 : Recherche de biomarqueurs pronostiques de l'IC systolique par approche de protéomique différentielle, Preuve de concept.....</b>	<b>108</b>

3.2.1.	Introduction .....	108
3.2.1.1.	Rationnel .....	108
3.2.1.2.	Objectifs .....	108
3.2.1.3.	Méthodes .....	108
3.2.1.4.	Résultats .....	109
3.2.2.	Article : Multimarker Proteomic Profiling For The Prediction Of Cardiovascular Mortality In Patients With Chronic Heart Failure .....	110
3.2.3.	Conclusion .....	157
<b>3.3.</b>	<b>PARTIE 3 : Purification et identification des pics <i>m/z</i> d'intérêt, Impact des Apolipoprotéines .....</b>	<b>158</b>
3.3.1.	Généralités .....	158
3.3.2.	La stratégie de sélection des pics <i>m/z</i> à identifier en priorité.....	158
3.3.2.1.	Intérêt clinique.....	158
3.3.2.2.	La faisabilité présumée de l'identification .....	159
3.3.3.	Le principe général.....	160
3.3.3.1.	Généralités.....	160
3.3.3.2.	La banque d'échantillons .....	161
3.3.3.3.	Etapas de purification.....	161
3.3.3.4.	Identification par spectrométrie de masse.....	165
3.3.4.	Validation de l'identification .....	167
3.3.5.	Purification et identification des pics <i>m/z</i> sélectionnés : place des Apolipoprotéines ...	169
<b>4.</b>	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>171</b>
4.1.	Les atouts de la population <i>INCA</i> .....	172
4.2.	Le bilan pronostique de l'IC systolique : place des scores protéomiques.....	173
4.3.	Purification et identification des pics <i>m/z</i> SELDI-TOF-MS d'intérêt – Limites et difficultés.....	174
4.3.1.	Le choix de la bande à exciser sur le gel d'électrophorèse .....	174
4.3.2.	La notion de pic <i>m/z</i> virtuel.....	176
4.3.2.1.	Les pics dichargés .....	177
4.3.2.2.	La matrice.....	178
4.4.	Place des apolipoprotéines dans l'évaluation pronostique de l'IC systolique.....	178
4.4.1.	La valeur ajoutée des apolipoprotéines .....	178
4.4.2.	Le rationnel physiopathologique.....	179
4.5.	Conclusion .....	180
<b>5.</b>	<b>REFERENCES.....</b>	<b>181</b>
<b>6.</b>	<b>ANNEXES .....</b>	<b>205</b>
6.1.	ANNEXE 1 : Copeptin in acute coronary syndrome and heart failure management: state of the art and future directions.....	206
6.2.	ANNEXE 2 : Serum MMP-8: a novel indicator of left ventricular remodeling and cardiac outcome in patients after acute myocardial infarction .....	235
6.3.	ANNEXE 3 : The circulating long non-coding RNA <i>LIPCAR</i> predicts survival in heart failure patients.....	261

## Table des figures

<i>Figure 1. Pronostic de la transplantation cardiaque à 5 ans en fonction du temps de 1982 à 2011. Adapté de Lund et al.<sup>43</sup> .....</i>	35
<i>Figure 2. Techniques d'assistance mono ventriculaires, type Heart Mate II® à gauche ou Heartware® à Droite. ....</i>	36
<i>Figure 3. Techniques d'assistance bi ventriculaires, type Thoratec® à gauche et Cardiowest® à droite. ....</i>	37
<i>Figure 4. Le cœur artificiel total, le système Carmat®. ....</i>	38
<i>Figure 5. Arbre décisionnel du traitement de l'IC systolique selon les recommandations européennes de Cardiologie. Adapté de McMurray et al.<sup>1</sup> .....</i>	39
<i>Figure 6. Comparaison du pronostic des patients hospitalisés pour IC, IDM ou cancer dans une cohorte de 31066 patients. Adapté de Stewart et al.<sup>49</sup> .....</i>	40
<i>Figure 7. Séquence de clivage du BNP et de ses précurseurs. ....</i>	46
<i>Figure 8. Impact du %VO<sub>2</sub> sur le pronostic des patients avec IC systolique. Adapté de de Groot et al.<sup>95</sup> .....</i>	56
<i>Figure 9. Schéma de la complexité biologique de l'organisme humain. Adapté de Nair et al.<sup>164</sup> .....</i>	62
<i>Figure 10. Valeur pronostique de la MMP-8 dans le remodelage post-IDM. Adapté de Fertin et al.<sup>222</sup> .....</i>	71
<i>Figure 11. Schéma de la complexité du protéome et de la gamme de concentration des protéines plasmatiques chez l'homme. Adapté de Tirumalai et al.<sup>259</sup> .....</i>	77
<i>Figure 12. Schéma des étapes de la technique combinatory peptide ligand library (CPLL). ..</i>	79
<i>Figure 13. Principe de l'analyse SELDI-TOF-MS. ....</i>	82
<i>Figure 14. Synthèse des miRNAs. Adapté de Elzenaar et al.<sup>168</sup> .....</i>	86
<i>Figure 15. Mode d'action des miRNAs. ....</i>	87
<i>Figure 16. Schéma des mécanismes de relargage des miRNAs dans la circulation sanguine. Adapté de Creemers et al.<sup>285</sup> .....</i>	88
<i>Figure 17. Principaux miRNAs impliqués dans le remodelage ventriculaire gauche. Adapté de Divakaran et al.<sup>289</sup> .....</i>	89
<i>Figure 18. Principaux mécanismes d'action décrits des ARNs longs non codants. Adapté de Ounzain et al.<sup>295</sup> .....</i>	92
<i>Figure 19. Impact de LIPCAR, un ARN long non codant, pour prédire le risque de remodelage ventriculaire gauche en fonction du temps après l'IDM. *P&lt;0.01 vs. absence de remodelage ventriculaire gauche, †P&lt;0.05. ....</i>	94
<i>Figure 20. Impact de LIPCAR, un ARN long non codant, pour prédire le risque de décès cardiovasculaire chez les patients atteints d'une IC systolique chronique. ***P&lt;0.0001 vs. absence de décès cardiovasculaire. ....</i>	94
<i>Figure 21. Exemple des 3 niveaux de difficulté présumée de l'identification d'un pic m/z donné. A : probabilité de succès élevée pour le pic 28124 H50-BM. B : probabilité intermédiaire pour le pic 6416 H50-BM. C : probabilité faible pour le pic 9136 CM10-BM. ....</i>	160
<i>Figure 22. Stratégie de purification des pics m/z utilisée au sein de notre équipe. Adapté de Fertin et al.<sup>272</sup> .....</i>	162
<i>Figure 23. Exemple du pic m/z 29024 CM10-BM. Présence d'un cluster de pics relativement proches et intenses. ....</i>	162
<i>Figure 24. Purification du pic m/z 29024 CM10-BM. ....</i>	163

<i>Figure 25. Gel d'électrophorèse des fractions F4 et F5 de l'échantillon MR15. Les bandes excisées sont annotées. ....</i>	164
<i>Figure 26. Analyse SELDI-TOF-MS de l'éluât de la bande 1. ....</i>	164
<i>Figure 27. Principe d'un spectromètre de masse en mode tandem. ....</i>	166
<i>Figure 28. Répartition des peptides identifiés (en rouge) par spectrométrie de masse sur la séquence de l'Apo A1. ....</i>	167
<i>Figure 29. Cluster des pics 6000 dans un échantillon de plasma égalisé (spectre du haut) et dans un échantillon de plasma brut (spectre du bas). ....</i>	168
<i>Figure 30. Profils SELDI-TOF-MS d'un échantillon de plasma brut et d'un échantillon immunoprécipité avec un anticorps spécifique de l'Apo C1. ....</i>	168
<i>Figure 31. Exemple de mauvaise corrélation entre le profil SELDI-TOF-MS et le profil des bandes sur le gel d'électrophorèse. ....</i>	176
<i>Figure 32. Exemple du cluster des pics m/z 6000 et 3000 et de l'Apo C1. ....</i>	177

## Table des tableaux

Tableau 1. Principales études randomisées ayant montré un bénéfice des IEC dans le traitement de l'IC systolique. ....	26
Tableau 2. Principales études randomisées ayant montré un bénéfice des bêtabloquants dans le traitement de l'IC systolique. ....	28
Tableau 3. Principales études ayant testé le bénéfice de la resynchronisation cardiaque dans le traitement de l'IC systolique. ....	34
Tableau 4. Principaux critères d'éligibilité et contre-indications à la transplantation cardiaque. ....	35
Tableau 5. Définition des différents stades de la classe NYHA. ....	43
Tableau 6. Comparaison de la valeur pronostique respective du BNP et du NT-proBNP. Adapté de Masson et al. <sup>102</sup> .....	48
Tableau 7. Facteurs pronostiques dans l'IC systolique. Adapté de McMurray et al. <sup>1</sup> .....	59
Tableau 8. Principaux scores pronostiques utilisés dans l'évaluation du risque des patients avec IC systolique chronique. ....	61
Tableau 9. Principales études ayant rapporté la valeur pronostique de la copeptine dans la littérature. ....	67
Tableau 10. Biomarqueurs pronostiques circulants identifiés par approche « candidate » dans l'IC systolique chez l'homme. ....	76
Tableau 11. Liste des biomarqueurs découverts chez l'homme par approche de protéomique différentielle dans le domaine de l'IC systolique. ....	84
Tableau 12. Principales caractéristiques de la population test. ....	105
Tableau 13. Principales caractéristiques de la population de validation. ....	107
Tableau 14. Classement des 13 pics m/z différentiellement intenses entre les patients décédés et les survivants dans les deux populations en fonction de la probabilité de succès de leur identification. ....	159
Tableau 15. Liste des 7 protéines avec un score de probabilité >26 après implémentation de la liste des peptides dans le logiciel Matrix Science MASCOT MS/MS Ion Search. ....	166
Tableau 16. Liste des protéines identifiées. ....	169
Tableau 17. Avantages et inconvénients des techniques de dosage spécifique. ....	170

## Abréviations par ordre alphabétique

ICTP : Télé-peptide du collagène de type I

% VO<sub>2</sub> : Pourcentage de consommation maximale en Oxygène par rapport à la théorique

2D-DIGE : BiDimensional Differential Gel Electrophoresis

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

Ago : protéine Argonaute

Apo : Apolipoprotéine

ARAI : Antagoniste du Récepteur à l'Angiotensine II

ARN : Acide Ribo Nucléique

AUC : Area Under the Curve, Aire sous la courbe

BNP : Brain Natriuretic Peptide

CPLL : Combinatory Peptide Ligand Library

DTI : Doppler Tissue Imaging

ESC : European Society of Cardiology

FEVG : Fraction d'Ejection Ventriculaire Gauche

GDF-15 : Growth Differentiation Factor 15

H-FABP : Heart-type Fatty-Acid Binding Protein

HFSS : Heart Failure Survival Score

HR : Hazard Ratio

HR/AM : High Resolution and Accurate Mass mass spectrometer

hs-CRP : C Reactive Protein hyper sensible

HUPO : HUman Proteome Organization

IC : Insuffisance Cardiaque

IDI : Integrated Discrimination Improvement

IDM : Infarctus Du Myocarde

IEC : Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion de l'angiotensine II

IEF : Iso ElectroFocalisation

INCA : INSuffisance CARdiaque

IP : Immunoprécipitation

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

LASSO : Régression de Lasso

LIPCAR : Long Intergenic non coding RNA Predicting Cardiac Remodeling

MALDI-TOF-MS : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry

MDRD : Modification of Diet in Renal Disease

miRNA : micro-ARN

MMP : Métalloprotéase

MPO : Myelopéroxydase

MR-proADM : Mid-Regional pro Adrenomedullin

NGAL : Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin

NOS : Nitric Oxide Synthase

NRI : Net Reclassification Improvement

NT-proBNP : N-Terminal-pro-Brain Natriuretic Peptide

NYHA : New York Heart Association

PINP : Pro-peptide N-terminal du pro-collagène de type I

PIIINP : Pro-peptide N-terminal du pro-collagène de type III

Pic de VO<sub>2</sub> : Pic de consommation maximale en Oxygène

ROC : Receiver Operator Characteristics

ROS : Espèces Réactives Oxygénées

SELDI-TOF-MS : Surface Enhanced Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry

SHFM : Seattle Heart Failure Model

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SOD : Super Oxide Dismutase

sPLS-DA : Sparse Partial Least Square

SVM : Support Vector Machine

TIMP : Inhibiteur Tissulaire des Métalloprotéases

TNF $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

# **1. INTRODUCTION**

# 1.1. PARTIE 1 : L'insuffisance cardiaque gauche systolique chronique

---

## 1.1.1. Définition

L'insuffisance cardiaque (IC) est habituellement définie par la présence d'une dysfonction myocardique entraînant une incapacité du cœur à fournir les apports en oxygène et nutriments nécessaires à l'organisme et aux tissus pour assurer leur fonction propre et ce malgré des pressions de remplissage normales (absence d'hypovolémie) ou par la possibilité d'assurer cette fonction mais au prix de pressions de remplissage ventriculaires élevées.

En pratique clinique, l'IC est définie par un syndrome associant symptômes (dyspnée, orthopnée, fatigue, ...) et signes cliniques d'IC gauche (crépitants pulmonaires, bruit de galop, ...) et/ou droite (bruit de galop, hépatalgie, turgescence jugulaire, reflux hépato jugulaire, œdèmes déclives, ...). La plupart de ces symptômes et signes résultent de la surcharge hydro sodée causée par l'IC et peuvent rapidement disparaître sous traitement diurétique rendant le diagnostic parfois difficile. Ces symptômes et signes ne sont d'ailleurs pas spécifiques de l'IC et il faut bien admettre que le diagnostic d'IC est parfois complexe.

On distingue habituellement 2 types d'IC : systolique et diastolique (ou à fonction systolique préservée), en fonction de la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) au moment du diagnostic. La FEVG normale est de 60%. Le seuil de FEVG pour distinguer les 2 types d'IC n'est pas consensuel et oscille entre 40% et 50% dans la littérature.<sup>1</sup> Dans ce travail, l'IC gauche systolique sera définie par la présence d'une FEVG  $\leq 45\%$  au moment du diagnostic, seuil permettant de s'assurer que tous les patients ont effectivement bien une dysfonction systolique du ventricule gauche. On parle habituellement d'IC gauche systolique sévère en dessous du seuil de 35%.

## 1.1.2. Epidémiologie

L'IC est un problème majeur de santé publique. Dans les pays industrialisés, la prévalence de cette pathologie a été estimée à 1-2% de la population adulte.<sup>1</sup> Cette prévalence augmente nettement avec l'âge et dépasse 10% chez les adultes de plus de 70 ans,<sup>1,2</sup> ce qui prend toute son importance au vu du vieillissement de la population.

### 1.1.3. Traitement

#### 1.1.3.1. Traitement de l'étiologie

De nombreuses causes (ischémique, valvulaire, toxique, génétique, ...) peuvent conduire à la survenue d'une IC gauche systolique. La principale cause dans les pays industrialisés reste aujourd'hui la cause ischémique, c'est à dire post infarctus du myocarde (IDM). Il est évident que le traitement de chaque patient insuffisant cardiaque repose sur le traitement de la cause de cette IC lorsque celui-ci est possible : revascularisation coronaire, réparation d'une valvulopathie, arrêt d'une intoxication alcoolique par exemple.

#### 1.1.3.2. Traitements pharmacologiques

Comme de nombreuses pathologies en médecine, l'objectif du traitement de l'IC est double, à savoir : diminuer et améliorer les symptômes du patient mais aussi améliorer son pronostic. Nous allons voir dans ce paragraphe que de nombreuses molécules ont pu démontrer un bénéfice sur l'un, l'autre ou les deux de ces objectifs. Il faut néanmoins admettre qu'elles ont souvent fait la preuve de leur efficacité dans le sous-groupe des patients les plus graves (FEVG <35-40%) et qu'elles sont aujourd'hui utilisées par extension chez tous les patients avec IC systolique (en pratique FEVG <50%).

##### 1.1.3.2.1. *Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine*

A ce jour, la place des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC) dans le traitement de l'IC systolique est clairement reconnue depuis les études randomisées publiées fin des années 1980 - début des années 1990. Ils ont ainsi été les premiers à montrer un bénéfice significatif sur le pronostic de ces patients. Les principales études ayant montré un bénéfice des IEC dans cette pathologie sont répertoriées dans le Tableau 1.

L'étude CONSENSUS,<sup>3</sup> a randomisé 253 patients avec une IC clinique sévère (classe New-York Heart Association (NYHA) IV) sans limite de FEVG entre un traitement par enalapril et un traitement par placebo. Cette étude a ainsi montré une amélioration des symptômes et surtout une réduction de la mortalité toutes causes avec une diminution du risque relatif de 27% et une diminution du risque absolu de 15% (39% versus 54%) pour un suivi d'environ 12 mois.

Ces résultats ont été confirmés par l'étude SOLVD-Treatment.<sup>4</sup> Cette étude a randomisé 2569 patients avec une IC systolique définie par une FEVG  $\leq$ 35% entre enalapril

et placebo. Cette étude a rapporté une réduction de la mortalité toutes causes de 4,5% en risque absolu et de 16% en risque relatif avec un suivi médian de 41,4 mois.

L'étude ATLAS a inclus 3164 patients avec une IC systolique définie par une FEVG  $\leq 30\%$  et les a randomisés entre un traitement par lisinopril et un traitement par placebo pour une durée de 39-58 mois.<sup>5</sup> Cette étude n'a pas retrouvé de bénéfice significatif sur le critère de mortalité toutes causes séparément (réduction du risque relatif de 8%) mais a montré un bénéfice sur un critère combiné de décès et hospitalisations avec une réduction du risque relatif de 12% (avec notamment une réduction de 24% du risque d'hospitalisations pour IC).

Le bénéfice des IEC a également été retrouvé chez les patients présentant une IC asymptomatique dans l'étude SOLVD-Prevention ayant inclus 4228 patients avec une FEVG  $\leq 35\%$ .<sup>6</sup> Dans cette étude, l'enalapril ne montrait pas de bénéfice significatif sur la mortalité toutes causes (réduction du risque relatif de 8%) mais diminuait de manière significative le critère composite décès et hospitalisations pour IC avec une réduction du risque relatif de 20%.

Par la suite, d'autres études ont montré des résultats très concordants dans le contexte particulier de l'IC post-IDM. Ainsi, les études SAVE,<sup>7</sup> AIRE<sup>8</sup> et TRACE<sup>9</sup> ont toutes les 3 montré une réduction significative de la mortalité toutes causes dans ce contexte.<sup>10</sup>

**Tableau 1. Principales études randomisées ayant montré un bénéfice des IEC dans le traitement de l'IC systolique.**

Etudes	Nombre patients	Molécule	Critères d'inclusion	Durée suivi	Bénéfice sur la mortalité Diminution du risque relatif
CONSENSUS <sup>3</sup>	253	Enalapril	IC clinique NYHA IV	12 mois	27%
SOLVD-Treatment <sup>4</sup>	2569	Enalapril	FEVG $\leq 35\%$	41,4 mois	16%
ATLAS <sup>5</sup>	3164	Lisinopril	FEVG $\leq 30\%$	39-58 mois	8% (ns)
SOLVD-Prevention <sup>6</sup>	4228	Enalapril	FEVG $\leq 35\%$	37,4 mois	8% (ns)
SAVE <sup>7</sup>	2231	Captopril	FEVG $\leq 40\%$	42 mois	19%
AIRE <sup>8</sup>	2006	Ramipril	IC clinique Post-IDM	15 mois	27%
TRACE <sup>9</sup>	1749	Trandolapril	FEVG $\leq 35\%$ Post-IDM	24-50 mois	22%

#### 1.1.3.2.2. *Bétabloquants*

Tout comme les IEC, la place des  $\beta$ -bloquants dans le traitement de l'IC systolique est aujourd'hui devenue indiscutable et incontournable. Ces deux molécules font partie du socle du traitement de cette pathologie. Les principales études ayant démontré le bénéfice de cette classe thérapeutique dans le traitement de l'IC systolique sont répertoriées dans le Tableau 2.

L'étude CIBIS II publiée en 1999 a été la première étude à rapporter un bénéfice des  $\beta$ -bloquants (bisoprolol) dans le traitement de l'IC systolique.<sup>11</sup> Cette étude a randomisé 2647 patients avec une FEVG  $\leq 35\%$  et a été arrêtée prématurément en raison d'un taux de décès très supérieur dans le groupe placebo. Le bisoprolol entraînait une réduction du risque relatif de décès toutes causes de 34% pour un suivi médian de 15,6 mois.

Les résultats de CIBIS II ont ensuite été confirmés par ceux de MERIT-HF et de COPERNICUS publiés respectivement en 1999 et 2001.<sup>12,13</sup> L'étude MERIT-HF ayant inclus 3991 patients avec IC et FEVG  $\leq 40\%$  a en effet montré une réduction significative du risque relatif de mortalité toutes causes de 34% dans le groupe metoprolol versus le groupe placebo.<sup>12</sup> L'étude COPERNICUS avait, quant à elle, randomisé 2289 patients avec une IC sévère (FEVG  $\leq 25\%$ ) et avait également montré un bénéfice significatif du carvedilol sur la mortalité toutes causes (risque relatif -35%).<sup>13</sup> Le suivi médian était de 10,4 mois.

L'étude BEST, testant l'impact du bucindolol chez 2708 patients en stade III ou IV de la classe NYHA et ayant une FEVG  $\leq 35\%$ , a montré des résultats concordants bien que non significatifs en termes de mortalité toutes causes (réduction du risque relatif de 10%).<sup>14</sup> Dans cette étude, on notait néanmoins un bénéfice significatif sur certains critères secondaires tels que la mortalité cardiovasculaire ou le critère composite décès toutes causes et/ou transplantation cardiaque (risque relatif de -24%).

Concernant le sous-groupe particulier des patients âgés atteints d'IC, il est intéressant de noter que les  $\beta$ -bloquants ont également montré un bénéfice dans l'étude SENIORS ayant inclus 2128 patients de plus de 70 ans sans critère de seuil de FEVG.<sup>15</sup> Dans cette étude, le nebivolol ne permettait pas de réduire de manière significative le critère de mortalité toutes causes (risque relatif -12%) mais diminuait en revanche significativement un critère composite de décès et hospitalisations pour raison cardiovasculaire (critère principal de l'étude, risque relatif -24%).

**Tableau 2. Principales études randomisées ayant montré un bénéfice des bêtabloquants dans le traitement de l'IC systolique.**

Etudes	Nombre patients	Molécule	Critères d'inclusion	Durée suivi	Bénéfice sur la mortalité Diminution du risque relatif
CIBIS II <sup>11</sup>	2647	bisoprolol	FEVG ≤35%	15,6 mois	34%
MERIT-HF <sup>12</sup>	3991	metoprolol	FEVG ≤40%	12 mois	34%
COPERNICUS <sup>13</sup>	2289	carvedilol	FEVG ≤25%	10,4 mois	35%
BEST <sup>14</sup>	2708	bucindolol	FEVG ≤35%	24 mois	10% (ns)
SENIORS <sup>15</sup>	2128	nebivolol	IC clinique >70 ans	21 mois	12% (ns)

#### 1.1.3.2.3. Antagonistes du récepteur à l'aldostérone

A la différence des IEC et des  $\beta$ -bloquants, qui font réellement partie du traitement de base de tout patient ayant une IC systolique, les antagonistes du récepteur à l'aldostérone sont réservés aux patients qui présentent une persistance de leurs symptômes sous traitement initial bien conduit (c'est à dire si la dyspnée persiste entre la classe II et IV de la NYHA).

La spironolactone et l'eplerenone (ayant moins d'effets secondaires) ont en effet toutes les deux montré leur efficacité sur la mortalité dans 3 études larges et randomisées. L'étude RALES,<sup>16</sup> publiée en 1999 et ayant inclus 1663 patients avec une FEVG ≤35% et en classe NYHA III, a rapporté un bénéfice de la spironolactone en comparaison du placebo avec une réduction significative de plus de 11% de la mortalité toutes causes en valeur absolue pour un suivi médian de 2 ans. Il faut néanmoins noter que si la majeure partie des patients recevait un IEC dans cette étude, seuls environ 10% des patients étaient traités par  $\beta$ -bloquants (étude réalisée avant la publication des grands essais sur les  $\beta$ -bloquants).

Beaucoup plus récemment, l'étude EMPHASIS,<sup>17</sup> publiée en 2011, a confirmé ces résultats avec l'eplerenone dans une population de patients traités par IEC et  $\beta$ -bloquants. Dans cette étude ayant inclus 2737 patients avec une FEVG ≤30% et en classe NYHA II, l'eplerenone était associée à une réduction de la mortalité toutes causes de 24% en valeur relative et une réduction du critère primaire composite de mortalité et hospitalisations pour IC de 37%.

Enfin dans le contexte du post-IDM avec IC, l'étude EPHEsus<sup>18</sup> a retrouvé des résultats très concordants avec une réduction de la mortalité toutes causes de 15% en valeur relative. Cette étude a inclus 6632 patients avec une FEVG ≤40% en post-IDM.

#### 1.1.3.2.4. Antagonistes du récepteur à l'angiotensine 2

Selon les recommandations de la société européenne de cardiologie,<sup>1</sup> les antagonistes du récepteur à l'angiotensine 2 (ARA2) sont, à ce jour, uniquement recommandés en traitement alternatif aux IEC en cas de mauvaise tolérance ou de contre-indication à ces derniers. En revanche, les ARA2 ne sont actuellement plus recommandés en première intention en association aux IEC et aux  $\beta$ -bloquants chez les patients avec dysfonction ventriculaire gauche et restant symptomatiques sous traitement (NYHA  $\geq 2$ ). En effet, les antagonistes du récepteur à l'aldostérone, qui ont montré un bénéfice supérieur aux ARA2 dans ce contexte, doivent leur être préférés (cf. paragraphe sur les antagonistes du récepteur à l'aldostérone).

Dans l'étude CHARM-Alternative,<sup>19</sup> ayant inclus 2028 patients avec IC systolique (FEVG  $\leq 40\%$ ) et intolérants aux IEC, le candesartan a pu montrer une réduction du risque d'hospitalisations pour IC de 23% en valeur relative et de 7% en valeur absolue, sans effet significatif sur la mortalité toutes causes. Ces résultats ont été renforcés par ceux de l'étude VALIANT.<sup>20</sup> Dans cette étude randomisée entre un traitement par captopril, valsartan ou la combinaison des deux et ayant inclus 14703 patients avec IC en post-IDM, le groupe valsartan a montré une non-infériorité par rapport au groupe captopril sur le critère de mortalité. Des résultats similaires ont pu être obtenus pour le losartan dans l'étude OPTIMAAL ayant inclus 5477 patients avec une IC en post-IDM.<sup>21</sup>

Dans les études Val-HeFT<sup>22</sup> et CHARM-Added,<sup>23</sup> incluant environ 7600 patients au total et comparant un ARA2 (valsartan ou candesartan) au placebo en plus du traitement par IEC, il avait été noté une réduction de 24% et 17% respectivement du risque relatif d'hospitalisations pour IC. En revanche, seule l'étude CHARM-Added retrouvait une réduction significative de la mortalité cardiovasculaire (risque relatif -16% avec le candesartan). Encore une fois, ce bénéfice obtenu dans cette indication précise (en adjonction aux IEC) étant moins important que celui des antagonistes du récepteur à l'aldostérone ; le traitement par ARA2 n'est actuellement plus recommandé dans ce contexte.

#### 1.1.3.2.5. Ivabradine

L'ivabradine est un inhibiteur du canal  $I_f$  du nœud sinusal et possède donc un effet bradycardisant dit « pur » (absence d'effet sur l'inotropisme ou la tension artérielle). Ce médicament est bien entendu inefficace en cas de fibrillation atriale, ce qui n'est pas une situation rare dans le cadre de l'IC.

L'étude SHIFT,<sup>24</sup> ayant inclus 6588 patients avec une IC systolique sévère (FEVG  $\leq 35\%$  et classe NYHA  $\geq$ II) et une fréquence cardiaque de repos  $>70$ /min malgré un traitement bien conduit (en rythme sinusal), est la seule étude à avoir montré que l'ivabradine permettait, dans ce contexte particulier, de diminuer de manière significative le risque de voir survenir un évènement du critère composite primaire (décès cardiovasculaire et/ou hospitalisations pour IC) avec une réduction du risque relatif de 18% pour un suivi médian de 23 mois. Dans cette étude cependant, il n'était pas observé de bénéfice significatif sur les critères de mortalité toutes causes ou de mortalité cardiovasculaire pris isolément.

Précédemment, l'étude BEAUTIFUL,<sup>25</sup> qui avait inclus 10917 patients avec IC systolique (FEVG  $\leq 40\%$ ), une fréquence cardiaque de repos  $\geq 60$ /min et une coronaropathie, n'avait pas montré de bénéfice de l'ivabradine. En effet, il n'était pas observé de différence sur le critère primaire composite (décès cardiovasculaire, IDM et/ou hospitalisations pour IC) dans la population globale de l'étude. A noter qu'il n'y avait pas non plus de bénéfice sur ce critère primaire composite dans le sous-groupe des patients ayant une fréquence cardiaque de repos  $>70$ /min à l'inclusion.

La place de l'ivabradine dans le traitement de l'IC est donc aujourd'hui débattue et ce traitement est à ce jour réservé aux patients en rythme sinusal et ayant une fréquence cardiaque de repos  $\geq 70$ /min malgré un traitement déjà bien conduit (3<sup>ème</sup> ou 4<sup>ème</sup> intention de traitement).

#### 1.1.3.2.6. Le LCZ696

Lors du dernier congrès international de cardiologie de l'*European Society of Cardiology* (ESC) 2014, ont été rapportés les résultats de l'étude PARADIGM-HF.<sup>26</sup> Cette étude avait pour objectif de tester la place d'une nouvelle molécule, le LCZ696 (association d'un inhibiteur de la néprilysine et d'un ARAII) dans le traitement de l'IC systolique chronique (critères inclusions : FEVG  $\leq 40\%$  et classe NYHA  $\geq 2$ ). Au total, 8442 patients ont été randomisés entre cette nouvelle molécule et un traitement par IEC pour un suivi médian de 27 mois. Il faut noter que cette étude a été stoppée prématurément en raison du très fort bénéfice de ce nouveau traitement. Ainsi, le critère primaire (décès cardiovasculaire et/ou hospitalisations pour IC) était réduit de près de 5% en valeur absolu et 20% en valeur relative : 21,8% versus 26,5%. On notait également un bénéfice sur la mortalité toutes causes et la mortalité cardiovasculaire : réduction de 16% et 20% du risque en valeur relative, respectivement. Ce traitement n'est actuellement pas encore disponible en France.

#### 1.1.3.2.7. *Diurétiques de l'anse de Henlé*

Contrairement aux molécules précédentes, les diurétiques de l'anse de Henlé n'ont pas démontré de bénéfice sur la mortalité toutes causes ou sur la mortalité cardiovasculaire chez les patients avec IC systolique.<sup>1</sup> Ces traitements sont néanmoins largement utilisés dans cette pathologie dans l'objectif de diminuer les signes de congestion (dyspnée, orthopnée et œdèmes). L'objectif de ces traitements est donc de maintenir les patients en euvolémie.

Les diurétiques de l'anse de Henlé sont les diurétiques privilégiés dans le traitement de l'IC, notamment en raison de leur effet diurétique plus bref et plus intense que les traitements diurétiques thiazidiques. Ils sont également plus efficace en cas d'insuffisance rénale : situation non rare en cas d'IC sévère.

#### 1.1.3.3. Traitements non pharmacologiques

##### 1.1.3.3.1. *La rééducation cardiaque et l'exercice physique*

La pratique d'un exercice physique régulier a montré son efficacité sur l'amélioration des symptômes des patients atteints d'IC systolique depuis de nombreuses années. Ainsi, de nombreuses petites études avaient pu démontrer que l'exercice physique régulier permettait d'améliorer les capacités fonctionnelles des patients, leur qualité de vie et de réduire le taux de certains biomarqueurs pronostiques tels que le peptide natriurétique B (BNP).<sup>27-30</sup> Ces études ont également suggéré une amélioration du pronostic de ces patients avec une diminution du risque d'hospitalisations et une possible réduction du risque de décès.

En 2004, une méta-analyse a retrouvé un effet bénéfique de l'exercice physique sur la mortalité. Piepoli et al.<sup>31</sup> ont réalisé une méta-analyse de 9 études randomisées procurant des données sur la mortalité toutes causes. Cette méta-analyse incluant 801 patients retrouvait une réduction du risque de décès toutes causes de 35% en valeur relative dans le groupe des patients bénéficiant d'une pratique physique régulière.

Plus récemment, l'étude HF-ACTION<sup>32</sup> a randomisé 2331 patients atteints d'une IC systolique (FEVG  $\leq$ 35%) et relativement jeunes (moyenne 59 ans) en 2 groupes : un groupe « traitement standard » et un groupe « traitement standard plus 36 séances de réadaptation cardiaque ». Le suivi médian était de 30 mois. Dans cette étude le critère primaire composite (décès toutes causes et/ou hospitalisations) était réduit de manière significative dans le bras « exercice physique » de 11% en valeur relative. Le critère secondaire (décès cardiovasculaire et/ou hospitalisations) était également réduit significativement de 15%. A noter cependant qu'aucun bénéfice significatif n'a été obtenu sur le critère de mortalité pris isolément dans

cette étude. Le bénéfice de l'exercice physique régulier sur la mortalité est en conséquence encore débattu à ce jour.

#### 1.1.3.3.2. *Le défibrillateur*

L'une des principales causes de mortalité chez les patients avec IC systolique étant la mort subite par trouble du rythme ventriculaire grave, il est aisé de comprendre que le défibrillateur automatique implantable a, aujourd'hui, une place toute particulière dans le traitement de ces patients. Il existe en réalité deux situations cliniques bien distinctes : les patients en prévention secondaire (c'est à dire, qui ont déjà fait une première mort subite ressuscitée ou un trouble du rythme ventriculaire grave) et les patients en prévention primaire (c'est à dire, avec une IC systolique sévère mais sans évènement rythmique grave documenté).

Dans la situation particulière de la prévention secondaire, l'implantation d'un défibrillateur est absolument indiscutable et ce quelque soit la FEVG résiduelle du patient. Les données des études AVID,<sup>33</sup> CASH<sup>34</sup> et CIDS<sup>35</sup> sont en effet sans appel. Une méta-analyse des patients en prévention secondaire inclus dans ces 3 études (n=1963 patients) a ainsi montré une réduction de la mortalité toutes causes de 28% en valeur relative en comparaison du traitement anti-arythmique (essentiellement amiodarone).<sup>36</sup>

La situation est très différente en prévention primaire. En effet, dans ce cadre l'indication du défibrillateur repose essentiellement sur la FEVG résiduelle des patients après optimisation du traitement médical. En effet, il a clairement été démontré que le risque de décès par mort subite sur trouble du rythme ventriculaire était très associé à la FEVG du patient. Ainsi, il est actuellement recommandé d'implanter un défibrillateur uniquement chez les patients conservant une FEVG  $\leq 35\%$  en dépit d'un traitement pharmacologique optimal. Cette indication repose sur les résultats de deux études : les études SCD-HeFT et MADIT II.<sup>37,38</sup> L'étude SCD-HeFT a inclus 2521 patients avec IC systolique (FEVG  $\leq 35\%$ ) et en classe NYHA II ou III.<sup>37</sup> Elle a montré une réduction du risque de mortalité toutes causes de 23% en valeur relative et 6.9% en valeur absolue pour un suivi médian de 45,5 mois en cas d'implantation d'un défibrillateur. L'étude MADIT II ayant, quant à elle, inclus 1232 patients avec une IC systolique en post-IDM (FEVG  $\leq 30\%$ ) a montré des résultats très consistants et une réduction de la mortalité toutes causes de 31% en valeur relative en cas d'implantation d'un défibrillateur.<sup>38</sup>

#### 1.1.3.3.3. *La resynchronisation*

En raison de la fibrose myocardique, de la dilatation du ventricule gauche et des altérations des voies de conduction intra-ventriculaires, un certain nombre de patients atteints d'IC systolique présentent une désynchronisation cardiaque. Cette désynchronisation est définie par la présence d'un retard de contraction significatif d'une zone du ventricule gauche par rapport aux autres zones ou d'un décalage de contraction entre les deux ventricules (droit et gauche). L'évaluation de l'asynchronisme cardiaque est habituellement réalisée au cours d'une échographie cardiaque et peut s'avérer complexe. En pratique clinique, la mesure de la largeur du QRS sur l'électrocardiogramme est un paramètre simple qui permet de facilement sélectionner les patients qui nécessitent une évaluation détaillée de cet asynchronisme. Ainsi, lorsque le QRS est fin ( $<120$  ms), il est quasiment certain que le patient n'a pas de désynchronisation et qu'il ne bénéficiera donc pas d'un matériel de resynchronisation.

A l'inverse, la présence d'une désynchronisation est plus fréquente en cas de QRS large ( $>120$  ms) ; habituellement, plus le QRS est large et plus la désynchronisation est importante. Ainsi, au dessus de 150ms de large et en cas d'IC sévère (FEVG  $\leq 30-35\%$  et classe NYHA  $\geq II$ ), il existe très souvent une indication de resynchronisation. Les preuves proviennent de 4 études randomisées dont les détails sont répertoriés dans le Tableau 3.<sup>39-42</sup> Parmi ces 4 études, seule l'étude MADIT-CRT n'a pas montré d'effet sur la mortalité toutes causes. Néanmoins, le critère primaire de cette étude (décès toutes causes et/ou épisodes de décompensation cardiaque) était positif avec une réduction de 34% du risque relatif dans le groupe resynchronisation.

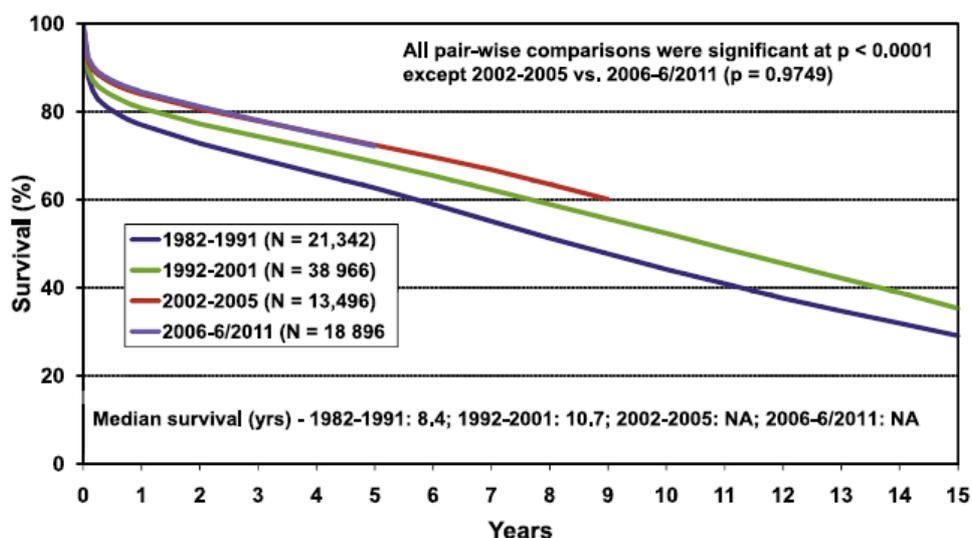
**Tableau 3. Principales études ayant testé le bénéfice de la resynchronisation cardiaque dans le traitement de l'IC systolique.**

Etudes	Nombre patients	Largeur QRS	Critères d'inclusion	Durée suivi	Bénéfice sur la mortalité Diminution du risque relatif
COMPANION <sup>39</sup>	1520	≥120ms	FEVG ≤35% NYHA III or IV	14,8 mois	24% avec resynchronisation seule et 36% avec resynchronisation et défibrillateur
CARE-HF <sup>40</sup>	813	≥120ms (entre 120 et 149ms besoin de critères écho)	FEVG ≤35%	29,4 mois	36% avec resynchronisation seule
MADIT-CRT <sup>41</sup>	1089	≥130ms	FEVG ≤30% NYHA I or II	28,8 mois	0%
RAFT <sup>42</sup>	1798	≥120ms	FEVG ≤30% NYHA II or III	40 mois	25% pour resynchronisation seule (tous les patients ayant un défibrillateur)

#### 1.1.3.3.4. La transplantation cardiaque

Bien qu'aucun essai randomisé n'ait jamais été réalisé, la transplantation cardiaque est aujourd'hui considérée en première ligne pour les patients atteints d'une IC très sévère ou souvent appelée « terminale ». Elle est dans ce contexte la seule véritable option pour le patient.

Néanmoins, le manque de greffons d'une part et les complications d'autre part justifient de sélectionner au mieux les patients qui pourront bénéficier de cette stratégie thérapeutique très invasive. En effet, selon l'agence française de la biomédecine, uniquement 410 transplantations cardiaques ont été réalisées en 2013 contre 360 en 2008. Par ailleurs, selon la littérature et les données du registre international,<sup>43</sup> la survie à 1 an après transplantation cardiaque est de l'ordre de 80%. Ainsi, 1/5 des patients vont décéder dans l'année suivant la greffe et 1/3 dans les 5 ans. Passé la première année, le taux annuel de mortalité est globalement constant et d'environ 4% (Figure 1). Cette mortalité est largement multifactorielle : les co-morbidités du patient avant la greffe (âge, perte musculaire, insuffisance rénale, anémie, ...), les complications de la chirurgie en elle-même et les complications du traitement immunosuppresseur (athérosclérose accélérée, insuffisance rénale, cancer, infections et sepsis, ...) sont les principaux facteurs.<sup>43</sup>



**Figure 1. Pronostic de la transplantation cardiaque à 5 ans en fonction du temps de 1982 à 2011. Adapté de Lund et al.<sup>43</sup>**

En conséquence, les indications et contre-indications à la transplantation cardiaque sont aujourd'hui relativement strictes. Les principaux critères d'éligibilité et les contre-indications à la transplantation cardiaque sont répertoriés dans le Tableau 4.

**Tableau 4. Principaux critères d'éligibilité et contre-indications à la transplantation cardiaque.**

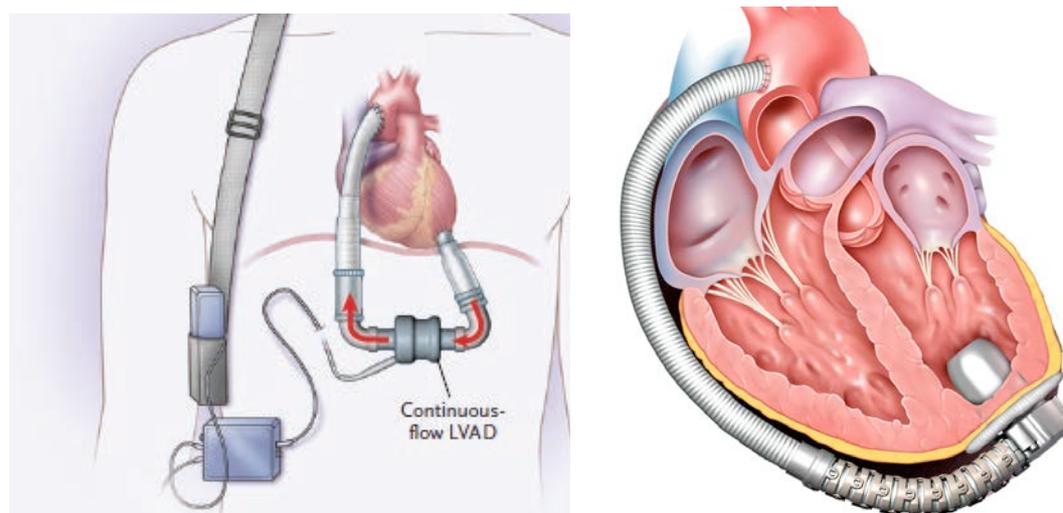
Critères d'éligibilité	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Insuffisance cardiaque « terminale » avec symptômes sévères et absence d'autres possibilités thérapeutiques</li> <li>- Pic de <math>VO_2 &lt; 10-14</math> mL/Kg/mn après obtention du seuil anaérobie</li> <li>- NYHA classe III/IV réfractaire au traitement médical maximal</li> <li>- Arythmie ventriculaire symptomatique, récurrente, réfractaire à tout traitement médical ou chirurgical</li> </ul>
Contre-indications	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Infection ou sepsis en cours</li> <li>- Atteinte athéroscléreuse périphérique sévère (artérite des membres inférieurs ou cérébro-vasculaire)</li> <li>- Intoxication alcoolique ou autres drogues non sevrées</li> <li>- Cancer</li> <li>- Ulcère gastrique récent et non contrôlé</li> <li>- Episode de maladie veineuse thromboembolique récent</li> <li>- Insuffisance rénale sévère (Clairance <math>&lt; 50</math> mL/min)</li> <li>- Affections hépatiques significatives</li> <li>- Maladies systémiques touchant plusieurs organes</li> <li>- Résistances pulmonaires élevées et fixées (<math>&gt; 4-5</math> Woods et gradient trans-pulmonaire <math>&gt; 15</math> mmHg)</li> <li>- Toutes autres co-morbidités avec pronostic sombre à 1 an</li> <li>- Démence</li> </ul>

#### 1.1.3.3.5. Les techniques d'assistance cardiaque

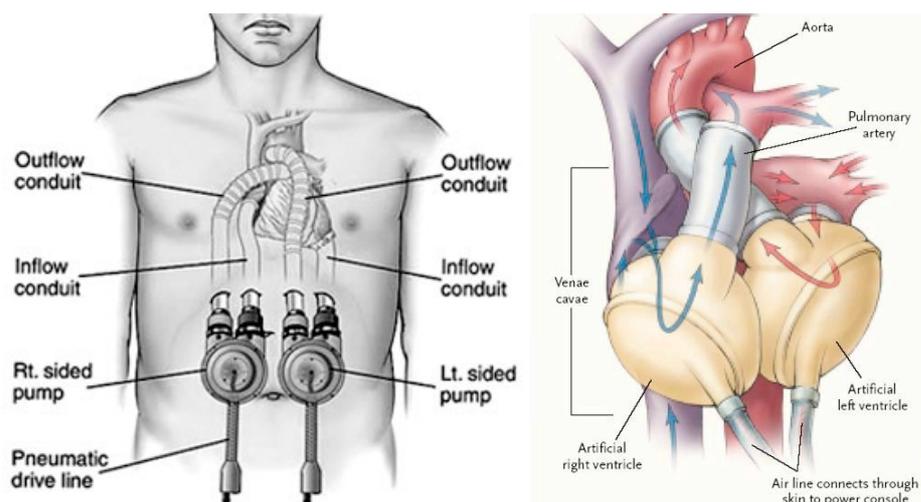
En raison du manque de greffons cardiaques et des critères de sélection très stricts des patients atteints d'IC systolique, de nombreux patients avec IC dite « terminale » n'ont pas la possibilité d'avoir accès à une transplantation. Dans cette optique de nombreux systèmes mécaniques d'assistance cardiaque ont été développés.

Ces systèmes sont habituellement classés en 2 groupes : les systèmes transitoires, plutôt destinés à la gestion de l'IC aigue et au choc cardiogénique et que nous ne détaillerons pas ici – et les systèmes plus permanents autorisant un retour au domicile des patients, qui sont eux destinés à la gestion des patients avec IC chronique « terminale ». Dans ce cas, le système est implanté soit en attente d'une transplantation cardiaque (si le patient est éligible mais que le greffon n'est pas disponible rapidement), soit en destination (c'est à dire comme dernière option thérapeutique pour le patient en cas de non éligibilité à la transplantation). A noter que tous ces systèmes permanents d'assistance cardiaque nécessitent une chirurgie relativement lourde sous circulation extracorporelle pour être implantés et une anticoagulation au long cours. Comme pour la transplantation cardiaque, le taux de complications est élevé.

Il existe aujourd'hui 2 grandes techniques d'assistance : les assistances mono ventriculaires (suppléant le ventricule gauche uniquement, type Heart Mate II® ou Heartware® sur la Figure 2) et les assistances bi ventriculaires (suppléant les deux ventricules, type Thoratec® ou Cardiowest® sur la Figure 3).



**Figure 2. Techniques d'assistance mono ventriculaires, type Heart Mate II® à gauche ou Heartware® à Droite.**

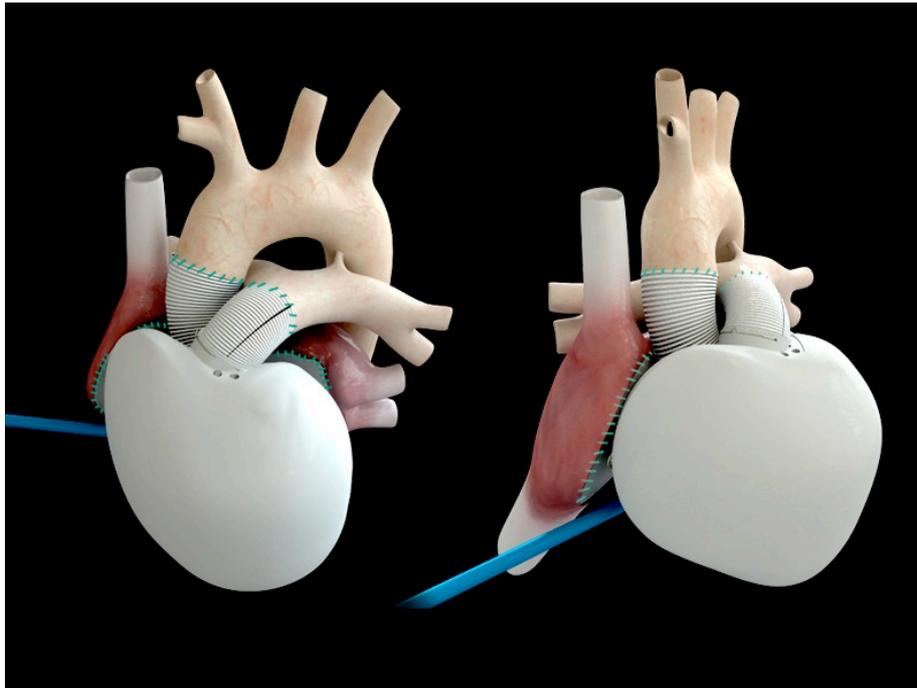


**Figure 3. Techniques d'assistance bi ventriculaires, type Thoratec® à gauche et Cardiowest® à droite.**

Peu de données sont disponibles sur l'efficacité de ces systèmes d'assistance. En 2001, Rose et al.<sup>44</sup> ont randomisé 129 patients en attente d'une transplantation cardiaque entre un traitement médical seul ou un traitement médical et une assistance cardiaque mono ventriculaire. Les patients de cette étude, inclus dans le groupe « assistance », avait une réduction significative du risque de mortalité toutes causes de 48% en valeur relative. Dans une autre étude prospective ayant inclus 67 patients en attente de transplantation cardiaque et tous implantés d'une assistance mono ventriculaire,<sup>45</sup> une amélioration du remodelage du ventricule gauche a été observée au cours du suivi (diminution de la taille du ventricule gauche).

#### 1.1.3.3.6. Le cœur artificiel

Les travaux sur le cœur artificiel total ne sont aujourd'hui qu'au début de leur histoire chez l'homme.<sup>46,47</sup> Très récemment en 2014, sous l'égide du Pr Carpentier, les deux premiers patients au monde ont été implantés en France d'un système Carmat® (cœur artificiel total). Ce système nécessite une chirurgie lourde au cours de laquelle l'ensemble du cœur natif du patient est explanté pour mettre en place le système Carmat® (Figure 4). Ce système est une double pompe pulsatile entièrement recouverte de tissu inerte rendant en théorie possible l'absence d'anticoagulation au long cours. Les résultats de ces 2 premiers patients sont prometteurs. Bien sûr de nombreux autres travaux seront nécessaires avant de voir cette technique devenir une réelle alternative dans la prise en charge des patients avec IC sévère.



*Figure 4. Le cœur artificiel total, le système Carmat®.*

#### 1.1.3.4. Synthèse sur le traitement de l'IC

De nombreuses molécules et systèmes implantables sont aujourd'hui disponibles pour améliorer le pronostic des patients atteints d'une IC systolique. Il faut néanmoins noter que ces traitements ont fait leur preuve dans des populations de patients avec une FEVG particulièrement basse ( $\leq 35-40\%$ ) et que leur bénéfice n'est pas clairement démontré pour les patients avec FEVG intermédiaire (entre 40% et 50%).

Le socle du traitement repose aujourd'hui sur une association d'un traitement par IEC et d'un traitement par  $\beta$ -bloquants. Ensuite, différentes possibilités sont envisageables si le patient reste symptomatique avec une FEVG  $\leq 35\%$ . Le choix de l'incrémentation des traitements dépend de plusieurs paramètres (classe NYHA, FEVG, largeur du QRS, ...) et l'arbre décisionnel actuellement soutenu par les recommandations européennes est montré sur la Figure 5.<sup>1</sup> La transplantation cardiaque et les différentes techniques d'assistance cardiaque sont envisagées en dernier recours en cas d'échec thérapeutique et repose sur des critères très stricts. La place du LCZ696 et, à un autre niveau, celle du cœur artificiel total reste aujourd'hui à définir.

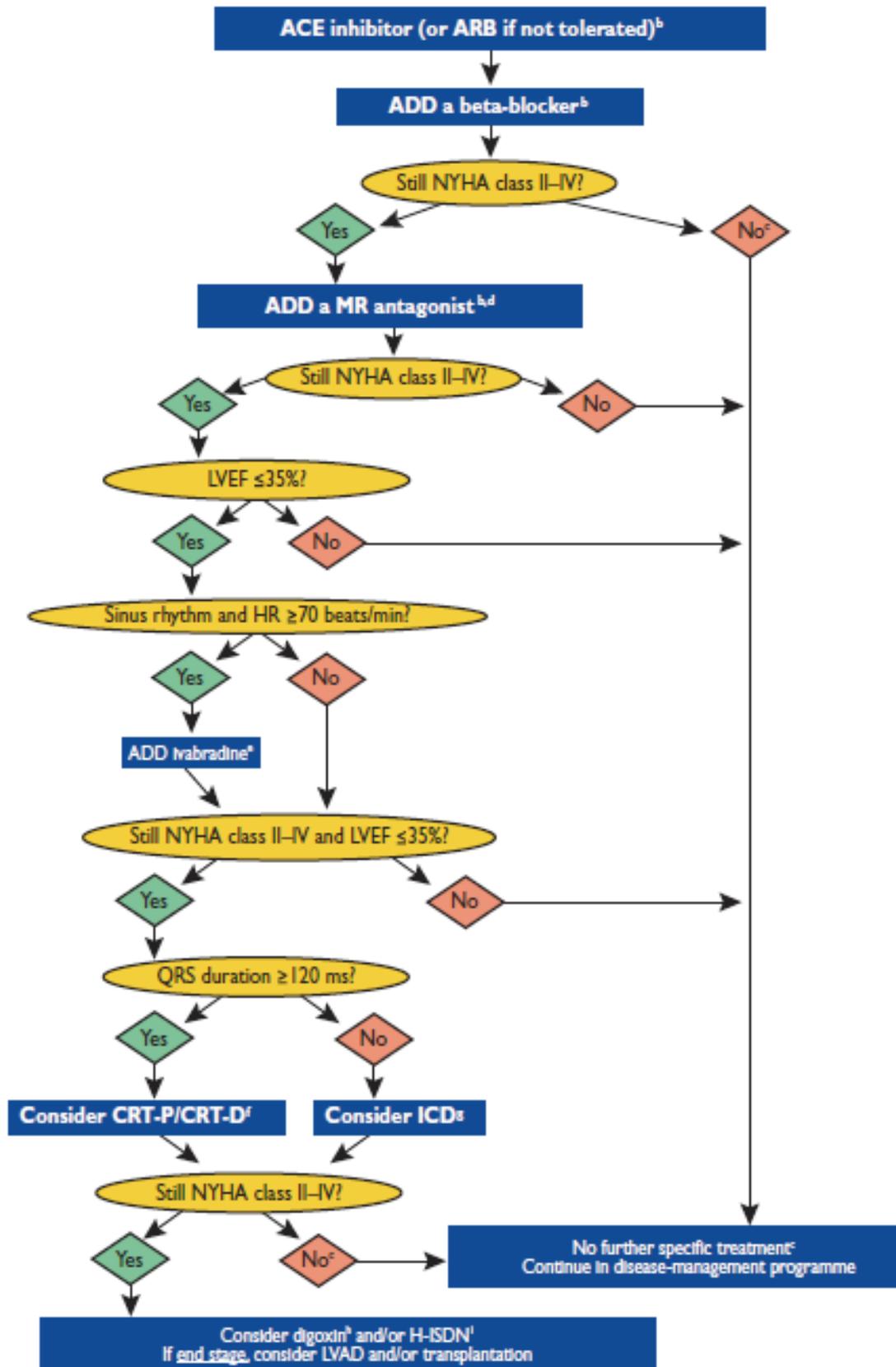
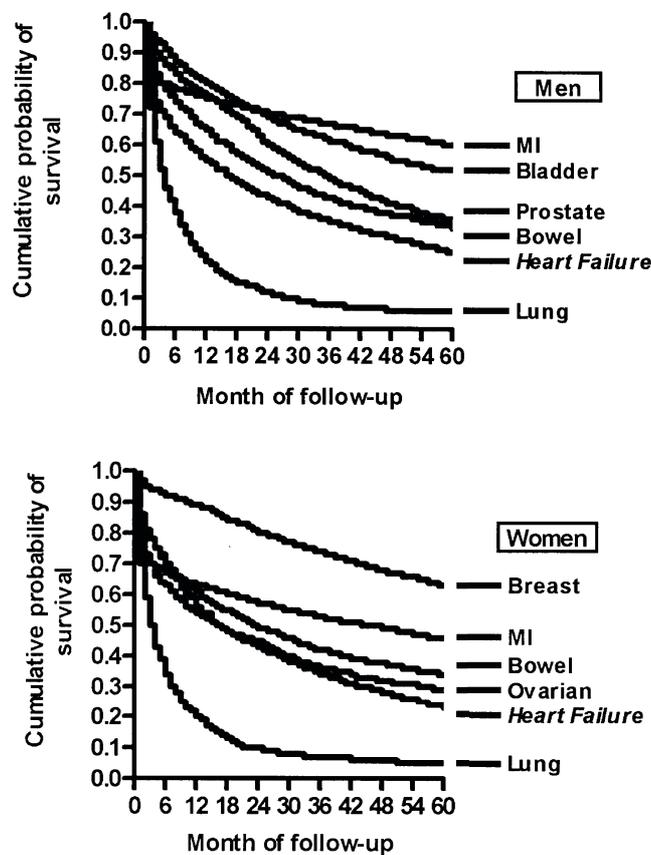


Figure 5. Arbre décisionnel du traitement de l'IC systolique selon les recommandations européennes de Cardiologie. Adapté de McMurray et al.<sup>1</sup>

## 1.1.4. Evaluation pronostique

### 1.1.4.1. Généralités

L'IC est une pathologie grave. En dépit des importants progrès thérapeutiques, la mortalité des patients insuffisants cardiaques demeure élevée, en particulier pour les formes les plus sévères de la maladie, avec une mortalité qui peut atteindre 50% à 5 ans.<sup>48</sup> Stewart et al.<sup>49</sup> ont ainsi pu montrer que le pronostic à 5 ans des patients hospitalisés pour IC était moins bon que celui des patients hospitalisés pour un IDM ou pour la plupart des cancers ; dans ce travail, il n'y avait guère que les patients hospitalisés pour un cancer du poumon qui avaient un pronostic plus sombre (Figure 6).



**Figure 6. Comparaison du pronostic des patients hospitalisés pour IC, IDM ou cancer dans une cohorte de 31066 patients. Adapté de Stewart et al.<sup>49</sup>**

L'évaluation pronostique fait donc partie intégrante de la prise en charge du patient insuffisant cardiaque. En effet comme mentionné précédemment, les patients identifiés à « haut risque » peuvent ainsi être considérés pour les thérapies invasives de recours que sont l'assistance et/ou la transplantation cardiaque.

#### 1.1.4.2. Les paramètres démographiques et cliniques

##### 1.1.4.2.1. *L'âge*

Comme pour de nombreuses pathologies, notamment cardiovasculaires, l'âge est presque systématiquement retrouvé dans la littérature comme un fort paramètre prédicteur de mauvais pronostic chez les patients atteints d'une IC systolique. Ainsi, plus l'âge est élevé et moins bon est le pronostic du patient, que ce soit à court ou à long termes. Dans la littérature, *l'hazard ratio* (HR) lié à l'âge pour prédire la mortalité oscille entre 1.25 et 1.8 par tranche de 10 ans supplémentaires.<sup>50-53</sup>

Certains auteurs ont évoqué que le mauvais pronostic lié à l'âge était exclusivement lié à la présence plus fréquente de co-morbidités (insuffisance rénale, anémie, démence, ...). La présence de ces co-morbidités explique probablement une large partie du sur-risque associé à l'âge. Néanmoins, d'autres publications suggèrent que l'âge reste un facteur prédictif indépendant après ajustement sur ces principales co-morbidités.<sup>54</sup>

En France, dans le cadre de l'IC dite « terminale », lorsqu'il est nécessaire de discuter les stratégies invasives telles que l'assistance ou la transplantation cardiaque, aucune limite d'âge n'est clairement établie pour récuser un patient. L'âge pris isolément ne constitue pas un facteur limitant. Toutefois, en pratique clinique, la limite de 65 ans est souvent évoquée comme l'un des paramètres décisionnaires en raison, encore une fois, du risque non négligeable de complications associé à ces stratégies invasives.

##### 1.1.4.2.2. *Le sexe*

Le sexe masculin est un facteur de risque cardiovasculaire d'athérosclérose clairement reconnu aujourd'hui. Dans l'IC systolique, la place du sexe masculin comme facteur pronostique est difficile à évaluer et dépend en partie de la cause de la dysfonction ventriculaire gauche : ischémique versus non ischémique. Selon la littérature, il semble néanmoins que le sexe masculin soit un facteur pronostique associé à la mortalité dans l'IC systolique chronique,<sup>50,51,55</sup> y compris lorsque la cause n'est pas d'origine ischémique.<sup>50</sup>

##### 1.1.4.2.3. *La cause ischémique*

La cause de la cardiopathie a été identifiée comme facteur pronostique dans de multiples publications.<sup>51,56,57</sup> Ainsi, les patients atteints d'une IC systolique d'origine ischémique sont généralement à plus mauvais pronostic que ceux atteints d'une IC d'origine non ischémique, c'est à dire sans antécédent d'IDM. Il faut bien distinguer l'IC systolique d'origine ischémique (avec antécédent d'IDM) de la présence d'une IC systolique associée à une coronaropathie sans antécédent d'IDM et qui n'est pas l'étiologie à proprement parler de

la dysfonction ventriculaire gauche. En pratique clinique, cette distinction est parfois difficile à faire ; d'autant que certains auteurs ont également évoqué qu'une coronaropathie sévère multi-tronculaire pourrait être à l'origine d'une dysfonction ventriculaire gauche par phénomène d'hibernation cellulaire.<sup>58</sup> L'évolution de l'IC systolique après revascularisation myocardique permet souvent de faire la part des choses : présence ou absence de récupération.<sup>58</sup> Par ailleurs, la simple présence d'une coronaropathie ou toutes autres localisations d'athérosclérose est un facteur pronostique reconnu dans la littérature (y compris en l'absence d'antécédent d'IDM). En effet, la présence d'une athérosclérose évoluée expose au risque de complications vasculaires.

Quoi qu'il en soit, la présence d'une zone de nécrose myocardique plus ou moins large est à l'origine d'une moins bonne réponse aux différents traitements pharmacologiques. Il a en effet été montré que le remodelage ventriculaire et les troubles de cinétique liés à la plage de nécrose après un IDM sont moins sensibles aux traitements. La perte cellulaire myocardique et la fibrose cicatricielle sont en effet souvent plus importantes dans ce contexte que dans d'autres causes d'IC systolique.

#### *1.1.4.2.4. La classe NYHA*

La classe NYHA est un paramètre qui permet d'évaluer le niveau d'essoufflement (ou de dyspnée) des patients à l'effort. Ce paramètre repose sur l'interrogatoire du patient et est souvent très subjectif. La définition des 4 stades de la classe NYHA est reprise dans le Tableau 5.

Malgré sa subjectivité, ce paramètre est constamment associé de manière forte au pronostic des patients atteints d'une IC systolique dans la littérature.<sup>53,59</sup> Ainsi, plus le stade de la classe NYHA est élevé, moins bon est le pronostic. Il faut par ailleurs noter que ce critère est un critère essentiel dans la prise en charge des patients atteints d'une IC systolique puisqu'il permet d'une part d'évaluer leurs symptômes et d'autre part de prendre la décision d'incrémenter ou non le traitement, comme montré dans la Figure 5 qui reprend l'arbre décisionnel de la stratégie thérapeutique dans l'IC systolique chronique selon les recommandations européennes.

**Tableau 5. Définition des différents stades de la classe NYHA.**

Classe NYHA	
I	IC asymptomatique, absence de dyspnée anormale
II	Dyspnée ressentie pour des efforts importants (en pratique, montée des escaliers)
III	Dyspnée ressentie pour des efforts modérés (en pratique, marche <100m sur terrain plat)
IV	Dyspnée de repos ou pour des efforts minimes de la vie quotidienne (en pratique, patient alité, dyspnée lors de l'habillage ou toilette)

#### *1.1.4.2.5. Le diabète*

Le diabète a clairement été identifié comme un facteur pronostique indépendant dans l'IC systolique dans de nombreuses études qu'il soit ou non insulino-traité.<sup>60-64</sup> Dans une méta-analyse récente de la littérature analysant les données de 117 modèles statistiques de prédiction du risque d'évènements cardiovasculaires dans l'IC au sens large, le diabète a été associé au pronostic des patients dans 41 d'entre eux avec un HR moyen de 1,44.<sup>59</sup> Ces résultats ont été confirmés dans une autre méta-analyse focalisant sur la prédiction du risque de décès et/ou hospitalisations.<sup>53</sup>

#### *1.1.4.2.6. Antécédent de mort subite ressuscitée*

Ce paramètre, très simple à recueillir, est un critère pronostique tout à fait majeur comme en témoignent les résultats des études sur le bénéfice de l'implantation d'un défibrillateur en prévention secondaire d'une tachycardie ventriculaire ou d'une mort subite ressuscitée.<sup>36</sup> Nous ne détaillerons pas ici les résultats de ces études déjà évoqués dans le paragraphe sur les traitements non pharmacologiques de l'IC systolique.

#### *1.1.4.2.7. Antécédent d'hospitalisations pour IC*

L'antécédent d'hospitalisations pour cause d'IC décompensée est également un critère simple à recueillir et est associé de façon très claire dans la littérature à un plus mauvais pronostic.<sup>65,66</sup> Le pronostic des patients hospitalisés pour une IC décompensée, qu'ils soient connus porteurs d'une IC chronique ou que cette décompensation soit inaugurale, est extrêmement sombre. En effet, le risque de décès dans la première année suivant cette hospitalisation est d'environ 25%.<sup>65</sup> Solomon et al.<sup>66</sup> ont par ailleurs retrouvé dans une étude de 7599 patients atteints d'une IC systolique, que le risque de décès était multiplié par plus de 3 en cas d'antécédent d'hospitalisations pour IC (après ajustement sur les facteurs confondants) et que ce risque était encore majoré par d'une part la durée nécessaire de l'hospitalisation et d'autre part la survenue d'hospitalisations récurrentes. A noter, que ce

risque diminue en fonction du temps écoulé depuis la dernière hospitalisation pour IC dans cette étude. Ainsi, plus la dernière hospitalisation est récente, plus le risque est élevé avec un risque multiplié par environ 6 dans le premier mois suivant l'hospitalisation.

#### 1.1.4.2.8. *La dépression*

La présence d'un état dépressif ainsi que sa gravité ont été identifiées dans la littérature comme un facteur prédictif important de décès dans le cadre de l'IC systolique.<sup>67-70</sup> De nombreuses études, utilisant des évaluations diverses et variées de la dépression des patients, ont ainsi pu confirmer cette relation.<sup>67</sup> Les mécanismes reliant la dépression au mauvais pronostic sont en revanche mal connus, mal identifiés et vraisemblablement multiples. Certains auteurs ont ainsi évoqué que la dépression entraînerait une mauvaise compliance des patients aux traitements, une inactivité physique, la difficulté d'un sevrage tabagique, et une fréquence plus élevée de syndrome d'apnée du sommeil.<sup>67,70-72</sup> Dans une étude publiée par Riegel et al.,<sup>73</sup> la dépression était associée à une moins bonne compréhension de la maladie par les patients et à une moins bonne « auto prise en charge ». A ce jour, aucune relation entre les différents traitements utilisés dans la dépression et le pronostic des patients atteints d'IC systolique n'a été retrouvée.

#### 1.1.4.3. Les paramètres électrocardiographiques

##### 1.1.4.3.1. *La largeur du QRS et le bloc de branche gauche*

La largeur du QRS est un critère relativement simple à évaluer sur l'électrocardiogramme de surface en pratique clinique. Dans une sous-analyse de l'étude Val-HeFT incluant 248 patients hospitalisés pour IC, Hofmann et al. ont montré que plus le QRS était large, plus le pronostic des patients était mauvais.<sup>74</sup> En pratique, de nombreux seuils sont évoqués (120, 130, 150, 160 ms)<sup>74-77</sup> pour faciliter l'évaluation et la prise en charge des patients mais il semble que le risque soit relativement linéaire. Comme mentionné dans le paragraphe sur la place de la resynchronisation cardiaque dans le traitement de l'IC systolique, la largeur du QRS est un élément décisionnaire important dans la stratégie thérapeutique des patients et un marqueur simple de la présence d'un asynchronisme cardiaque. Il faut néanmoins insister sur le fait que dans la littérature, seule la présence d'un bloc de branche gauche a réellement fait la preuve de son association avec le pronostic des patients. A l'inverse, les données sur le bloc de branche droite sont plus rares et moins tranchées.

#### 1.1.4.3.2. *La survenue de troubles du rythme ventriculaire*

Il semble qu'une hyperexcitabilité ventriculaire sévère puisse être associée à une aggravation durable de la FEVG chez certains patients.<sup>78</sup> En effet, il est reconnu que l'efficacité mécanique d'une extrasystole est moindre que celle d'un battement cardiaque normal conduisant à une réduction du volume d'éjection systolique. Par ailleurs, l'ablation par radiofréquence d'extrasystoles ventriculaires a montré dans de petites études une amélioration de la FEVG et du remodelage ventriculaire gauche.<sup>78-80</sup>

Toutefois, au delà de la mort subite ressuscitée et de la tachycardie ventriculaire soutenue déjà évoquées précédemment, l'impact de l'hyperexcitabilité ventriculaire (survenue de tachycardies ventriculaires non soutenues ou extrasystoles ventriculaires fréquentes) sur la mortalité (notamment d'origine rythmique) n'a pas à ce jour été clairement identifié.<sup>78</sup> Ce critère, pris isolément, n'est d'ailleurs pas à ce jour une indication d'implantation de défibrillateur. En effet, les données de la littérature sont discordantes : certains auteurs suggérant que l'hyperexcitabilité ventriculaire est un facteur pronostique notamment dans le contexte du post-IDM, d'autres à l'inverse ne retrouvant pas cette association.<sup>81-87</sup> Il faut par ailleurs insister sur le fait qu'aucune molécule pharmacologique anti-arythmique (en dehors du traitement  $\beta$ -bloquant déjà indiqué) n'a pu montrer un bénéfice sur le pronostic des patients en réduisant ce critère, certaines molécules ayant même été associées à un sur-risque de décès.<sup>78,88-91</sup> La valeur pronostique de l'hyperexcitabilité ventriculaire est donc débattue et sa prise en charge reste controversée. De nouvelles investigations seront nécessaires pour conclure définitivement.

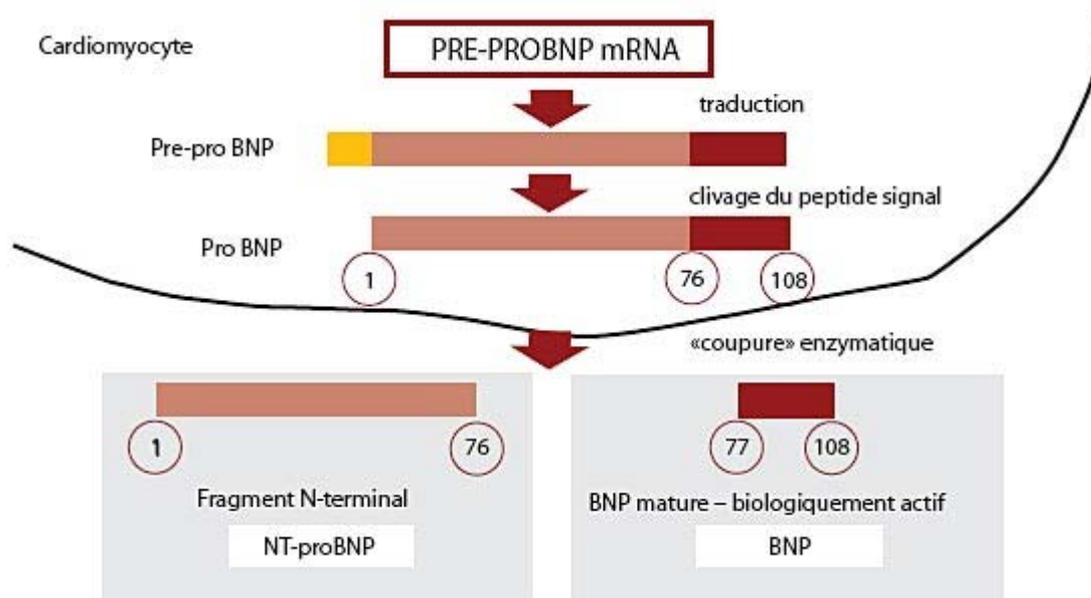
#### 1.1.4.3.3. *La survenue d'une fibrillation atriale*

La fibrillation atriale a été associée au pronostic des patients avec IC systolique dans de nombreuses études.<sup>60,64,92,93</sup> Les raisons en sont très probablement multifactorielles. Premièrement cette pathologie entraîne une perte de la systole efficace atriale, ce qui chez un patient ayant également une dysfonction ventriculaire gauche peut avoir des conséquences hémodynamiques sévères, source de ré-hospitalisations pour IC décompensée. Deuxièmement, la fibrillation atriale est aussi un marqueur de la dilatation des cavités cardiaques, notamment de l'oreillette gauche, et de la sévérité de l'insuffisance mitrale. Enfin, cette pathologie nécessite un recours aux traitements anticoagulants oraux au long cours avec leurs complications propres, notamment un risque hémorragique élevé.

#### 1.1.4.4. Les paramètres biologiques

##### 1.1.4.4.1. BNP et NT-proBNP

Le précurseur du peptide natriurétique B (BNP) et du « N-terminal-pro-brain natriuretic peptide » (NT-proBNP) est le « pre-pro-brain natriuretic peptide (pre-pro-BNP), un peptide de 134 acides aminés synthétisé par les myocytes en réponse au stress mécanique exercé sur les parois intracavitaires notamment du ventricule gauche (mais pas seulement). Ce peptide est ensuite clivé pour obtenir le pro-BNP de 108 acides aminés. Le pro-BNP est finalement clivé par une endoprotéase circulante en 2 peptides : le BNP de 32 acides aminés (biologiquement actif) et le NT-proBNP de 76 acides aminés (inactif mais plus stable et avec une demi-vie plus longue). Cette séquence de clivage est résumée sur la Figure 7.



**Figure 7. Séquence de clivage du BNP et de ses précurseurs.**

Initialement le BNP a été identifié comme variable pronostique dans l'IC systolique par Tsutamoto et al. en 1997 dans une étude ayant inclus 85 patients avec IC systolique (FEVG <45%).<sup>94</sup> Dans cette étude, le niveau de BNP était 5 fois plus élevé chez les patients décédés que chez les survivants. Le BNP était également associé à la mortalité après ajustement sur les facteurs confondants. Depuis, de nombreuses études plus larges ont confirmé l'apport majeur du BNP dans l'évaluation pronostique et la stratification du risque des patients avec IC systolique, quelque soit le niveau de leur FEVG.<sup>95-99</sup> La plupart de ces études ont également confirmé son association indépendante à la mortalité. A titre d'exemple,

de Groote et al. ont pu montrer dans une étude de 407 patients qu'un taux de BNP >109 pg/mL multipliait le risque de décès cardiovasculaire par quasiment 3,5 ;<sup>95</sup> et ce, de manière indépendante des autres variables pronostiques notamment du pic de VO<sub>2</sub> obtenu lors d'une épreuve d'effort métabolique.

Il est par ailleurs intéressant de noter que Jourdain et al. ont suggéré qu'un dosage régulier du BNP permettrait d'améliorer la prise en charge des patients avec IC systolique et d'adapter leurs doses de traitement.<sup>100</sup> Ainsi dans une étude de 220 patients en stade II et III de la classe NYHA, un dosage régulier du BNP entraînait des modifications plus fréquentes des doses de médicaments mais surtout diminuait de manière significative le critère combiné décès en lien avec l'IC et/ou durée d'hospitalisation à 15 mois par rapport aux patients suivis uniquement cliniquement sans le dosage régulier du BNP (24% versus 52%). A noter que l'effet était essentiellement observé sur la durée d'hospitalisation. Actuellement aucune étude n'a pu montrer un éventuel bénéfice d'une telle stratégie sur la mortalité et le dosage régulier du BNP pour améliorer la prise en charge des patients et leur traitement est donc actuellement débattu ; ce qui n'enlève absolument rien à son intérêt majeur dans l'évaluation pronostique des patients.

De façon très similaire au BNP, de nombreuses études ont montré la valeur pronostique du NT-proBNP dans l'IC systolique.<sup>101-104</sup> Dans une analyse post hoc de l'étude COPERNICUS portant sur 1011 patients,<sup>101</sup> le NT-proBNP était associé de manière très forte et indépendante au pronostic (mortalité toutes causes) avec un risque relatif de 2,7 pour les patients au dessus de la médiane (=1767 pg/mL).

Une seule étude de grande envergure et ayant inclus 3916 patients a comparé en face à face la valeur pronostique respective du BNP et du NT-proBNP dans l'IC systolique.<sup>102</sup> Dans cette étude, le NT-proBNP était très légèrement supérieur au BNP (Tableau 6).<sup>102</sup> Il n'y avait pas de différence significative pour la prédiction de la mortalité entre les deux biomarqueurs (AUC=0,679 versus 0,665, p=0,073) mais le NT-proBNP était discrètement mais significativement supérieur au BNP pour la prédiction des hospitalisations pour aggravation de l'IC (AUC=0,685 versus 0,665, p=0,014). Les auteurs suggèrent que la meilleure stabilité et la demi-vie plus longue du NT-proBNP pourraient expliquer le fait qu'il soit un meilleur reflet du stress mécanique.

**Tableau 6. Comparaison de la valeur pronostique respective du BNP et du NT-proBNP. Adapté de Masson et al.<sup>102</sup>**

	All-cause mortality 758 events		Hospitalization for HF 634 events	
	NT-proBNP	BNP	NT-proBNP	BNP
Optimal prognostic value, ng/L	1016	125	1007	126
AUC (SE)	0,679 (0,011)	0,665 (0,011)	0,685 (0,011)	0,665 (0,012)
P value	0,0734		0,0143	
Sensitivity	0,666	0,636	0,699	0,648
Concentration at 95% sensitivity, ng/L	202	18	250	14
Specificity	0,600	0,620	0,590	0,620
Concentration at 95% specificity, ng/L	4643	531	5015	546

Toutefois, le niveau de NT-proBNP est clairement associé à l'âge et à la fonction rénale ; et ce, de manière beaucoup plus importante que le BNP. Ainsi, dans un contexte un peu différent de celui de l'évaluation pronostique et qui est celui du diagnostic des cas complexe de dyspnée, il est actuellement recommandé d'utiliser des seuils différents (plus élevés) de NT-proBNP dans ces sous populations pour retenir le diagnostic d'IC. L'utilisation du NT-proBNP pourrait donc s'avérer au final plus complexe en pratique clinique lorsqu'il s'agit de définir des seuils pour modifier les stratégies de surveillance ou de prise en charge thérapeutique des patients.

#### 1.1.4.4.2. Troponines

Les troponines cardiaques T et I, protéines de la myofibrille, ont été identifiées depuis plusieurs années maintenant comme des marqueurs spécifiques et sensibles de la mort cellulaire des myocytes. Ces protéines ne sont pas spécifiques de la maladie coronaire mais du myocyte. Dans le cadre de l'IC systolique chronique, l'augmentation des troponines circulantes peut s'expliquer par divers mécanismes dont les deux principaux sont : la survenue d'un véritable syndrome coronaire aigu, évènement possible compte tenu du fait que la cause ischémique est la principale cause d'IC systolique dans les pays industrialisés – et un relargage chronique (et souvent très modéré) par apoptose et/ou nécrose cellulaire en lien avec le stress des myocytes et la progression de la maladie et en absence de tout évènement coronaire.<sup>105,106</sup>

Le rôle pronostique des troponines dans le syndrome coronaire aigu est aujourd'hui clairement établi et ne sera pas détaillé ici.

Le relargage des troponines dans l'IC systolique chronique en dehors d'un évènement coronaire est souvent relativement faible et en lien avec une mort cellulaire progressive, par apoptose et/ou par nécrose, dont les mécanismes ne sont pas clairement authentifiés et parmi lesquels l'inflammation, le stress oxydatif, le stress pariétal par surcharge et l'activation

neurohormonale ont été évoqués.<sup>105,106</sup> La valeur pronostique des troponines T et I a été retrouvée dans plusieurs publications.<sup>105,107-111</sup> A titre d'exemple, Hudson et al.<sup>108</sup> ont retrouvé qu'un relargage de troponine T était détectable (>0,02 ng/mL) chez 24% des patients avec IC systolique et que les patients avec une troponine T élevée avaient un risque relatif de décès multiplié par plus de 4 dans une étude portant sur 136 patients ambulatoires. De façon très similaire, Horwich et al.<sup>109</sup> ont retrouvé qu'un relargage de troponine I était détectable (>0,04 ng/mL) chez 49% des patients et que les patients qui avaient un taux élevé de troponine I avaient un risque relatif de décès multiplié par plus de 2 dans une étude portant sur 238 patients. Plus récemment, Latini et al.<sup>105</sup> ont pu démontrer que l'utilisation d'un dosage plus sensible de la troponine T circulante (high sensible troponin T) permet de détecter un relargage basal de troponine T chez plus de 90% des patients avec IC systolique (seuil <0,001 ng/mL) contre 10% avec un test usuel moins sensible (seuil <0,01 ng/mL) dans une analyse *post hoc* des 4053 patients inclus dans l'étude Val-HeFT. Dans cette analyse, le degré d'élévation de la troponine T hyper sensible était indépendamment associé à la mortalité avec un HR de 1,04 pour chaque augmentation de 0,01 ng/mL. Ainsi, l'accès à des dosages plus sensibles de la troponine T permet d'améliorer de façon significative la stratification du risque des patients avec IC systolique.

D'autres marqueurs de mort cellulaire tels que la *creatine phospho-kinase* (CPK), la CPK-MB, la myoglobine, la *myosin light chain 1* et la *heart fatty-acid binding protein* (H-FABP) ont montré des résultats concordants et prometteurs. Les données concernant ces biomarqueurs seront discutées dans le paragraphe sur la recherche de nouveaux biomarqueurs circulants par approche « candidate ».

#### 1.1.4.4.3. Hyponatrémie

L'hyponatrémie a été identifiée comme un puissant facteur pronostique dans l'IC systolique.<sup>53,59,112-114</sup> Le lien direct et causal entre l'hyponatrémie et le risque de décès reste néanmoins mal appréhendé et vraisemblablement multifactoriel. Une chose est certaine : l'hyponatrémie est directement corrélée au niveau d'activation neurohormonale, à la fonction rénale et aux doses de traitements diurétiques de l'anse de Henlé utilisées. Elle semble donc être un reflet de l'état de surcharge et de congestion du patient.

Dans une étude portant sur 401 patients, l'hyponatrémie a été associée à la mortalité de façon indépendante que ce soit dans la cardiopathie d'origine ischémique avec un risque relatif à 3,7 pour une natrémie <134 mmol/L ou dans la cardiopathie non ischémique avec un risque relatif de 1,9 pour le même seuil.<sup>112</sup> Dans une large méta-analyse récemment publiée,

l'hyponatrémie a été identifiée dans 44 modèles sur 117 analysés comme un facteur prédictif de mortalité.<sup>53</sup>

#### 1.1.4.4.4. *Insuffisance rénale*

L'insuffisance rénale est un facteur de mauvais pronostic très fréquemment retrouvé dans les différents modèles statistiques de la littérature notamment dans le domaine des pathologies cardiovasculaires : athérosclérose et IC. Dans le cadre de l'IC systolique, la présence d'une insuffisance rénale a été identifiée comme facteur prédictif indépendant de mortalité dans de très nombreuses études.<sup>53,59,112,115-119</sup>

Dans ce contexte précis, il est par ailleurs important de noter que l'insuffisance rénale complique parfois fortement la prise en charge thérapeutique des patients en raison de la nécessité d'avoir recours à certaines molécules néphro-toxiques parmi lesquelles figurent notamment les IEC, les ARA2 et les anti aldostérones. La présence d'une insuffisance rénale génère par ailleurs souvent une aggravation de l'état de surcharge volémique des patients, une moins bonne réponse aux traitements diurétiques et une activation neurohormonale (cf. paragraphe sur l'activation neurohormonale).<sup>116</sup> Enfin, l'insuffisance rénale s'accompagne également d'anémie plus fréquente (cf. paragraphe sur l'impact de l'anémie).

Actuellement, l'insuffisance rénale est le plus souvent évaluée en pratique clinique par la mesure de la créatinine sanguine et par le calcul de la clairance de cette créatinine par la méthode de Cockcroft-Gault ou la méthode *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD). Hillege et al.<sup>115</sup> ont rapporté dans une étude portant sur 372 patients avec IC systolique que l'estimation de la clairance de la créatinine était un puissant facteur prédictif de mortalité. Dans cette étude, les patients avec le quartile de clairance le plus bas (<44 mL/min) avaient un risque relatif de décès 2,85 fois plus élevé que les patients du quartile le plus élevé (>76 mL/min). Dans une analyse *post hoc* de l'étude SOLVD (n=4228 patients), une clairance de la créatinine modérément altérée et <60 mL/min était associée à un sur-risque de décès multiplié par 1,4.<sup>117</sup>

Des données tout à fait similaires ont été observées avec le taux d'urée plasmatique, reflétant également la fonction rénale mais de façon moins précise que la clairance de la créatinine.<sup>54,120-122</sup>

Plus récemment, la cystatine C et la *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL), tous deux marqueurs de la fonction rénale, ont été évoqués comme facteurs pronostiques de l'IC systolique. Les données concernant ces biomarqueurs seront discutées

dans le paragraphe sur la recherche de nouveaux biomarqueurs circulants par approche « candidate ».

#### 1.1.4.4.5. Anémie

Quelque soit la pathologie étudiée et même chez le patient considéré « sain par ailleurs », l'anémie a toujours été associée au mauvais pronostic dans la littérature.

La prévalence de l'anémie est relativement élevée chez les patients avec IC systolique mais reste difficile à évaluer avec précision en raison de l'absence de définition consensuelle. Actuellement, selon une revue de la littérature, cette prévalence oscille entre 4% et 61% selon les définitions et les populations étudiées avec une médiane à 18%.<sup>114,123-125</sup> Cette prévalence augmente nettement chez les patients combinant une IC systolique et une insuffisance rénale (30-61% avec versus 4-23% sans), ainsi que chez les patients nécessitant un traitement antithrombotique au long cours pour traiter la cause de la cardiopathie ou une pathologie intercurrente.

Dans une méta-analyse récente s'intéressant à l'impact de l'anémie sur le pronostic des patients avec IC systolique et incluant 97699 patients, la présence d'une anémie augmentait de 66% le risque de décès toutes causes.<sup>123</sup> Par ailleurs, il existait, dans cette étude, une étroite relation entre le degré (ou la sévérité) de l'anémie et le taux de décès et de ré-hospitalisations.

#### 1.1.4.5. Les paramètres d'imagerie

##### 1.1.4.5.1. La fraction d'éjection ventriculaire gauche

La fonction et notamment la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) peut être évaluée par différentes techniques d'imagerie. La technique la plus souvent utilisée est bien entendu l'échographie cardiaque dont les principales limites sont l'échogénicité du patient et sa dépendance de l'expérience de l'opérateur qui réalise l'examen. D'autres techniques sont actuellement disponibles notamment l'imagerie par résonance magnétique (IRM) cardiaque (sous réserve d'une fréquence cardiaque de repos pas trop rapide) et l'évaluation isotopique par scintigraphie cardiaque (limite de l'irradiation). Ce paramètre est aujourd'hui indiscutable lorsqu'il s'agit d'évaluer le pronostic des patients avec IC. De nombreux auteurs ont en effet pu montrer la valeur pronostique de ce paramètre dans l'IC systolique.<sup>53,56,59,64,87,114,126-130</sup> Ainsi, plus la FEVG est élevée et meilleur est le pronostic du patient. A titre d'exemple, chaque diminution de 5% de la FEVG était associée à un sur-risque de décès avec un HR de 1,14 dans une analyse *post hoc* de l'étude CHARM.<sup>64</sup>

Ce critère permet en outre de définir le type d'IC : systolique ou diastolique (FEVG préservée) mais aussi et surtout de prendre les décisions thérapeutiques adaptées. Nous avons en effet vu précédemment que l'initiation de nombreux traitements n'était envisagée que pour un seuil de FEVG  $\leq 35\%$ .

#### *1.1.4.5.2. La fraction d'éjection ventriculaire droite*

La reconnaissance de l'importance de l'évaluation de la fonction ventriculaire droite chez les patients porteurs d'une IC systolique gauche n'a fait que croître ces dernières années. Ainsi, la dysfonction ventriculaire droite qui peut être évaluée par différentes techniques d'imagerie (cf. paragraphe sur la valeur pronostique de la FEVG) est aujourd'hui considérée comme un facteur pronostique indépendant très important.<sup>131-136</sup> Il faut néanmoins noter que son évaluation échographique est complexe et requière une formation et une expertise particulière. Récemment, de Groote et al.<sup>131</sup> ont confirmé la valeur pronostique très forte de la fonction ventriculaire droite et qu'une évaluation de celle-ci permettait une amélioration significative de la stratification du risque des patients avec IC systolique dans une étude de 527 patients. Par ailleurs, la présence d'une dysfonction ventriculaire droite a été associée à une réduction des capacités physiques et de la tolérance à l'effort des patients.<sup>133</sup> Enfin, une évaluation fine de la fonction ventriculaire droite est nécessaire chez les patients les plus graves lorsqu'il s'agit de discuter l'indication d'une assistance cardiaque afin d'évaluer sa faisabilité d'une part et de décider le type de système à implanter d'autre part.

#### *1.1.4.5.3. Le remodelage et la dilatation du ventricule gauche*

La présence d'un remodelage et d'une dilatation du ventricule gauche ont été identifiées dans plusieurs études comme des facteurs pronostiques de l'IC systolique<sup>87,137,138</sup> à tel point que ces critères sont fréquemment utilisés comme un critère d'évaluation substitutif dans cette pathologie, lorsque l'évaluation des critères cliniques est rendue impossible en raison de la petite taille de l'effectif de certaines études.

Ainsi, les volumes et les diamètres télé-sytoliques et télé-diastoliques ont tous montré leur association à la mortalité dans la littérature.<sup>87,137,138</sup> Il est en revanche difficile aujourd'hui de savoir s'il faut privilégier les mesures télé-sytoliques ou les mesures télé-diastoliques ; il semblerait néanmoins que le diamètre télé-diastolique du ventricule gauche soit plus fréquemment retrouvé comme facteur prédictif dans la littérature.<sup>137,138</sup> Saxon et al.<sup>138</sup> ont rapporté dans une étude de 528 patients que le diamètre télé-diastolique  $>44$  mm/m<sup>2</sup> était associé à un sur-risque de décès en lien avec l'IC et/ou de transplantation cardiaque en urgence (risque relatif de 3,9). Komajda et al.<sup>137</sup> ont rapporté dans une étude de 201 patients

que le volume télé-systolique et le diamètre télé-diastolique du ventricule gauche étaient associés de manière indépendante à la mortalité. Enfin, de Maria et al.<sup>87</sup> ont rapporté dans une étude portant sur 205 patients des résultats très similaires pour le diamètre télé-systolique du ventricule gauche.

#### *1.1.4.5.4. Les pressions de remplissage ventriculaires gauches*

Les pressions de remplissage ventriculaires gauches sont en pratique évaluées par échographie cardiaque et il n'est pas habituel de réaliser un cathétérisme cardiaque gauche pour mesurer directement ces pressions. L'évaluation se fait habituellement par la mesure de 3 paramètres que sont le flux mitral, le rapport entre l'onde E mitrale et l'onde Ea mesurée à l'anneau mitral par la technique de *doppler tissu imaging* (DTI) et le flux veineux pulmonaire.<sup>126</sup> Ces paramètres ont certaines limites (tachycardie, fibrillation atriale, valvulopathies mitrales...) qui doivent être connues et qui font que l'évaluation des pressions de remplissage ventriculaires gauches n'est pas toujours réalisable de façon fiable en pratique quotidienne.

Le flux mitral restrictif en comparaison d'un flux mitral pseudo normal ou de type trouble de la relaxation a été associé à un mauvais pronostic dans bon nombre d'articles.<sup>87,99,139-141</sup> De plus, la modification de ce flux mitral restrictif vers un flux pseudo normal ou de type trouble de la relaxation sous l'effet des traitements pharmacologiques de l'IC a, quant à elle, été associée à une amélioration du pronostic des patients.<sup>142</sup>

Concernant le rapport E/Ea, il semble que ce paramètre soit celui qui est le mieux corrélé aux pressions de remplissage ventriculaires gauches et le plus fiable à interpréter. Sa valeur pronostique a notamment été rapportée dans une étude ayant inclus 116 patients avec IC systolique (risque relatif de décès cardiovasculaire et/ou ré-hospitalisations pour IC de 13,6).<sup>99</sup> Dans cette étude, ce paramètre permettait d'améliorer de façon indépendante la stratification du risque des patients.

Enfin concernant le flux veineux pulmonaire, sa réalisation et son interprétation sont parfois complexes. L'analyse du rapport S/D et de l'onde Ap permet une évaluation des pressions de remplissage. Peu de données sont disponibles concernant la valeur prédictive de ce paramètre. Une étude publiée en 2000 suggère que la durée de l'onde Ap permettrait d'améliorer la stratification du risque des patients avec IC systolique.<sup>143</sup>

#### *1.1.4.5.5. La taille de l'oreillette gauche*

La taille de l'oreillette gauche est souvent dans ce contexte un reflet du régime de pressions intra atriales, elles mêmes étant augmentées en réponse à l'augmentation des

pressions intra ventriculaires gauches. Il est habituellement recommandé de mesurer le volume plutôt que le diamètre de l'oreillette gauche.

La valeur pronostique de la dilatation de l'oreillette gauche a été rapportée dans plusieurs études.<sup>87,144</sup> A titre d'exemple, Tamura et al.<sup>144</sup> ont pu montrer dans une étude de 146 patients que le volume de l'oreillette gauche était plus élevé chez les patients qui vont présenter un évènement cardiovasculaire (décès cardiovasculaire et/ou ré-hospitalisations pour IC) au cours du suivi que chez les autres : 56 versus 44 mL/m<sup>2</sup>. Surtout, le volume de l'oreillette gauche était associé de manière indépendante au pronostic des patients dans cette étude (risque relatif de 1,47 par déviation standard).

Il faut par ailleurs insister sur le fait que plus l'oreillette gauche est dilatée, plus le risque de fibrillation atriale est important.

#### *1.1.4.5.6. L'insuffisance mitrale*

En dehors du cadre où l'insuffisance mitrale, le plus souvent organique, est responsable de l'IC (IC d'origine valvulaire), la présence d'une insuffisance mitrale a été identifiée depuis de nombreuses années comme un facteur pronostique indépendant. Il faut préciser que le mécanisme de cette insuffisance mitrale peut être uniquement lié au remodelage ventriculaire gauche et à la dilatation des cavités cardiaques gauches (dite fonctionnelle) ou être lié à la fois au remodelage mais également au phénomène d'ischémie lorsque l'IC est d'origine ischémique. Les deux types d'insuffisance mitrale ont été associés au pronostic des patients dans la littérature.<sup>126,145-147</sup>

A titre d'exemple, l'insuffisance mitrale d'origine ischémique a montré sa valeur pronostique dans une étude de 303 patients avec IC systolique chronique d'origine ischémique (post-IDM).<sup>147</sup> Dans cette étude, la présence d'une insuffisance mitrale était associée à un sur-risque de décès (62% versus 39%). En analyse multivariée, le risque relatif ajusté était de 1,88. De plus, la gravité de cette insuffisance mitrale évaluée par un volume régurgité  $\geq 30$  mL ou une surface de l'orifice régurgitant  $\geq 20$  mm<sup>2</sup> permettait d'identifier un sous groupe de patients à plus mauvais pronostic : risque relatif à 2,05 et 2,23 respectivement.

Dans une autre étude ayant inclus 1421 patients avec une FEVG  $\leq 35\%$ , l'insuffisance mitrale fonctionnelle (non ischémique) a également montré des résultats très concordants.<sup>146</sup> Ainsi, une insuffisance mitrale sévère était associée à un risque de décès et/ou transplantation cardiaque en urgence multiplié par 1,84.

#### 1.1.4.5.7. *L'hypertension pulmonaire*

L'impact de ce paramètre qui peut le plus souvent être parfaitement évalué en échographie sera discuté dans le paragraphe sur les données du cathétérisme cardiaque droit, examen absolument nécessaire et incontournable pour évaluer les patients qui présentent une pression pulmonaire élevée à l'échographie cardiaque. Il permet en effet de mesurer avec précision le niveau d'hypertension pulmonaire (en s'affranchissant des limites de l'échographie : insuffisance tricuspide, échogénicité...) et surtout de statuer sur son origine : pré ou post capillaire.

#### 1.1.4.6. Les paramètres fonctionnels

##### 1.1.4.6.1. *Les paramètres de l'épreuve d'effort métabolique*

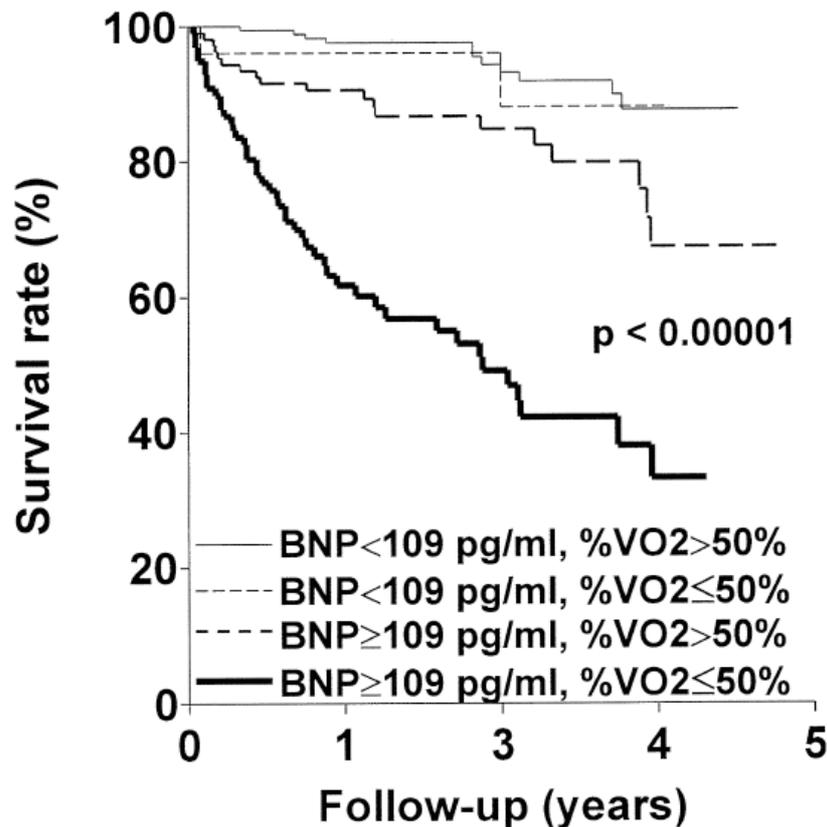
L'épreuve d'effort métabolique est un examen qui, comme son nom l'indique, nécessite la réalisation d'un effort et ne peut donc pas être réalisée chez tous les patients avec IC systolique. De plus, cet examen est consommateur de temps et il s'avère en pratique qu'il n'est pas systématiquement réalisé chez tous les patients avec IC systolique. Néanmoins, les données qui en découlent font vraisemblablement partie des facteurs pronostiques les plus puissants dans ce contexte.<sup>95,114,148-152</sup>

Globalement, cet examen permet d'évaluer 3 critères pronostiques : la durée de l'effort réalisé, la consommation maximale en O<sub>2</sub> qui peut être exprimée soit en valeur brute (pic de VO<sub>2</sub>) soit en valeur relative en pourcentage de la valeur maximale théorique pour le patient (%VO<sub>2</sub>), et la pente de VE/VCO<sub>2</sub>. En pratique, la consommation maximale en O<sub>2</sub> est le critère le plus utilisé dans la littérature et celui qui permet le mieux de sélectionner les patients pour une stratégie thérapeutique invasive, type assistance ou transplantation cardiaque. En effet, ce paramètre est celui qui reflète le mieux la réponse cardiovasculaire à l'effort. A l'opposé, la pente VE/VCO<sub>2</sub> évalue davantage la réponse ventilatoire à l'effort.

Mancini et al.<sup>150</sup> ont été les premiers à rapporter la valeur pronostique du pic de VO<sub>2</sub> en 1991 dans une étude de 114 patients avec IC systolique. Dans cette étude, les patients avec un pic de VO<sub>2</sub> >14mL/Kg/min avaient une mortalité de 6% à 1 an versus 30% pour les patients avec un pic de VO<sub>2</sub> ≤14 mL/Kg/min inscrits sur liste de transplantation et 53% pour les patients avec un pic de VO<sub>2</sub> ≤14 mL/Kg/min mais récusés à la transplantation. Le pic de VO<sub>2</sub> était un critère pronostique indépendant dans ce travail.

Dans une étude portant sur 407 patients avec IC systolique, de Groote et al.<sup>95</sup> ont clairement montré la valeur pronostique du %VO<sub>2</sub>. Dans leur étude, un %VO<sub>2</sub> ≤50% était

associée à un sur-risque de mortalité multiplié par quasiment 3. De plus, comme montré sur la Figure 8, chez les patients avec un BNP élevé, le %VO<sub>2</sub> permettait d'améliorer nettement la stratification du risque des patients avec IC systolique : les patients ayant un BNP élevé et un %VO<sub>2</sub> bas ayant un pronostic particulièrement sombre à 5 ans avec un taux de mortalité avoisinant les 70%. En revanche, les patients avec un BNP élevé mais un %VO<sub>2</sub> élevé avaient un pronostic voisin des patients avec un taux de BNP normal.



**Figure 8. Impact du %VO<sub>2</sub> sur le pronostic des patients avec IC systolique. Adapté de de Groot et al.<sup>95</sup>**

En 2013, une équipe italienne, a retrouvé des résultats très concordants.<sup>114</sup> Dans une étude portant sur 2716 patients avec IC systolique, le pic de VO<sub>2</sub> et la pente de VE/VCO<sub>2</sub> étaient tous les deux associés à la mortalité de façon indépendante. Ainsi plus le pic de VO<sub>2</sub> était élevé et meilleur était le pronostic avec un risque relatif de 0,71. Concernant la pente de VE/VCO<sub>2</sub>, le risque relatif était de 1,29 (plus la pente est élevée, moins bon est le pronostic).

Pour rappel, le pic de VO<sub>2</sub> < 10-14 mL/min/Kg est un des critères pour lequel il est actuellement recommandé d'orienter les patients vers l'assistance ou la transplantation cardiaque lorsqu'ils sont éligibles par ailleurs.<sup>1,43</sup>

#### 1.1.4.6.2. *Le test de marche de 6 minutes*

Le test de marche de 6 minutes est un examen très simple à réaliser et qui permet d'évaluer de façon globale les capacités d'un patient à l'effort. Il consiste à mesurer la distance qu'un patient est capable de parcourir pendant un laps de temps de 6 minutes. Bien sûr, ce test peut être altéré pour de très nombreuses raisons et n'apporte pas les éléments très précis de l'épreuve d'effort métabolique. Ainsi, la distance parcourue peut diminuer en raison certes d'une IC mais aussi dans le cadre d'une insuffisance respiratoire, d'une anémie ou de problème mécanique (trouble de l'équilibre, arthrose, ...). Néanmoins, cette distance parcourue pendant 6 minutes, témoin de la tolérance du patient à l'effort a été associée au pronostic des patients avec IC systolique dans de nombreuses études.<sup>153-155</sup>

Pour exemple, Curtis et al.<sup>153</sup> ont montré dans une étude de 541 patients avec IC systolique que la distance de marche parcourue pendant 6 minutes  $\leq 200$  m était associée à un risque de décès multiplié par 1,47 et un risque de décès en lien avec l'IC multiplié par 2,89 après ajustement sur les facteurs confondants. Le taux de mortalité toutes causes était de 43,9% dans le groupe avec une distance parcourue  $\leq 200$  m versus 19,8% dans le groupe avec une distance  $> 400$  m.

#### 1.1.4.7. Les données du cathétérisme cardiaque

##### 1.1.4.7.1. *Débit et index cardiaque*

Il est habituellement préférable d'utiliser l'index cardiaque car ce paramètre correspond au débit cardiaque ajusté sur la surface corporelle du patient. Il est plutôt logique de penser que plus le débit (ou index) cardiaque du patient est bas et moins bon sera son pronostic. Il est actuellement reconnu que la définition d'un index cardiaque anormal est un index  $< 2,5$  L/min/m<sup>2</sup>.

En 2012, Dupont et al.<sup>156</sup> ont analysé rétrospectivement les données du cathétérisme cardiaque droit de 724 patients consécutifs avec IC systolique. Dans cette étude, la baisse de l'index cardiaque avait un impact pronostique indépendant. Le risque relatif de décès et/ou transplantation en urgence était de 0,56 pour chaque augmentation de 1 litre de l'index cardiaque.

##### 1.1.4.7.2. *Hypertension pulmonaire et résistances pulmonaires*

Comme déjà mentionné, l'hypertension pulmonaire peut être évaluée en échographie mais cette évaluation reste souvent imprécise lorsqu'il existe une insuffisance tricuspide

sévère et laminaire et/ou lorsque la pression intra atriale droite est difficile à estimer. Par ailleurs, l'échographie ne permet pas toujours d'avoir accès à la pression pulmonaire moyenne (si absence d'insuffisance pulmonaire enregistrable) qui reste à ce jour la meilleure façon d'évaluer la pression pulmonaire. Enfin, l'échographie ne permet pas d'évaluer l'origine pré ou post capillaire : élément majeur pour la prise en charge des patients avec IC systolique. Pour toutes ces raisons, il est recommandé aujourd'hui d'évaluer la pression pulmonaire, les résistances pulmonaires et la pression capillaire par cathétérisme droit chaque fois qu'une hypertension pulmonaire est suspectée et/ou mesurée en échographie. Le principal problème est que cet examen est invasif et potentiellement source de complications à la différence de l'échographie beaucoup plus facilement réalisable en pratique quotidienne.

Une hypertension pulmonaire est définie par une pression artérielle pulmonaire moyenne  $>25$  mmHg au repos. Lorsque celle-ci s'accompagne d'une pression capillaire  $>15$  mmHg, elle est dite post capillaire et en lien avec l'élévation des pressions de remplissage gauches uniquement. Lorsque celle-ci s'accompagne d'une pression capillaire  $\leq 15$  mmHg, un gradient trans-pulmonaire  $>12-15$  mmHg et/ou de résistances pulmonaires  $>2,5-3$  unités Wood, elle est dite pré capillaire.<sup>157-159</sup> Il existe bien sûr des cas d'hypertension pulmonaire mixte. Cette différenciation est essentielle car le traitement est souvent très différent : augmentation des diurétiques dans le cadre de l'hypertension pulmonaire post capillaire et introduction de traitement spécifique notamment les inhibiteurs de la phosphodiesterase de type 5 en cas d'origine pré capillaire.<sup>157-159</sup> Par ailleurs, la présence d'une hypertension pulmonaire pré capillaire sévère et persistant sous traitement est aujourd'hui une contre-indication à la transplantation cardiaque et reste donc un élément de décision majeur.

Plusieurs études ont montré que la présence d'une hypertension pulmonaire est un facteur pronostique majeur et indépendant dans le cadre de l'IC systolique sévère.<sup>136,138,160-162</sup> Ghio et al.<sup>136</sup> ont rapporté en 2001 dans une population de 377 patients avec IC systolique que la présence d'une hypertension pulmonaire moyenne  $>20$  mmHg était significativement associée au risque de décès avec un risque relatif de 1,1 pour chaque augmentation de 5 mmHg supplémentaire.

#### 1.1.4.8. En résumé

De très nombreux facteurs pronostiques ont été individualisés dans la littérature. Le Tableau 7 reprend la liste des facteurs pronostiques telle quelle est présentée dans les recommandations de l'ESC.<sup>1</sup>

**Tableau 7. Facteurs pronostiques dans l'IC systolique. Adapté de McMurray et al.<sup>1</sup>**

A very large number of variables have been shown to relate to outcome in HF (and new prognostic markers are regularly identified). This table lists some of the more commonly described prognostic variables.
<b>Demographics, history, and physical examination</b> Age, sex, ethnicity, NYHA class, body mass index. Signs of congestion, increased jugular venous pressure, third heart sound, low systolic blood pressure, higher heart rate. Diabetes mellitus, renal dysfunction, depression, COPD. Ischaemic aetiology, history of myocardial infarction.
<b>Routine laboratory tests</b> Serum sodium Liver enzymes, bilirubin Serum creatinine/creatinine clearance/eGFR BUN/urea and markers of tubular injury Serum albumin Uric acid Haemoglobin Red cell distribution width Troponin I/T Urinary albumin creatinine ratio
<b>Neurohormones, cytokines, and related factors<sup>a</sup></b> Plasma renin activity Angiotensin II Aldosterone Catecholamines (Big) endothelin-1 Adrenomedullin Natriuretic peptides <sup>b</sup> Vasopressin/Co-peptin Cytokines sST-2 Galectin-3 Collagen markers
<b>Electrical variables</b> QRS width LV hypertrophy Atrial fibrillation Complex ventricular arrhythmias Heart rate variability
<b>Imaging variables</b> LV internal dimensions and fractional shortening Cardiothoracic ratio on chest X-ray Wall motion index (various <sup>c</sup> ) Ejection fraction Left atrial size Restrictive filling pattern/short deceleration time Right ventricular function (various <sup>c</sup> ) Inflammation (contrast-enhanced CMR), iron content (in thalassaemia: CMR) Amyloidosis (contrast kinetics in CMR) Ischaemia and viability imaging, arrhythmogenic substrates
<b>Exercise test/haemodynamic variables (rest/exercise)</b> VO <sub>2</sub> VE/VCO <sub>2</sub> slope Max/peak (normal >20 mL/kg/min <sup>d</sup> ) 6-min walk distance (normal >600 m <sup>d</sup> ) Cardiac index (normal >2.5 L/min/m <sup>2</sup> ) LV end-diastolic pressure/pulmonary artery wedge pressure (normal <12 mmHg)

Parmi tous ces facteurs pronostiques, peu sont en revanche régulièrement retrouvés et validés en pratique clinique quotidienne. L'évaluation pronostique du patient insuffisant cardiaque fait classiquement appel à plusieurs paramètres parmi lesquels il faut citer l'âge, la classe NYHA, la fonction ventriculaire gauche, la fonction ventriculaire droite, le taux de BNP, la fonction rénale et les paramètres issus de l'épreuve d'effort métabolique (pic de

VO<sub>2</sub>). Récemment, deux méta-analyses ont ainsi montré que seules quelques variables ( $\approx 10$ ) étaient fréquemment retrouvées dans les différents modèles statistiques de la littérature.<sup>53,59</sup>

Afin d'améliorer la stratification du risque des patients avec IC systolique, des scores de risque basés sur une approche multi paramétrique ont été proposés par différents auteurs<sup>54,56,129,130,163</sup> et ont été secondairement validés dans différentes cohortes notamment pour le score « *Heart Failure Survival Score (HFSS)* » et le score « *Seattle Heart Failure Model (SHFM)* ». Ces principaux scores sont détaillés dans le Tableau 8.

Néanmoins, malgré tous ces paramètres et ces scores, il persiste aujourd'hui une importante variabilité dans le pronostic de l'IC avec des patients considérés à faible risque présentant une évolution défavorable, et des patients évalués à haut risque ayant de manière surprenante une survie très prolongée. Enfin, certains paramètres pronostiques puissants, comme ceux de l'épreuve d'effort métabolique par exemple, ne sont pas toujours disponibles en pratique clinique car rarement réalisés au quotidien.

Il existe donc un besoin important de nouveaux indicateurs pronostiques. Idéalement, il devrait s'agir de marqueurs non-invasifs, facilement disponibles, non opérateur-dépendants, et relativement peu coûteux. Les biomarqueurs circulants correspondent à ce « cahier des charges ». A l'heure actuelle, le BNP est le seul biomarqueur circulant et spécifique qui est utilisé en routine dans cette indication.

**Tableau 8. Principaux scores pronostiques utilisés dans l'évaluation du risque des patients avec IC systolique chronique.**

Score	Variables incluses dans le score	Critère d'évaluation	Discrimination (c-index, AUC)
The Seattle Heart Failure Model (SHFM) <sup>130</sup>	Sexe, Age Classe NYHA Natrémie, Uricémie Cholestérolémie Hémoglobine, Lymphocytes Pression artérielle systolique FEVG Etiologie ischémique Statines Allopurinol Dose de diurétiques β-bloquants, IEC Antagonistes du récepteur à l'aldostérone Défibrillateur, resynchronisation cardiaque	Décès et/ou transplantation en urgence	0,69-0,76
The Heart Failure Survival Score (HFSS) <sup>56</sup>	Fréquence cardiaque de repos Pression artérielle moyenne Pic de V <sub>O</sub> <sub>2</sub> FEVG Largeur QRS >120 ms Natrémie Etiologie ischémique	Décès et/ou assistance ou transplantation en urgence	0,76-0,82
The HF-ACTION Predictive Risk Score Model <sup>162</sup>	Sexe Durée de l'épreuve d'effort métabolique Indice de masse corporelle Urémie	Décès toutes causes	0,73
Brophy et al. <sup>129</sup>	Age FEVG Classe NYHA ICT Présence de signes cliniques d'IC Indice de masse corporelle Créatininémie Pression artérielle systolique et diastolique Utilisations de dérivés nitrés Diabète Etiologie ischémique	Décès toutes causes	---
The Heart Failure Risk Scoring System <sup>54</sup>	Age Fréquence respiratoire Pression artérielle systolique Urémie, Natrémie Hémoglobine Antécédent d'accident vasculaire cérébral Démence Broncho-pneumopathie chronique obstructive Cirrhose Cancer	Décès toutes causes	0,77-0,80

## 1.2. PARTIE 2 : La recherche de nouveaux biomarqueurs pronostiques circulants

### 1.2.1. Stratégie de recherche des biomarqueurs

#### 1.2.1.1. Choix de la cible

La recherche de nouveaux biomarqueurs pronostiques peut être réalisée à partir de différents types de marqueurs biologiques parmi lesquels figurent : les *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) à partir de l'acide désoxyribo nucléique (ADN) et du génome – les acides ribonucléiques messagers (ARNm) – les ARN non codants – et les protéines. La complexité biologique de l'organisme humain est représentée sur la Figure 9.<sup>164</sup>

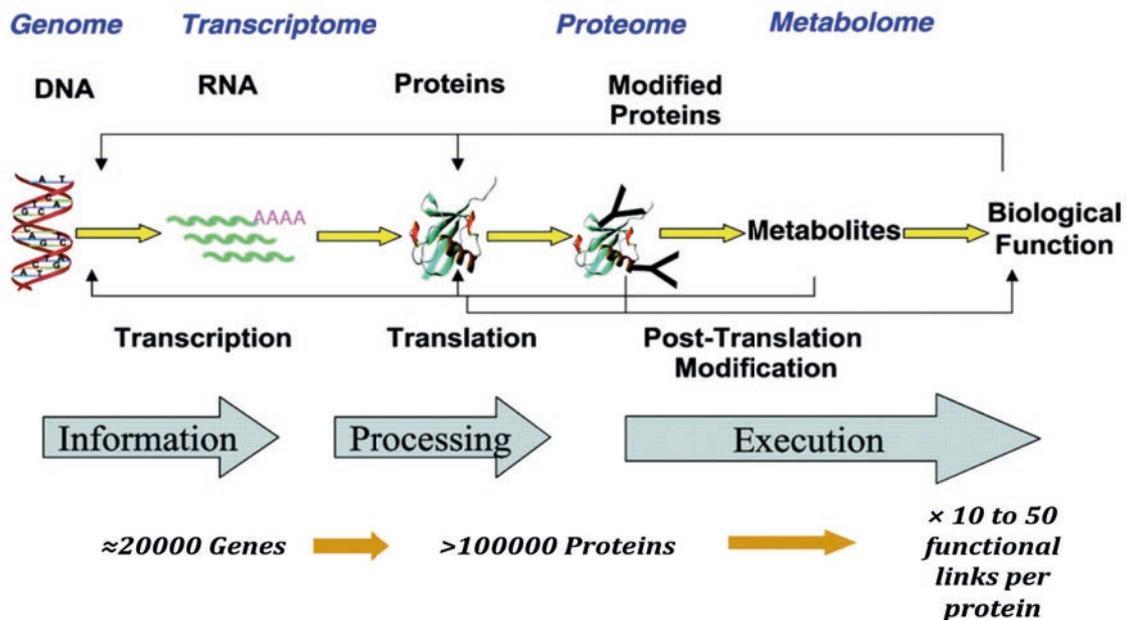


Figure 9. Schéma de la complexité biologique de l'organisme humain. Adapté de Nair et al.<sup>164</sup>

Le séquençage de l'ensemble du génome humain a permis de mettre en évidence environ 20000 gènes codants différents aboutissant chacun à la formation d'un ARNm.<sup>165</sup> Le nombre de gènes codants humains ne dépasse pas celui d'autres espèces animales ou végétales beaucoup moins évoluées, suggérant que les étapes de transcription, traduction, et modifications post-traductionnelles sont importantes pour expliquer la complexité biologique chez l'homme.<sup>166</sup> En revanche, les connaissances actuelles et le site internet UniProtKB (<http://www.uniprot.org>) référencent actuellement 142440 protéines traduites différentes

validées et vérifiées dans l'organisme humain et il est aujourd'hui largement reconnu que les modifications post-traductionnelles pourraient générer plus de 1 million de protéines fonctionnelles différentes. De ce fait, l'étude isolée du génome humain ne reflète pas la complexité de l'organisme humain. Ainsi, un seul gène peut coder pour plusieurs protéines par le biais de modifications post-transcriptionnelles telles que l'épissage alternatif et de modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, la glycosylation ou l'acétylation par exemple.

Par ailleurs, depuis le début des années 2000, des ARNs non codants ont été mis en évidence et semblent jouer un rôle majeur dans la régulation de la synthèse des protéines.<sup>167-</sup>  
<sup>171</sup> Le nombre de ces ARNs non codants humains est largement supérieur à celui des autres espèces moins évoluées et ne fait aujourd'hui qu'augmenter au fil des découvertes des différentes équipes. Seulement 1% du génome humain code pour des protéines fonctionnelles, les 99% restant étant non codants. Il existe aujourd'hui plusieurs grandes catégories d'ARNs non codants notamment les micro-ARNs (miRNAs) et les ARNs longs. L'analyse de ces ARNs non codants rajoute donc un niveau de complexité supplémentaire.

#### 1.2.1.2. Choix de l'échantillon

Plusieurs types d'échantillons sont utilisables en pratique pour rechercher un nouveau biomarqueur pronostique : tissu, sang, urine, selles. Dans notre contexte qui est celui de la recherche de nouveaux biomarqueurs pronostiques de l'IC systolique chez l'homme, la facilité d'accès au sang est un critère de choix majeur dans l'objectif de pouvoir secondairement utiliser le biomarqueur découvert en pratique clinique. Par ailleurs, la *Human Proteome Organization* (HUPO) suggère que le plasma obtenu sur tube EDTA (facilement accessible à partir du sang total) est l'échantillon qui permet d'obtenir le meilleur reflet du protéome circulant d'un patient.<sup>172</sup> Enfin, le plasma obtenu sur tube EDTA est également un échantillon adapté pour détecter les ARNs non codants circulants.

#### 1.2.1.3. Choix de l'approche

La recherche de biomarqueurs pronostiques peut être réalisée selon deux approches : une approche dite « candidate » ou une approche « sans à priori ». Dans le cadre de notre travail, nous avons utilisé les deux approches.

L'approche « candidate » consiste à évaluer la valeur pronostique d'un biomarqueur sélectionné à partir d'une hypothèse physiopathologique préconçue et des données de la

littérature déjà existantes. Cette approche a historiquement été la première et reste aujourd'hui largement utilisée notamment dans le domaine de l'évaluation pronostique de l'IC systolique. Elle a notamment permis de découvrir la valeur pronostique du BNP<sup>95-99</sup> et du NT-proBNP.<sup>101-104</sup>

Toutefois comme déjà mentionné, il existe aujourd'hui un réel besoin d'améliorer la stratification des patients atteints d'une IC systolique et l'approche « sans à priori » trouve ici une place toute particulière. En effet, nous avons maintenant à disposition des techniques de recherche de biomarqueurs dites « sans à priori », notamment les techniques dites de « l'omique ». L'objectif de ces techniques est de caractériser l'ensemble des SNPs, ARNm, ARN non codants ou protéines d'un échantillon donné. Ainsi, ces techniques permettent de comparer les profils de 2 (ou plus) conditions sans hypothèse préalable et donc de découvrir de nouvelles voies physiopathologiques et/ou de nouveaux biomarqueurs en rapport avec ces conditions (dans notre cas précis, patients avec IC systolique de « bon » versus « mauvais » pronostic). Dans ce travail, nous nous focaliserons sur les protéines et les ARNs non codants circulants.

#### 1.2.1.4. Le critère d'évaluation

Dans l'objectif d'améliorer la stratification du pronostic des patients avec IC systolique, le meilleur critère d'évaluation pour tester la valeur d'un biomarqueur semble être celui de la mortalité toutes causes ou de la mortalité cardiovasculaire. Toutefois, comme déjà mentionné, la présence d'un remodelage et d'une dilatation du ventricule gauche ont été identifiées dans plusieurs études comme des facteurs pronostiques importants dans le cadre de l'IC systolique.<sup>87,137,138</sup> Ces critères sont d'ailleurs fréquemment utilisés comme un critère d'évaluation substitutif dans cette pathologie, lorsque l'évaluation des critères cliniques est rendue impossible en raison de la taille insuffisante de l'effectif de certaines études.

#### 1.2.1.5. Synthèse

Dans l'objectif de découvrir de nouveaux biomarqueurs pronostiques dans l'IC systolique, nous avons fait le choix d'utiliser une analyse protéomique « sans à priori » à partir du plasma de patients atteints d'IC systolique. Notre critère d'évaluation est la mortalité cardiovasculaire.

Dans la suite de cette introduction, nous allons revenir sur les données de la littérature concernant les principaux nouveaux biomarqueurs pronostiques circulants identifiés chez

l'homme dans le cadre de l'IC systolique à partir des différentes approches et des différents types de marqueurs biologiques (SNPs, ARNs non codants, protéines). Il faut toutefois noter qu'aucun SNPs n'a actuellement montré de valeur pronostique dans l'IC systolique et ce type de marqueur biologique ne sera donc pas abordé ici.

## **1.2.2. Approche « candidate »**

### 1.2.2.1. Généralités

Dans le domaine de l'évaluation pronostique de l'IC systolique, cette approche a, à ce jour, uniquement été utilisée pour des protéines. En effet, aucun SNP, miRNA ou ARN long non codant n'a été documenté en utilisant cette approche dans ce contexte précis. De nombreuses protéines circulantes impliquées dans différents mécanismes physiopathologiques ont ainsi montré des résultats prometteurs chez l'homme.

### 1.2.2.2. Les données de la littérature

#### *1.2.2.2.1. Activation neurohormonale*

Au delà du BNP et du NT-proBNP, de nombreux marqueurs de l'activation neurohormonale ont été étudiés dans la littérature parmi lesquels figurent la norépinephrine,<sup>173</sup> la rénine, l'angiotensine II, l'aldostérone,<sup>174</sup> le peptide natriurétique atrial (ANP),<sup>175</sup> l'endothéline 1 et la copeptine (reflet de la sécrétion d'arginine vasopressine).

Depuis de nombreuses années, il a été démontré, chez le patient porteur d'une IC systolique, qu'il existe une activation neurohormonale qui permet au début de la maladie de compenser la dysfonction ventriculaire gauche. Cependant, cette activation neurohormonale devient rapidement délétère et est à l'origine d'un cercle vicieux. En effet, la plupart de ces neurohormones sont des vasoconstricteurs puissants et entraînent donc une augmentation de la post-charge du ventricule gauche et une aggravation de l'IC. La place majeure qu'occupent aujourd'hui les traitements inhibiteurs du système rénine – angiotensine – aldostérone ne fait que confirmer l'aspect néfaste de cette activation neurohormonale au long cours. Actuellement, en raison de leur instabilité dans le plasma et de leur demi-vie courte,<sup>176,177</sup> bon nombre de ces marqueurs restent en revanche difficile à utiliser en pratique quotidienne.

L'endothéline 1 est un agent vasoconstricteur et promoteur de la fibrose ventriculaire et vasculaire. Elle est essentiellement sécrétée par les cellules endothéliales mais aussi par les myocytes, les cellules musculaires lisses et les macrophages. Les taux d'endothéline 1 ont été

associés au pronostic des patients avec IC dans plusieurs études.<sup>178-181</sup> Surtout la big endothéline 1 ou *C-terminal pro-endothelin-1* (CT-proET-1),<sup>149,182-185</sup> précurseur de l'endothéline 1 inactif et plus stable dans la circulation, a montré qu'elle pouvait apporter une valeur pronostique additionnelle par rapport au BNP dans une sous étude de 1237 patients issus de l'étude GISSI-HF.<sup>185</sup> Dans cette étude, les patients du tertile le plus élevé de CT-proET-1 avaient un risque de décès multiplié par 1,89 par rapport au tertile le plus faible en analyse multivariée. Ces résultats ont par la suite été confirmés par les travaux de Jankowska et al. dans une population de 491 patients.<sup>186</sup>

L'arginine vasopressine ou hormone antidiurétique est sécrétée par l'hypothalamus en réponse aux modifications de l'osmolarité plasmatique et/ou à la diminution du débit cardiaque. Elle est ensuite transportée vers la neurohypophyse où elle est relarguée dans la circulation sanguine. Le niveau d'arginine vasopressine augmente très facilement en réponse au stress physique et à de nombreuses pathologies aiguës. Dans l'IC systolique chronique, sa sécrétion est stimulée de façon quasiment permanente. Ses actions sur la réabsorption d'eau libre, la contractilité cardiaque et le tonus vasculaire ont été évoqués comme des mécanismes causaux dans la progression de l'IC systolique.<sup>187,188</sup> Néanmoins, l'arginine vasopressine est très instable dans le plasma, la rendant difficile à utiliser en pratique. En revanche, la copeptine, peptide sécrété à dose équimolaire à partir d'un précurseur commun, est beaucoup plus stable et a montré son intérêt dans l'évaluation pronostique du patient avec IC systolique dans plusieurs études.<sup>111,189,190</sup> Le rôle exact de la copeptine est aujourd'hui inconnu. Dans une étude de 786 patients, la copeptine a ainsi été identifiée comme le facteur prédictif de mortalité toutes causes le plus puissant et était même supérieur au BNP.<sup>189</sup> Ces résultats ont été confirmés dans une autre étude de 172 patients publiée en 2011.<sup>111</sup>

J'ai dirigé au cours de ma thèse la rédaction d'une revue de la littérature sur la place de la copeptine dans le domaine cardiovasculaire, notamment dans le contexte de l'évaluation pronostique du patient avec IC (ANNEXE 1). Les principales données concernant la valeur pronostique de la copeptine dans l'IC systolique sont reprises dans le Tableau 9.

**Tableau 9. Principales études ayant rapporté la valeur pronostique de la copeptine dans la littérature.**

Etudes	Date de publication	Nombre de patients	Résultats
Stoiser <i>et al.</i> <sup>189</sup>	2006	268 patients avec IC décompensée (NYHA III or IV)	Suivi 15.8 +/- 6.6 mois Copeptine prédicteur indépendant de mortalité (p<0.0001), ré-hospitalisations pour IC (p=0.05) et le critère composite (p<0.0001).  Copeptine supérieure au BNP pour prédire la mortalité et le critère composite
Neuhold <i>et al.</i> <sup>188</sup>	2008	786 patients avec IC systolique chronique stable (FEVG moyenne 25%)	Suivi 24 mois Copeptine prédicteur de mortalité toutes causes chez les patients avec NYHA II (HR=1,014 par pmol/L supplémentaire ; p=0.0001) et NYHA III (HR=1,009 par pmol/L supplémentaire ; p=0.0039)  Copeptine supérieure au BNP dans ces sous groupes
Tentzeris <i>et al.</i> <sup>111</sup>	2011	172 patients avec IC systolique chronique stable	Suivi 42.5 mois Niveau élevé de copeptine (>16,4 pmol/L) prédicteur indépendant de mauvais pronostic : mortalité toutes causes et hospitalisations pour IC (HR=2,51 ; 95% CI=1,66-3,79 ; p<0,0001).  Encore plus discriminant en association les troponines et le NT-proBNP. Taux du critère combiné de 5,3% si aucun paramètre élevé, 34,1% si 1 paramètre élevé, 62,2% si 2 paramètres élevés et 66% si 3 paramètres élevés (p<0,001)

#### 1.2.2.2.2. Marqueurs d'apoptose et/ou nécrose myocytaire

Les principaux marqueurs de nécrose myocytaire sont les troponines T ou I et leur impact dans l'évaluation pronostique des patients avec IC systolique est devenu encore plus important depuis l'apparition des dosages hyper sensibles.

La H-FABP est une protéine cytoplasmique qui transporte les acides gras à longues chaînes dans le myocyte et qui est relarguée extrêmement rapidement en cas de nécrose cellulaire.<sup>191</sup> Cette protéine est donc logiquement augmentée très tôt dans la circulation

sanguine après un IDM. Par ailleurs, il a été démontré que les taux de H-FABP étaient également augmentés dans le cadre de l'IC systolique chronique, et étaient associés au pronostic des patients dans ce contexte.<sup>192</sup> Niizeki et al.<sup>193</sup> ont retrouvé dans une étude de 126 patients consécutifs avec IC systolique que la H-FABP était plus souvent augmentée au dessus de sa valeur normale (4,3 ng/mL) que la troponine T standard (non hyper sensible, 0,01 ng/mL) témoignant de son caractère sensible. Sa capacité de prédiction du risque de décès était supérieure à la troponine T standard avec une aire sous la courbe *Receiver Operating Characteristic* (ROC) de 0,78 versus 0,58. Toutefois, la valeur additionnelle de cette protéine n'a pas encore montré sa supériorité par rapport à un dosage hyper sensible de la troponine T ou I. De plus, dans une étude portant sur 2099 volontaires sains, il a été retrouvé que les taux de la H-FABP étaient influencés par l'âge, le sexe, la fonction rénale, et le poids des patients.<sup>194</sup> Le véritable seuil à utiliser dans ces sous groupes de patients est aujourd'hui non connu.

#### 1.2.2.2.3. *Insuffisance rénale*

En dehors de la créatinine et de l'urée, la cystatine C, protéine produite de manière constante et stable par toutes les cellules nucléées de l'organisme et filtrée librement par le glomérule sans sécrétion ni réabsorption, a montré être un excellent reflet de la fonction rénale.<sup>98,195,196</sup> Sa valeur pronostique dans l'IC systolique a également été largement démontrée et semble même supérieure à celle de la créatinine notamment chez les patients âgés.<sup>195,197</sup> Arimoto et al.<sup>198</sup> ont ainsi pu montrer dans une étude de 140 patients avec IC systolique que le niveau de cystatine C était très fortement associé au risque de décès ; et ce, de manière indépendante après ajustement. Dans cette étude, le taux de mortalité cardiovasculaire était de 17,7% chez les patients avec une cystatine C élevée (>0,01 ng/mL) versus 1,2% chez ceux avec une cystatine C normale.

Enfin, la NGAL a été identifiée comme un marqueur potentiel de la dysfonction rénale, car filtrée librement par les glomérules et normalement complètement réabsorbée au niveau tubulaire.<sup>176,199</sup> Le rôle de cette protéine n'est pas clairement élucidé. Son expression est augmentée en cas de lésions rénales tubulaires mêmes modérées.<sup>116</sup> De manière très intéressante, ce marqueur ne semble pas être influencé par la dose des traitements diurétiques ce qui en fait donc un marqueur de choix dans l'IC systolique.<sup>200</sup> Dans une analyse des 2130 patients inclus dans l'étude GISSI-HF, des taux urinaires élevés de cette protéine étaient indépendamment associés à un sur-risque de décès et/ou hospitalisations pour IC, y compris dans la population de patients avec une clairance de la créatinine normale.<sup>201</sup> Plus récemment,

Van Deursen et al.<sup>202</sup> ont montré dans une étude de 562 patients avec IC que les taux plasmatiques de NGAL étaient également associés au pronostic des patients et à la mortalité toutes causes que ce soit chez les patients avec ou sans dysfonction rénale documentée. Surtout, de manière très intéressante, lorsque NGAL était inclus dans le modèle de prédiction du risque de décès dans cette étude, la clairance de la créatinine et la cystatine C n'étaient plus associées au risque de décès. La valeur médiane de NGAL plasmatique était de 85 ng/mL dans cette étude, 65 chez les patients sans insuffisance rénale et 104 chez les patients avec insuffisance rénale. D'autres études ont montré des résultats concordants.<sup>203</sup>

#### 1.2.2.2.4. *Stress myocytaire*

Au sein de cette catégorie de biomarqueurs, plusieurs ont montré leur valeur dans l'évaluation pronostique des patients avec IC systolique parmi lesquels figurent l'adrénomédulline, la neuréguline 1 et le facteur ST2.

L'adrénomédulline est un peptide de 52 acides aminés, puissant vasodilatateur découvert en 1993 par Kitamura.<sup>204</sup> Cette protéine possède également des propriétés inotropiques et natriurétiques et est sécrétée sous l'effet de l'augmentation des pressions intra-cavitaires et de la surcharge volumétrique du ventricule gauche essentiellement. Il s'agit donc globalement d'un agent cardioprotecteur. Les taux plasmatiques d'adrénomédulline sont élevés en cas d'IC systolique. Il a été démontré que ces taux étaient corrélés à la classe NYHA et aux pressions de remplissage du ventricule gauche.<sup>205-207</sup> Initialement, des travaux avaient retrouvé une association entre le risque de décès et les taux d'adrénomédulline.<sup>103,207</sup> Néanmoins, du fait de la demi-vie plasmatique très courte de cette protéine et de son instabilité, aucun dosage fiable n'a pu être développé.<sup>208</sup> Depuis, un dosage de la pro-hormone (fragment mid-régional 45-92 de la pro-adrénomédulline ou *mid-regional pro-adrenomedullin* (MR-proADM)), beaucoup plus stable, a été développé.<sup>209</sup> Les taux de MR-proADM ont été associés au pronostic des patients avec IC systolique en analyse multivariée et après ajustement sur le BNP, la créatinine, la FEVG et la classe NYHA dans plusieurs études.<sup>210,211</sup> Les taux moyens de MR-pro-ADM dans ces études oscillaient entre 0,64 et 0,88 nmol/L. Dans l'étude d'Adlbrecht et al. ayant inclus 786 patients avec IC,<sup>210</sup> la MR-proADM était associée à la mortalité toutes causes de manière indépendante avec un HR de 1,77.

La neuréguline 1 appartient à la famille des facteurs de croissance et agit via un récepteur tyrosine kinase faisant partie de la famille des récepteurs aux facteurs de croissance épidermique (EGFR/ErbB). Elle est impliquée, en outre, dans le développement et la fonction cardiaque comme l'attestent certains modèles de souris déficientes pour la cascade de

signalisation de cette protéine.<sup>212</sup> Toutefois, le véritable mécanisme expliquant le lien entre la cascade de neuréguline 1 et la survenue d'une IC systolique n'est pas clairement identifié. Certains suggèrent que la neuréguline 1 est impliquée dans la croissance et la survie des myocytes et qu'elle serait donc une cible intéressante dans le traitement de l'IC systolique.<sup>213,214</sup> Dans une étude de 899 patients ambulatoires avec IC systolique, les taux de neuréguline 1 ont été associés de manière indépendante au risque de décès et/ou transplantation cardiaque en urgence.<sup>215</sup> Ainsi, le taux de neuréguline 1 était de 6,2 ng/mL chez les patients décédés versus 4,4 ng/mL chez les survivants (HR=1,58 en comparant le 4<sup>ème</sup> quartile au 1<sup>er</sup> quartile).

Le facteur ST2 est un membre de la famille des récepteurs à l'interleukine 1. Le facteur ST2 existe sous une forme transmembranaire au niveau des cardiomyocytes, des fibroblastes et des cellules endothéliales vasculaires et sous une forme soluble circulante. Le ligand naturel du facteur ST2 est l'interleukine 33. Il est actuellement suggéré que cette cascade aurait un effet protecteur paracrine au niveau du myocarde contre les effets de la surcharge. Ainsi, le facteur ST2 soluble aurait un effet délétère en séquestrant l'interleukine 33, empêchant la cascade de signalisation cellulaire et entraînant ainsi un remodelage du ventricule gauche.<sup>216,217</sup> Les taux de facteur ST2 soluble ont été associés au pronostic des patients avec IC systolique dans plusieurs études.<sup>218-221</sup> A titre d'exemple, le facteur ST2 soluble s'est montré équivalent au NT-proBNP dans une étude de 1141 patients ambulatoires avec IC systolique et l'adjonction de ce marqueur au modèle statistique de prédiction du risque permettait d'améliorer la stratification des patients.<sup>219</sup> Dans cette étude, les patients se trouvant dans le groupe du tertile le plus élevé du facteur ST2 (>36,3 ng/mL) avaient un risque de décès multiplié par 3,2 par rapport aux patients se trouvant dans le groupe du tertile le plus bas ( $\leq$ 22,3 ng/mL). L'addition du ST2 et du NT-proBNP au score SHFM permettait de reclasser près de 15% des patients dans leur catégorie de risque appropriée.

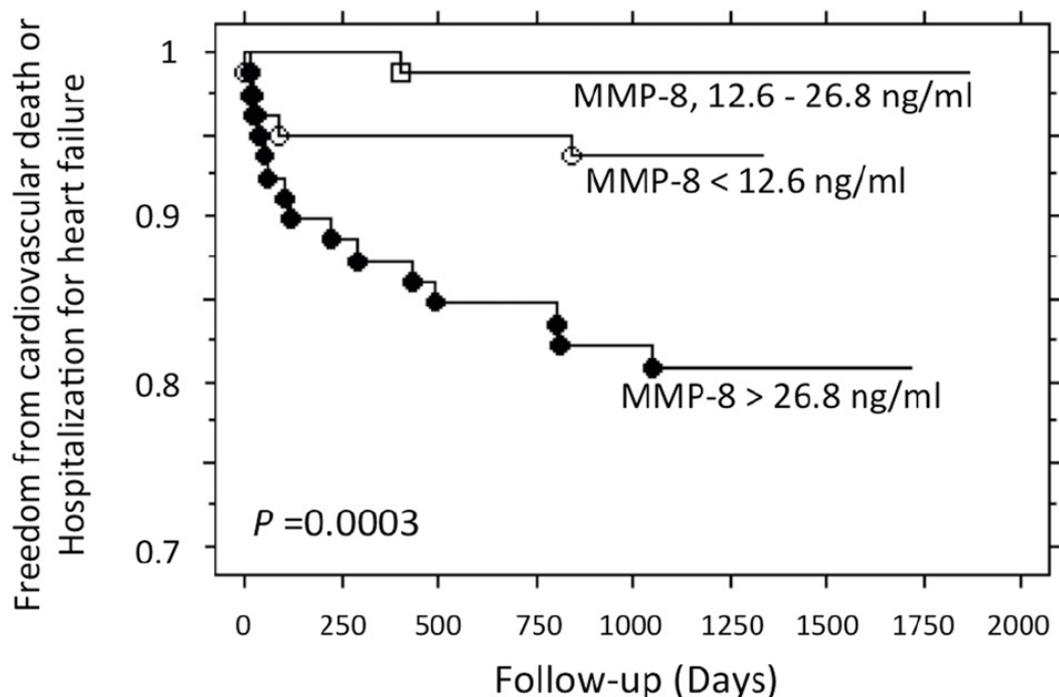
#### 1.2.2.2.5. *Matrice extracellulaire*

La place de la fibrose et de la matrice extracellulaire dans l'évolution de l'IC systolique est aujourd'hui clairement démontrée.

Ainsi, plusieurs protéines ayant un rôle dans l'homéostasie de la matrice extracellulaire (formation versus dégradation) ont été associées au pronostic des patients avec IC systolique parmi lesquelles figurent les métalloprotéases (MMPs)<sup>222-224</sup> et les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMPs).<sup>225</sup> Sur le plan physiopathologique, il semble que plus la dégradation de la matrice est importante et plus le remodelage et/ou la dilation des

cavités cardiaques seront importants, moins bon sera le pronostic. D'un autre côté, les patients ayant des plages de fibrose myocardique et une synthèse excessive de collagène ont également montré une évolution plus défavorable. Certaines protéines ayant un rôle dans la synthèse du collagène ont ainsi montré une valeur pronostique parmi lesquelles figurent la galectine 3,<sup>223,226-233</sup> le *growth-differentiation factor 15* (GDF-15),<sup>234,235</sup> le pro-peptide N-terminal du pro-collagène de type I (PINP), le télo-peptide du collagène de type I (ICTP) et le pro-peptide N-terminal pro-collagène de type III (PIIINP).<sup>223,236-238</sup>

Concernant les MMPs, les taux de MMP-9 ont été associés au diamètre télé-diastolique ventriculaire gauche et à l'épaisseur pariétale du ventricule gauche,<sup>224</sup> témoignant ainsi de son impact sur la dégradation de la matrice extracellulaire et sur le remodelage ventriculaire gauche. Dans une étude réalisée à partir de la population de l'étude REVE2 (246 patients en post-IDM antérieur), nous avons pu confirmer la place majeure des MMPs (ANNEXE 2).<sup>222</sup> Dans cette étude, nous avons retrouvé que les taux sériques de MMP-8 permettaient de prédire de façon indépendante la survenue du remodelage ventriculaire gauche et surtout le pronostic des patients (évalué par le critère composite décès toutes causes et ré-hospitalisations pour IC). A titre d'illustration, le pronostic des patients en fonction du taux de MMP-8 circulante (tertiles) est montré sur la Figure 10.



**Figure 10. Valeur pronostique de la MMP-8 dans le remodelage post-IDM. Adapté de Fertin et al.<sup>222</sup>**

A noter que dans cette étude la MMP-9 permettait également de prédire ces 2 critères en analyse univariée mais perdait sa puissance après ajustement.

Par ailleurs, plusieurs protéines impliquées dans la genèse de la fibrose myocardique et vasculaire ont montré avoir une valeur pronostique intéressante.

En effet, les taux de plusieurs types de pro-collagène (notamment le PINP et le PIIINP) qui sont des marqueurs circulants de la biosynthèse du collagène ont été associés à la survenue d'évènements cardiovasculaires graves dans l'IC.<sup>223,236-238</sup> Ces marqueurs ont également été associés à un effet délétère sur le remodelage ventriculaire gauche.<sup>236</sup> Ainsi, Eschalier et al. ont rapporté que le rapport entre PIIINP et ICTP (témoin du turnover de la matrice extracellulaire) était très fortement associé au remodelage ventriculaire gauche d'une part et au pronostic des patients de l'étude REVE2 (post-IDM antérieur) en analyse multivariée.<sup>236</sup> Dans cette étude, un ratio  $\leq 1$  était associé de manière indépendante au risque de décès et/ou hospitalisations pour IC. En 2009, des travaux antérieurs avaient montré que les taux circulants de PINP et de PIIINP étaient moins élevés dans le groupe de patients traités par eplerenone que dans le groupe placebo dans une étude ancillaire d'EPHESUS (n=476 patients) : 35,5 versus 44 et 3,7 versus 4,3 ng/mL, respectivement.<sup>237</sup> Dans ce précédent travail, l'ICTP était associé au pronostic des patients : un patient avec un ICTP et un BNP au dessus de la médiane avait ainsi un risque de décès multiplié par environ 2,5.

La Galectine 3 interagit, elle, avec différentes protéines au niveau de la matrice extracellulaire notamment la lamine, les intégrines et surtout le collagène. Elle a montré avoir un rôle de lien entre l'inflammation et la fibrose et a été impliquée dans la physiopathologie de plusieurs pathologies fibrotiques comme la cirrhose hépatique ou la fibrose pulmonaire idiopathique.<sup>176,226</sup> Dans l'IC systolique, la galectine 3 a également montré son implication dans l'aggravation de la fibrose myocardique.<sup>239,240</sup> La conséquence en est un remodelage délétère du ventricule gauche.<sup>239,240</sup> La galectine 3 a montré sa valeur pronostique dans plusieurs études.<sup>223,226-233</sup> Dans une étude ancillaire de CARE-HF (n=260 patients), un taux de galectine 3 >30 ng/mL était associé à un risque plus élevé de décès et/ou hospitalisations pour IC de manière indépendante.<sup>223</sup> La plus large étude ayant suggéré la valeur pronostique potentielle de ce biomarqueur a été réalisée à partir de 895 patients inclus dans l'étude ACTION-HF.<sup>227</sup> Toutefois, si la galectine 3 était significativement associée au risque de décès et/ou hospitalisations pour IC en analyse univariée dans cette étude (HR=1,14 pour chaque augmentation de 3 ng/mL), sa valeur pronostique était franchement diminuée en analyse multivariée et disparaissait même après inclusion du NT-proBNP dans le modèle statistique.

Enfin, le GDF-15, membre de la super-famille du *transforming growth factor-β*, est exprimé dans de nombreux tissus notamment dans les myocytes. Il semblerait que cette protéine ait un rôle dans le remodelage ventriculaire gauche via un effet sur l'apoptose et l'hypertrophie.<sup>241</sup> Plusieurs études ont associé les taux de GDF-15 avec le pronostic des patients atteints d'une IC systolique.<sup>234,235</sup> Initialement, sa valeur pronostique a été démontrée dans une étude de 455 patients.<sup>235</sup> Dans cette étude, cette protéine permettait de prédire le risque de décès de manière indépendante notamment après ajustement sur la classe NYHA, la FEVG et le NT-proBNP. Le taux médian de GDF-15 dans cette étude était de 1,95 ng/L. Ces résultats ont par la suite été confirmés par plusieurs travaux, notamment une analyse des patients inclus dans l'étude Val-HeFT.<sup>234</sup> Dans cette étude, le GDF-15 était associé à une augmentation de l'activation neurohormonale, à des paramètres échographiques d'IC sévère, et surtout au pronostic des patients de manière indépendante des autres marqueurs de risque notamment du NT-proBNP.

Ainsi, plusieurs MMPs, plusieurs types de pro-collagène et d'autres marqueurs de la fibrose ont été identifiés. Des études complémentaires vont être nécessaires pour savoir lequel de ces biomarqueurs liés à la matrice extracellulaire et à la fibrose myocardique aura la meilleure capacité à prédire le pronostic des patients.

#### 1.2.2.2.6. *Stress Oxydatif*

L'augmentation du stress oxydatif peut être à l'origine d'effets délétères cellulaires majeurs. Le stress oxydatif peut en effet provoquer de profonds dommages sur les protéines intracellulaires et donc l'apoptose ou la nécrose cellulaire, notamment au niveau des myocytes dans le cadre de l'IC systolique.<sup>177</sup> En pratique, la mesure directe des espèces réactives oxygénées (ROS) chez l'homme est complexe et l'évaluation du niveau de stress oxydatif se fait via l'analyse de marqueurs indirects.<sup>177</sup>

Il faut néanmoins noter que certains de ces marqueurs indirects sont mesurés dans les urines et non dans le plasma : les biopyrrines urinaires (métabolites oxydés de la bilirubine)<sup>242</sup> et le 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine urinaire.<sup>243</sup> Ces marqueurs ne seront donc pas détaillés ici. Il est également possible d'analyser l'activité de certaines enzymes à l'origine des ROS telles que la *superoxide dismutase* (SOD) ou la *nitric oxide synthase* (NOS). Toutefois, il n'existe à ce jour aucune donnée dans la littérature associant les taux de ces enzymes au pronostic des patients atteints d'une IC systolique.

D'autres marqueurs, cette fois plasmatiques, du stress oxydatif se sont montrés prometteurs. La néoptérine est produite par les monocytes et les macrophages activés sous

l'effet de l'interféron  $\gamma$  et la quantité de néoptérine produite est corrélée à la capacité de relargage de ROS par ces derniers.<sup>244</sup> Sasaki et al.<sup>245</sup> ont montré que les concentrations circulantes de néoptérine étaient corrélées avec la classe NYHA des patients avec IC systolique. Dans cette étude, la néoptérine permettait également de prédire le pronostic des patients. Il était noté un risque de décès et/ou hospitalisations pour IC multiplié par 11,1 pour les patients du groupe correspondant au 4<sup>ème</sup> quartile de néoptérine (>12,8 nmol/L) par rapport aux patients du 1<sup>er</sup> quartile (<5,5 nmol/L).

Les résultats concernant l'isoprostane plasmatique et la myelopéroxydase (MPO) plasmatique sont également intéressants. En effet, les taux de ces deux marqueurs étaient corrélés à la sévérité de l'IC dans plusieurs études.<sup>246,247</sup> Toutefois, aucune étude n'a, à ce jour, montré une association entre les taux plasmatiques de ces deux marqueurs et le pronostic des patients avec IC systolique.

Les résultats concernant l'acide urique (reflet de l'activité de la xanthine oxydase) sont plus convaincants. Plusieurs études ont en effet montré l'association entre ce biomarqueur et les paramètres hémodynamiques de patients avec IC systolique d'une part<sup>248</sup> et le pronostic de ces patients d'autre part.<sup>249</sup> Dans une étude publiée en 2003, Anker et al.<sup>249</sup> ont rapporté que les taux d'acide urique avaient une valeur pronostique majeure à partir d'une population test de 112 patients et d'une autre population de validation de 182 patients. Ainsi, le meilleur seuil pour prédire la mortalité dans la population test était de 565  $\mu\text{mol/L}$ . L'utilisation de ce même seuil dans la population de validation permettait d'améliorer de façon très significative la stratification des patients. Les patients avec un taux au dessus du seuil avaient un sur-risque de décès multiplié par 7,14 après ajustement.

#### 1.2.2.2.7. *Inflammation*

Le rôle délétère de l'inflammation a été identifié dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires notamment l'IC systolique. Dans l'IC, cet effet délétère est multifactoriel et implique de nombreux mécanismes : une dysfonction endothéliale, une apoptose des myocytes, une dénutrition générale (cachexie, anorexie) et une aggravation de la dysfonction ventriculaire gauche notamment.

La protéine C-reactive (CRP) est probablement le marqueur de l'inflammation le plus diffusé et le plus utilisé actuellement dans le monde et la disponibilité d'une technique de dosage hyper-sensible (hsCRP) en fait une cible privilégiée. La CRP est produite au niveau hépatique en particulier sous l'effet de cytokines pro inflammatoires et principalement l'interleukine 6.<sup>177</sup> De nombreuses études ont montré la valeur de la CRP dans l'évaluation

pronostique des patients avec IC systolique.<sup>250-252</sup> Dans une étude de 108 patients (FEVG <50%), Yin et al.<sup>252</sup> ont rapporté un HR ajusté de 3,05 pour une hsCRP >2,97 mg/L avec un critère d'évaluation composite de décès, transplantation en urgence et hospitalisations pour IC. Kamioka et al.<sup>250</sup> ont montré que la hsCRP permettait non seulement de prédire le risque de décès de manière indépendante mais aussi l'absence de réponse à la resynchronisation chez les patients avec IC sévère. Lamblin et al.<sup>251</sup> ont également montré qu'une hsCRP au dessus de la normale (>3 mg/L) était associée de manière indépendante au risque de décès cardiovasculaire avec un HR de 1,55 dans une étude de 546 patients avec IC systolique chronique.

Le *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), cytokine pro inflammatoire, a également été associé au pronostic des patients avec IC systolique dans les travaux de Yin et al.<sup>252</sup> Dans cette étude, un TNF- $\alpha$  >19,66 pg/mL était associé à un sur-risque d'évènements multiplié par 2,97 après ajustement sur les facteurs confondants. Le TNF- $\alpha$  semble jouer un rôle dans le remodelage ventriculaire gauche via une activation des MMPs.

La protéine Fas (membre de la famille des récepteurs au TNF- $\alpha$ ) est exprimée sur de nombreuses cellules dont les myocytes. Lorsqu'elle est liée à son ligand, elle génère un signal pro apoptotique et pourrait donc jouer un rôle important dans la progression de l'IC. Une élévation des taux circulants de Fas ont été associés à la gravité de l'IC.<sup>253</sup> Dans cette étude les patients avec IC congestive en classe NYHA III et IV avaient des taux de Fas soluble augmentés de 41% et 97% respectivement. Toutefois, Fertin et al.<sup>254</sup> ont retrouvé des résultats discordants dans un travail réalisé à partir des patients de l'étude REVE2 (post-IDM antérieur). Dans leur étude, les taux de Fas soluble n'étaient pas associés au remodelage ventriculaire gauche.

La pentraxine 3 est sécrétée sous l'effet des cytokines pro inflammatoires, notamment l'interleukine 1 et le TNF- $\alpha$ , par de nombreuses cellules. Suzuki et al.<sup>255</sup> ont montré dans une étude de 196 patients avec IC systolique que la pentraxine 3 permettait de prédire le pronostic des patients de manière indépendante en analyse multivariée avec un HR de 1,20 pour chaque augmentation de 6,22 ng/mL (critère d'évaluation : décès cardiovasculaire et/ou hospitalisation). Le taux d'évènements était de 10,8% chez les patients avec pentraxine 3 normal (<4 ng/mL) versus 55,3% chez ceux avec un dosage élevé. Ishino et al.<sup>256</sup> ont montré des résultats concordants dans une étude de 164 patients.

### 1.2.2.3. Synthèse

En conclusion, l'approche « candidate » a déjà permis d'identifier de nombreux biomarqueurs pronostiques dans l'IC systolique en rapport avec différents mécanismes physiopathologiques. Le Tableau 10 reprend la liste de ces biomarqueurs.

**Tableau 10. Biomarqueurs pronostiques circulants identifiés par approche « candidate » dans l'IC systolique chez l'homme.**

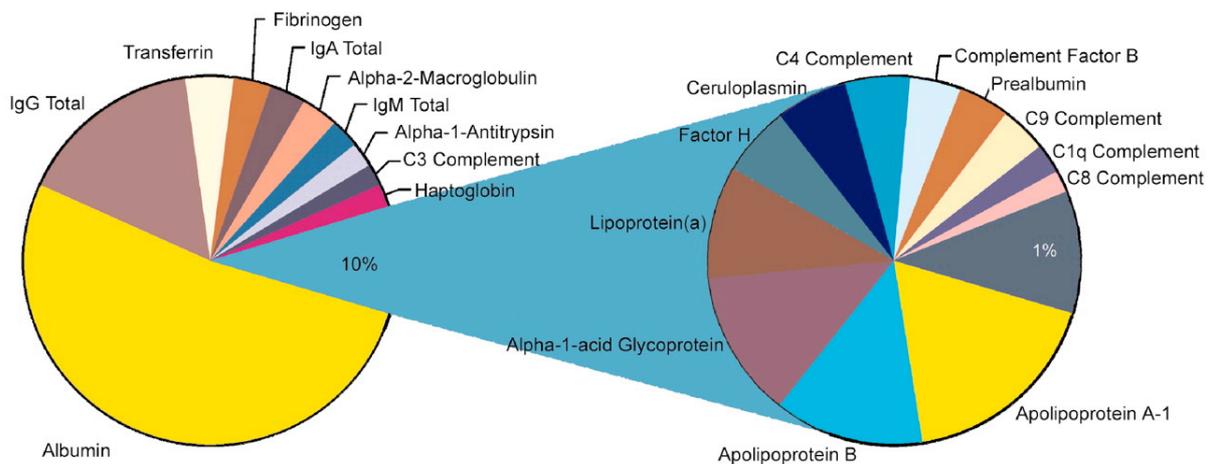
Mécanisme physiopathologique	Biomarqueurs
Activation neurohormonale	BNP et NT-proBNP ANP Copeptine Rénine, angiotensine II, aldostérone Norépinephrine Endothéline 1
Fonction rénale	Créatinine et clairance de la créatinine Urée Cystatine C NGAL
Apoptose et/ou nécrose myocytaire	Troponines Creatine phospo-kinase (CPK) et CPK-MB Myoglobine Myosin light chain 1 H-FABP
Stress myocytaire	MR-proADM Neuréguline 1 ST2 soluble
Matrice extracellulaire	MMPs 8 et 9 TIMPs GDF-15 Galectine 3 PINP et PIIINP ICTP
Stress oxydatif	Isoprostane Acide urique MPO Néoptérine
Inflammation	hsCRP TNF- $\alpha$ Interleukine 6 Fas Pentraxine 3
Divers	Natrémie Hémoglobine

### 1.2.3. Approche de protéomique différentielle

#### 1.2.3.1. Complexité du protéome plasmatique, accès au « *deep proteome* »

L'analyse protéomique se définit donc par l'analyse qualitative et/ou quantitative de l'ensemble des protéines présentes dans un échantillon donné, lui-même obtenu dans des conditions bien particulières et prédéfinies, appelé le protéome.

L'analyse du protéome plasmatique ou sérique est toujours un challenge. Le plasma et le sérum constituent certes des échantillons facilement accessibles et sont, de ce fait, particulièrement adaptés à la recherche de nouveaux biomarqueurs. En revanche, ils représentent un mélange protéique extrêmement complexe de plusieurs centaines de milliers de protéines dont la gamme de concentration est extrêmement large s'échelonnant sur plus d'une dizaine de degrés d'amplitude (de  $<10^{-9}$  g/L à  $>10$ g/L).<sup>257,258</sup> Ainsi une vingtaine de protéines représentent la quasi totalité du protéome en termes de concentration ( $>99\%$ ) et une seule protéine, l'albumine, représente quasiment 50% du protéome (Figure 11).<sup>259</sup> De plus, il existe de très nombreuses interactions protéiques au sein du plasma et du sérum.<sup>260</sup>



**Figure 11. Schéma de la complexité du protéome et de la gamme de concentration des protéines plasmatiques chez l'homme. Adapté de Tirumalai et al.<sup>259</sup>**

L'enjeu est donc de pouvoir analyser ce qui est appelé le « *deep proteome* », correspondant au 1% restant, dans l'objectif de découvrir de nouveaux biomarqueurs de l'IC systolique. En effet, les protéines majoritaires, déjà connues et largement documentées, ont déjà toutes fait l'objet de travaux dans le cadre d'une approche « candidate ».

En pratique, la présence des protéines majoritaires constitue une limite importante à la détection et/ou la mesure fiable des protéines minoritaires. Afin de faciliter l'analyse des

protéines minoritaires, plusieurs techniques permettant de retirer tout ou partie des protéines majoritaires ont été développées notamment des techniques de déplétion et des techniques de dilution/compression.

#### 1.2.3.1.1. *Technique d'immunodéplétion*

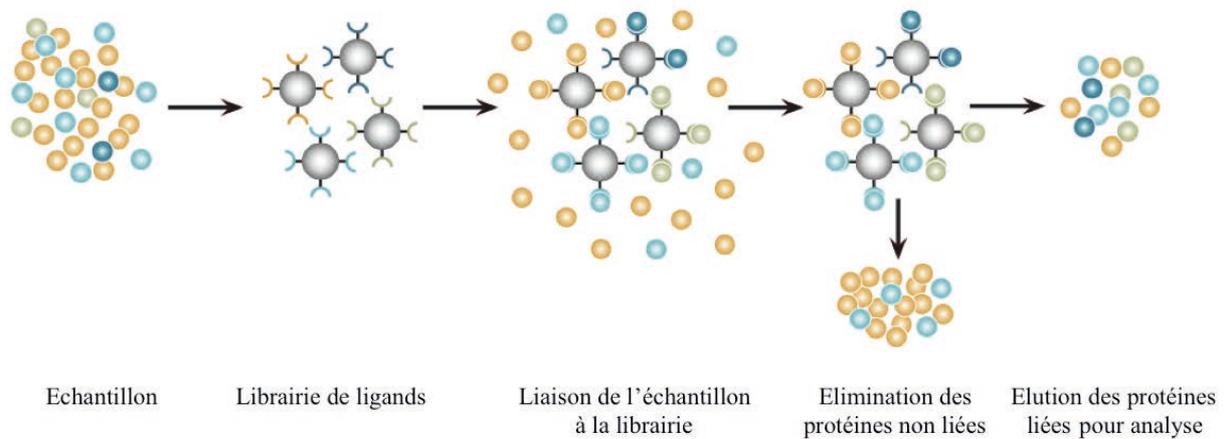
L'immunodéplétion a été utilisée avec succès et s'est montrée efficace pour éliminer les protéines majoritaires du plasma ou du sérum dans de nombreux travaux, notamment l'albumine.<sup>261-263</sup> Lorsqu'il s'agit d'analyser le « *deep proteome* », l'élimination de l'albumine constitue en effet une étape cruciale puisqu'elle représente la protéine majoritaire par définition. Toutefois, comme mentionné ci-dessus, il existe de très nombreuses interactions protéiques au sein du plasma et du sérum ; et, l'immunodéplétion de l'albumine s'accompagne malheureusement de la déplétion simultanée d'autres protéines incluant des protéines minoritaires. Ainsi, Zhou et al. ont démontré que cette technique engendrait la déplétion simultanée d'au minimum 63 autres protéines liées à l'albumine.<sup>260</sup>

#### 1.2.3.1.2. *Technique de dilution/compression : combinatory peptide ligand library (CPLL)*

C'est pour cette raison que nous avons fait le choix pour nos travaux d'une technique alternative qui consiste en une compression dynamique de la gamme de concentration des protéines d'un échantillon donné. Cette technique permet en effet une dilution des protéines majoritaires et une concentration simultanée des protéines minoritaires.<sup>264,265</sup>

Comme montré sur la Figure 12, cette technique utilise une librairie combinatoire de ligands hexa peptidiques fixés sur un support de chromatographie (billes). Cette librairie a été créée à partir de 20 acides aminés conduisant donc à la création de plusieurs millions d'hexa peptides différents. Chaque bille est porteuse d'un seul type de ligand (unique) et lie sa protéine spécifique jusqu'à saturation si la concentration de la protéine en question dépasse la capacité de liaison de la bille. Dans le cas contraire, l'ensemble des protéines présentes sera fixé (en fonction de l'affinité) et quelques sites de fixation resteront non utilisés. Ainsi, les protéines majoritaires vont saturer leurs sites de fixation à l'inverse des protéines minoritaires. L'étape suivante consiste à éliminer les protéines non liées aux billes. Enfin, la dernière étape consiste à éluer les protéines fixées sur les billes. La concentration finale d'une protéine donnée dépend de la concentration initiale de la protéine dans l'échantillon et de l'affinité de la protéine pour son ligand spécifique. A noter qu'il est probable qu'une protéine unique (suffisamment grosse) puisse se fixer sur plusieurs ligands différents pour des raisons simples

de probabilités. Les échantillons obtenus après ce prétraitement sont appelés « plasma égalisé » en comparaison des échantillons non traités appelés « plasma brut ».



**Figure 12. Schéma des étapes de la technique combinatoire peptide ligand library (CPLL).**

#### 1.2.3.2. Les méthodes d'analyse protéomique différentielle

Historiquement, l'approche protéomique classique était constituée de 2 étapes principales : une étape de séparation des protéines (ou fractionnement de l'échantillon) permettant de visualiser et de quantifier le niveau d'expression des protéines et une étape d'identification de ces protéines par spectrométrie de masse. Toutefois, cette identification nécessite la validation ultérieure des résultats obtenus par Western Blot, ELISA ou immunoprécipitation (IP) avec un anticorps spécifique de la protéine identifiée.

Différentes techniques de séparation ont été utilisées avec succès dans la littérature.<sup>266</sup> Nous reviendrons ici sur l'électrophorèse 2D, technique de séparation sur gel classique et historique, et sur la technique de *Surface Enhanced Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry* (SELDI-TOF-MS), technique sans gel que nous avons utilisée dans notre travail.

##### 1.2.3.2.1. Electrophorèse 2D

Les techniques traditionnelles de purification et de séparation des protéines par électrophorèse 1D ne permettent pas d'analyser la complexité du protéome humain.<sup>164</sup> A l'inverse l'électrophorèse 2D, qui sépare les protéines d'abord par leur charge électrique puis par leur poids moléculaire, possède la puissance résolutive pour analyser plusieurs milliers de protéines.<sup>267,268</sup>

La première étape d'isoélectrofocalisation (IEF) nécessite un gradient de pH le plus souvent obtenu par des immobilines. Les protéines sont amphotères, c'est à dire qu'elles peuvent être chargées électriquement positivement, négativement ou avoir une charge neutre en fonction du pH dans lequel elles se trouvent. Ainsi, sous l'effet d'un champ électrique, les protéines vont migrer jusqu'à leur point isoélectrique qui correspond au pH pour lequel leur charge électrique est neutre.

La seconde étape est représentée par la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire dans un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) sous l'effet d'un champ électrique : étape similaire à une électrophorèse standard.

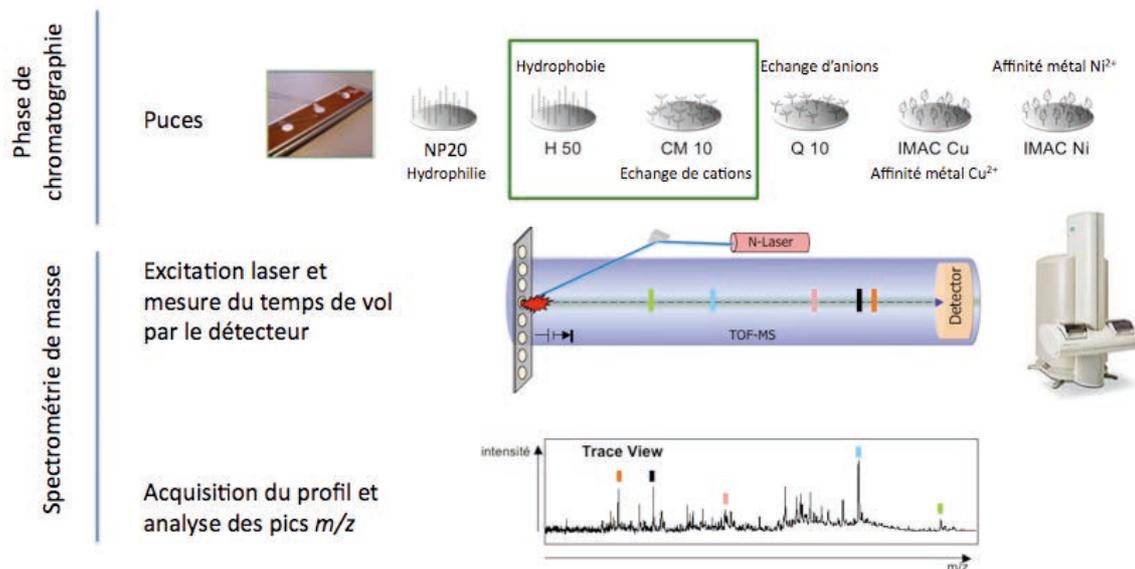
Afin de pouvoir visualiser et quantifier les protéines, une étape de révélation des spots protéiques est nécessaire. Cette révélation peut être obtenue soit par coloration après la migration des protéines soit par pré-marquage des protéines par des cyanines. Plusieurs colorations existent : les « visibles » comme le nitrate d'argent ou le bleu colloïdal moins sensible et les « fluorescentes » comme le Sypro® Ruby. Certaines colorations permettent également de détecter des catégories spécifiques de protéines comme le Pro-Q® Diamond pour les protéines phosphorylées ou le Pro-Q® Emerald pour les glycosylées. Le pré-marquage des protéines par des cyanines est utilisé dans la technique d'électrophorèse 2D différentielle (2D-DIGE), technique coûteuse mais très sensible. Après l'étape de révélation des spots, une analyse bioinformatique est nécessaire pour mettre en évidence les spots différenciellement intenses entre les différents échantillons analysés (analyse protéomique différentielle). L'électrophorèse 2D permet de faire une comparaison qualitative, ou au mieux semi quantitative, des différents échantillons. Les spots d'intérêt pourront ensuite être excisés pour identification. Dans le cadre d'une analyse protéomique différentielle, il faudra bien sûr veiller à ce que la coloration ou le marquage soit compatible avec l'étape suivante d'identification par spectrométrie de masse.

#### 1.2.3.2.2. SELDI-TOF-MS

La technique de SELDI-TOF-MS, introduite en 1993,<sup>269</sup> a notamment été développée pour répondre à certaines limites de l'électrophorèse 2D : l'impossibilité d'analyser correctement les protéines membranaires hydrophobes et surtout l'impossibilité de faire des comparaisons quantitatives fiables.<sup>270</sup> Elle combine une étape de chromatographie et la spectrométrie de masse. Sa sensibilité est supérieure aux autres techniques de spectrométrie de masse (mais avec une moins bonne résolution) et quelques microgrammes de protéines seulement sont nécessaires pour réaliser cette technique.

Pour la phase de chromatographie, les échantillons sont déposés sur des puces à protéines (Proteinchip® arrays). Ces puces vont fixer les protéines de l'échantillon en fonction de leurs concentrations d'une part et de leurs propriétés physico-chimiques d'autre part. Il existe plusieurs puces différentes permettant de fixer différentes protéines d'un même échantillon selon des propriétés différentes : échange d'anions (Q10), échanges de cations (CM10), hydrophobie (H50), hydrophilie (NP20), échange de cations divalents cuivre ou nickel (IMAC Cu et IMAC Ni). Il faut noter que certaines protéines peuvent être fixées par plusieurs types de puces. Fertin et al. <sup>271</sup> ont en effet montré qu'il existait une certaine redondance de l'information apportée par les différentes puces. Dans cette étude, il semblait que l'association de 2 puces différentes, CM10 et H50, permettait d'avoir un bon reflet du protéome plasmatique. Les autres puces n'apportaient en revanche que peu d'informations additionnelles. Dans ce travail de thèse, nous avons donc fait le choix d'utiliser 2 types de puces : la CM10 et la H50 afin d'élargir les possibilités de découvrir un biomarqueur pronostique d'intérêt. Il est également important de noter que malgré le développement de toutes ces puces, certaines protéines ne seront pas fixées et ne seront donc pas visualisables.

Pour la phase de spectrométrie de masse, il faut noter que les protéines entières de l'échantillon sont analysées et qu'il n'y a pas de phase de digestion trypsique préalable. Certaines protéines peuvent donc avoir des poids moléculaires extrêmes (>100 kDa) et il est reconnu que la technique de SELDI-TOF-MS perd de sa précision pour les poids moléculaires élevés (>120 kDa). L'ionisation des protéines est obtenue par désorption laser. Son principe ne diffère pas des autres techniques de spectrométrie de masse et réside dans la séparation en phase gazeuse de protéines chargées électriquement en fonction de leur rapport  $m/z$  (masse sur charge). Le temps de vol mis par les protéines pour rejoindre le détecteur est effectivement directement proportionnel à leur rapport  $m/z$ . Cette technique permet donc d'obtenir un profil protéique d'un échantillon en donnant le rapport  $m/z$  de chaque pic et son intensité propre. Le principe de l'analyse SELDI-TOF-MS est repris dans la Figure 13.



**Figure 13. Principe de l'analyse SELDI-TOF-MS.**

Par la suite, une analyse bioinformatique à l'aide du logiciel Proteinchip® data manager est nécessaire afin de sélectionner les pics  $m/z$  différemment intenses entre 2 échantillons et jugés d'intérêt.

La principale limite de cette technique est que l'identification des protéines correspondant aux différents pics  $m/z$  nécessite une étape supplémentaire par spectrométrie de masse.<sup>164,272</sup> Cette étape est extrêmement complexe et l'identification d'un seul pic  $m/z$  peut prendre plusieurs mois ou n'être jamais réalisable.<sup>272</sup> Les écueils de cette identification seront détaillés dans le paragraphe sur la purification et l'identification des pics  $m/z$  SELDI-TOF-MS (cf. PARTIE 3). Enfin, cette technique ne débouchera vraisemblablement pas sur une utilisation large en pratique quotidienne dans les prochaines années en raison de sa lourdeur. La sélection d'un ou quelques pics  $m/z$  ne peut donc pas suffire en soit à l'heure actuelle et l'étape d'identification des protéines est donc cruciale.

Toutefois, de nouvelles techniques de spectrométrie de masse telles que la *high resolution and accurate mass* (HR/AM) devront être évaluées dans l'avenir sur leurs capacités à analyser le protéome plasmatique humain.<sup>273,274</sup>

#### 1.2.3.2.3. Spectrométrie de masse

Suite à l'analyse bioinformatique, un certain nombre de spots différemment intenses et jugés d'intérêt vont être identifiés et possiblement excisés pour identification par spectrométrie de masse.

Après excision du spot d'intérêt, on procède à une étape de digestion enzymatique, le plus souvent trypsique, pour obtenir des fragments peptidiques de petites tailles de la protéine

cible qui sont compatibles avec la technique de spectrométrie de masse. Cette technique permet de détecter et d'identifier des peptides par mesure de leur masse mono isotopique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de peptides chargés électriquement en fonction de leur rapport  $m/z$  (masse sur charge). L'excitation ou ionisation peut s'effectuer par 2 techniques principalement : un faisceau d'ions dans la technique de l'électrospray (ESI) ou un laser dans la technique de *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry* (MALDI-TOF-MS).

La liste des peptides identifiés est ensuite implémentée dans un moteur de recherche disponible sur internet (type *SwissProt*® ou *Mascot*®) permettant ainsi l'identification de la protéine cible avec des scores de certitude variables en fonction du nombre de peptides identifiés.

A noter que cette étape est également nécessaire après la technique de SELDI-TOF-MS afin d'identifier les protéines correspondant aux différents pics  $m/z$  jugés d'intérêt. Nous reviendrons plus en détail sur les techniques de spectrométrie de masse dans le paragraphe sur la purification et l'identification des pics  $m/z$  SELDI-TOF-MS (cf. PARTIE 3).

#### 1.2.3.3. Application à l'évaluation pronostique des patients avec IC systolique

L'analyse protéomique représente une approche prometteuse pour la découverte de nouveaux biomarqueurs pronostiques dans le domaine de l'IC systolique.<sup>273,275,276</sup>

En effet, l'utilisation de l'électrophorèse 2D a permis d'identifier quelques biomarqueurs associés à l'IC systolique chez l'homme.<sup>277-279</sup> A titre d'exemple, Scheler et al.<sup>278</sup> ont montré que la dégradation de la Hsp27 était associée à la présence d'une IC systolique dans une petite étude de 18 patients. Toutefois, cette technique n'a, à ce jour, jamais permis la découverte d'un nouveau biomarqueur pronostique dans l'IC systolique.

La technique de SELDI-TOF-MS, a également été utilisée avec succès en cancérologie.<sup>280,281</sup> Belluco et al.<sup>280</sup> ont ainsi pu montrer dans une étude de 310 patients que la mesure de 7 pics  $m/z$  permettait de détecter précocement des femmes avec un cancer du sein de stade 1. Dans le domaine de l'IC, Fertin et al.<sup>271</sup> ont démontré la valeur du SELDI-TOF-MS dans une étude de 45 patients. Dans cette étude, 19 pics  $m/z$  étaient retrouvés significativement différenciellement intenses entre des patients qui vont présenter un remodelage ventriculaire gauche délétère après un IDM et ceux qui ne présenteront pas de remodelage. Parmi les 19 pics  $m/z$ , un seul a pu être identifié à ce jour: le pic  $m/z$  2777 comme la partie N-terminale de l'albumine clivée par la pepsine.<sup>271</sup>

La liste des biomarqueurs découverts chez l'homme par approche de protéomique différentielle dans le domaine de l'IC est reprise dans le Tableau 11.

**Tableau 11. Liste des biomarqueurs découverts chez l'homme par approche de protéomique différentielle dans le domaine de l'IC systolique.**

Etudes	Population	Technique utilisée	Protéines découvertes	Résultats
Scheler et al. <sup>278</sup>	18 patients (7 sains, 6 IC systolique non ischémique et 5 IC systolique ischémique)	Electrophorèse 2D	Hsp27	Dégradation de Hsp27 en cas IC systolique
Pinet et al. <sup>275</sup>	93 patients post-IDM	SELDI-TOF-MS	Variants post-traductionnels de la chaîne $\alpha 1$ de l'haptoglobine Hémoglobine	Modulation en cas de remodelage ventriculaire gauche
Urbonavicius et al. <sup>279</sup>	14 patients (5 sains et 7 IC systolique ischémique)	Electrophorèse 2D	Enzymes impliquées dans le métabolisme	Augmentation de l'expression de 2 enzymes et diminution de 6 autres enzymes en cas d'IC
Fertin et al. <sup>271</sup>	45 patients post-IDM	SELDI-TOF-MS	partie N-terminale de l'albumine clivée par la pepsine	Diminution lors du remodelage ventriculaire gauche
Wei et al. <sup>276</sup>	population test 16 patients (8 IC et 8 sains)  population de validation 34 patients avec IC sévère	Puce à protéines	MMPs 7 et 10 TIMP-4	Augmentation des MMPs 7 et 10 et diminution de TIMP-4 en cas de dilatation et remodelage ventriculaire gauche

A ce jour, tous ces biomarqueurs ont été retrouvés dans des études de faible effectif et très peu ont été validés dans une autre population que celle dans laquelle ils avaient été découverts. Surtout, aucun n'a pour le moment montré de valeur pronostique pour prédire la mortalité dans l'IC systolique. A noter que ce critère n'était néanmoins pas l'objectif de ces travaux initiaux.

## 1.2.4. Les ARNs non codants circulants

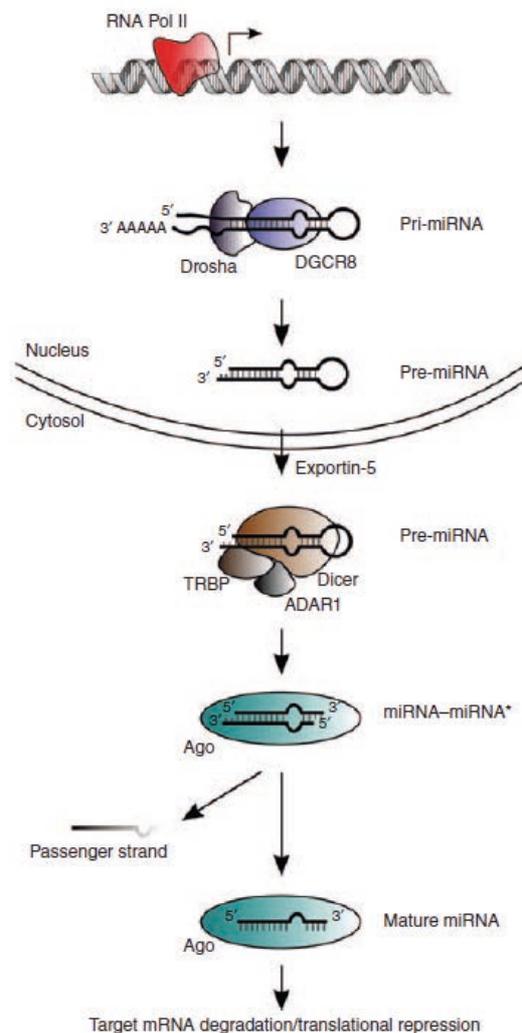
### 1.2.4.1. Les MiRNAs

#### 1.2.4.1.1. Généralités

Les miRNAs sont, comme leur nom l'indique, de petits ARNs non codants décrits pour la première fois chez *Caenorhabditis Elegans* en 1993 (link-4) dans une étude qui a suggéré que ces miRNAs régulaient de manière « séquence spécifique » des mécanismes post-transcriptionnels.<sup>282</sup> En 2008, ils ont été mis en évidence dans le sang circulant (plasma, sérum, plaquettes, microparticules, ...).<sup>169,283,284</sup> Leur taille est d'environ 22 nucléotides (entre 21 et 25).<sup>168,285</sup> A noter que plusieurs miRNAs ont été découverts dans la mitochondrie récemment (possiblement produits à partir du génome mitochondrial).<sup>286</sup>

#### 1.2.4.1.2. Synthèse des miRNAs

Comme montré sur la Figure 14,<sup>168</sup> les miRNAs sont transcrits dans le noyau cellulaire par l'ARN polymérase II à partir de l'ADN. Ce pri-miRNA est ensuite clivé pour obtenir un pré-miRNA de 70 à 100 nucléotides sous une forme dite « épingle à cheveux ». Ce pré-miRNA est ensuite transporté en dehors du noyau par un pore de membrane nucléaire. Une fois dans le cytoplasme, le pré-miRNA est clivé par le système Dicer, RNase III, pour obtenir un duplex miRNA/miRNA\*. Le brin miRNA\* est habituellement dégradé dans le cytoplasme et le miRNA mature est pris en charge par des protéines argonautes (Ago) pour être dirigé vers son ARNm cible afin d'en inhiber la traduction et/ou de le dégrader.

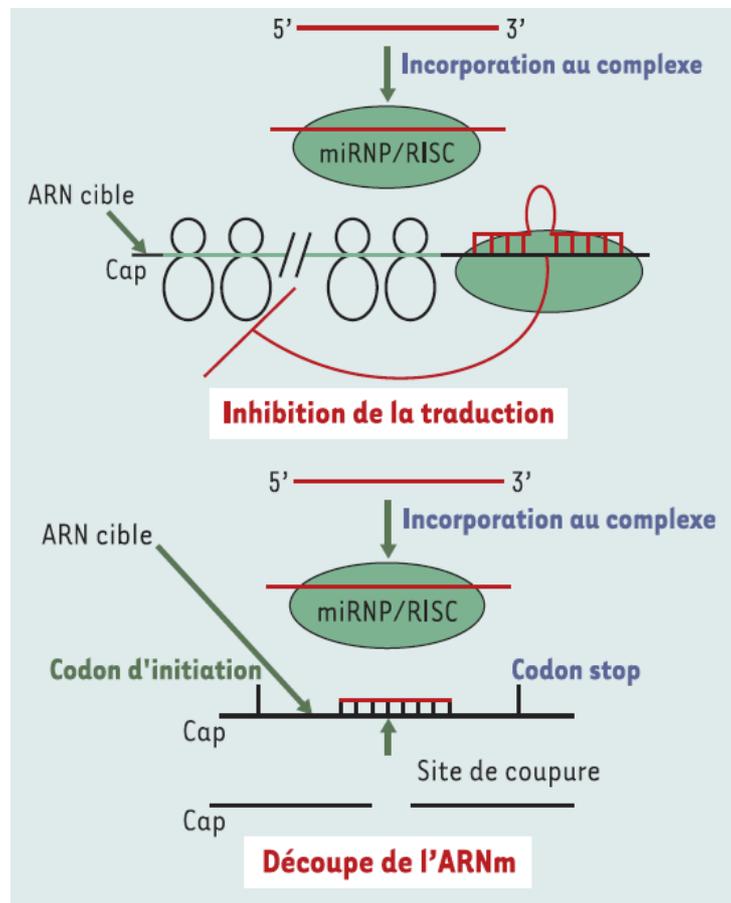


**Figure 14. Synthèse des miRNAs. Adapté de Elzenaar et al.<sup>168</sup>**

#### 1.2.4.1.3. Mode d'action

Le mode d'action des miRNAs n'est pas encore clairement élucidé. Le miRNA, une fois mature, se fixe sur le complexe *micro-ribonucleoprotein/RNA-induced silencing complex* (miRNP/RISC) dans lequel les protéines argonautes jouent un rôle tout particulier. Ce complexe avec le miRNA est ensuite guidé vers la région 3'UTR de l'ARNm cible. L'interaction entre un miRNA et son ARNm cible se fait par complémentarité de séquence au niveau de la région 3'UTR. Il faut noter qu'un miRNA peut interagir avec plusieurs ARNm cibles différents et que la complémentarité des séquences est rarement parfaite.<sup>287</sup> La zone d'interaction la plus importante au niveau du miRNA se situe entre le nucléotide 2 et 8 appelée séquence « *seed* » (le nucléotide 1 étant la première base nucléotidique au niveau de l'extrémité 5' du miRNA). Toutefois, le reste de la séquence pourrait également jouer un rôle dans la reconnaissance de l'ARNm cible.<sup>287</sup>

Comme montré sur la Figure 15, l'inhibition des cibles peut se faire par 2 mécanismes : par la dégradation directe de l'ARNm et par l'inhibition de la traduction de cet ARNm en fonction notamment de la protéine Ago présente dans le complexe miRNP/RISC.



**Figure 15. Mode d'action des miRNAs.**

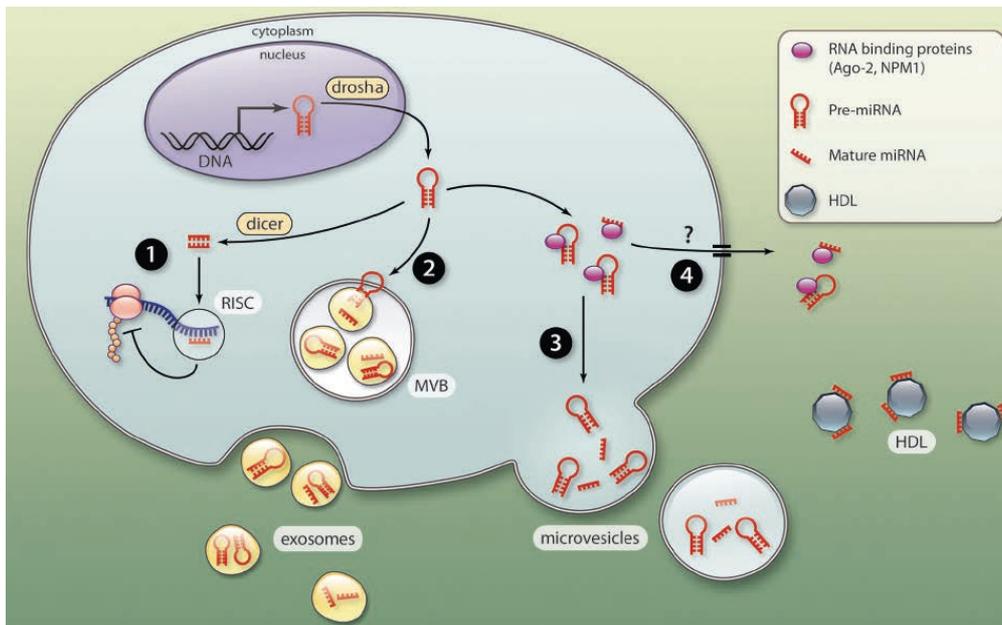
#### 1.2.4.1.4. Mécanismes de relargage dans la circulation sanguine

En théorie intracellulaires, les miRNAs ont également été mis en évidence dans la circulation sanguine chez l'homme. C'est en 2008 que ces miRNAs circulants ont été mis en évidence pour la première fois dans des travaux sur le cancer.<sup>169,283,284</sup> El-Hefnawy et al. ont montré que ces miRNAs circulants étaient particulièrement stables dans la circulation et protégés des mécanismes de dégradation par inclusion dans des vésicules.<sup>167</sup>

Plusieurs mécanismes de relargage des miRNAs dans la circulation ont été évoqués (Figure 16).<sup>167,285</sup> Des pré-miRNAs et des miRNAs matures ont été mis en évidence dans des microvésicules intra cytoplasmiques et seraient relargués dans la circulation sous la forme d'exosomes et/ou de microvésicules.<sup>167</sup> Des pré-miRNAs et des miRNAs matures ont également été retrouvés dans des microparticules circulantes.<sup>167</sup> Dans ce cadre, le relargage

pourrait être passif (produits de mort cellulaire) ou actif par reconnaissance spécifique des miRNAs par des protéines membranaires. Enfin, d'autres mécanismes encore inconnus pourraient expliquer ce relargage. Actuellement, les proportions de miRNAs matures et de pré-miRNAs dans les différents compartiments cellulaires et extracellulaires ne sont pas connues. De plus, les cibles de chaque miRNA ne sont pas connues.

La stabilité des miRNAs dans la circulation sanguine suggère qu'ils pourraient avoir un rôle important dans la communication intercellulaire notamment via des échanges de microparticules et de vésicules.<sup>285,288</sup> Zhang et al. ont montré dans leur travaux que le miR-150 relargué dans la circulation sanguine à l'intérieur de microvésicules produites à partir de cellules sanguines monocytaires était directement transmis via ces vésicules à des cellules endothéliales en culture et réduisait la production de la protéine c-Myb, cible reconnue et validée de ce miRNA, augmentant en conséquence la migration des cellules endothéliales.<sup>288</sup>



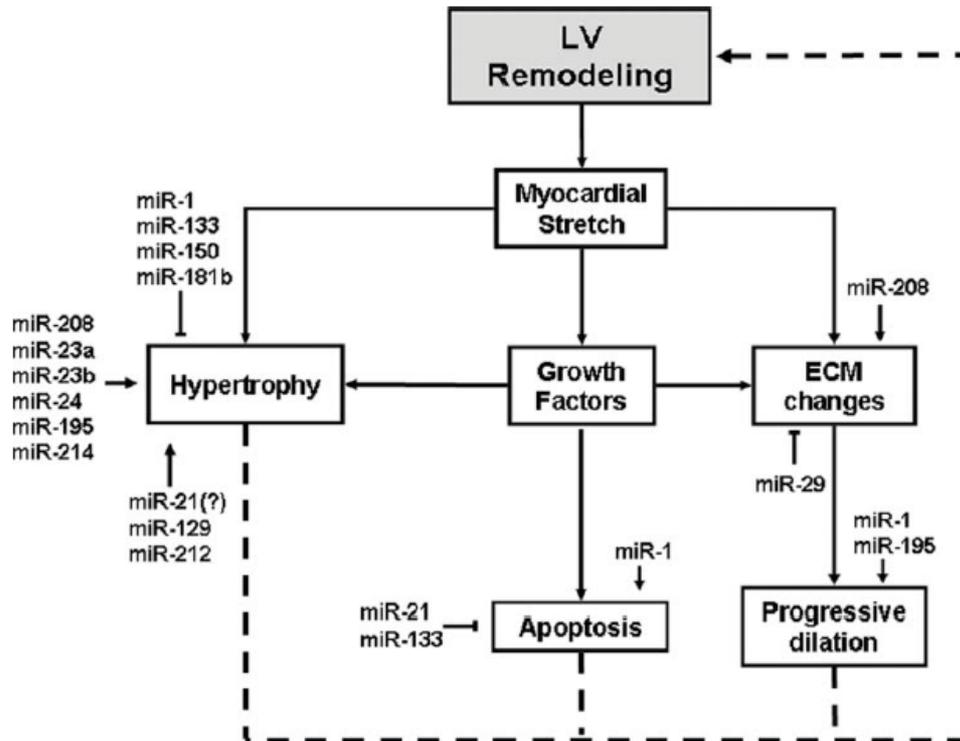
**Figure 16. Schéma des mécanismes de relargage des miRNAs dans la circulation sanguine. Adapté de Creemers et al.<sup>285</sup>**

#### 1.2.4.1.5. Applications dans le domaine de l'IC systolique

Depuis la découverte de leur présence dans la circulation sanguine, les miRNAs ont attiré sur eux beaucoup d'intérêt (nouveaux biomarqueurs diagnostiques et/ou pronostiques notamment dans le domaine de l'IC systolique).

De très nombreux travaux ont montré l'association entre plusieurs miRNAs circulants et différents mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'IC systolique : la fibrose, le turnover de la matrice extracellulaire, le remodelage ventriculaire gauche, l'activation

neurohormonale, l'apoptose et l'hypertrophie ventriculaire gauche.<sup>168,289</sup> La Figure 17 reprend par exemple les principaux miRNAs qui ont montré une implication dans le remodelage ventriculaire gauche.<sup>289</sup>



**Figure 17. Principaux miRNAs impliqués dans le remodelage ventriculaire gauche. Adapté de Divakaran et al.<sup>289</sup>**

Dans une étude portant sur 24 patients tests (12 patients avec IC systolique et 12 témoins sains) et 89 patients pour validation (50 patients avec dyspnée dont 30 pour cause d'IC et 39 témoins sains), Tijssen et al.<sup>290</sup> ont montré que, parmi 1146 miRNAs différents testés sans à priori, seul le miR-423-5p était significativement associé à la présence d'une IC en comparaison à la fois aux sujets sains mais également aux sujets se présentant pour dyspnée d'origine non liée à une IC.

Goren et al.<sup>170</sup> ont, quant à eux, retrouvé 4 miRNAs d'intérêt (parmi 189 testés) dans une étude portant sur 60 patients (30 témoins sains et 30 patients avec IC systolique stable). Dans cette étude, les miR-423-5p, miR-320a, miR-22 et miR-92b étaient associés à la présence d'une IC de manière significative. De plus, chez les patients avec IC systolique, ces 4 miRNAs étaient corrélés à un certain nombre de marqueurs pronostiques dans l'IC systolique : au BNP, à la largeur du QRS sur l'électrocardiogramme et à la dilatation du ventricule gauche et de l'oreillette gauche en échographie.

Corsten et al.<sup>291</sup> ont rapporté que les taux de miR-208b et miR-499 étaient augmentés chez les patients avec IC aigue décompensée par rapport aux sujets sains. Ellis et al.<sup>292</sup> ont retrouvé 4 miRNAs (le miR-103, le miR-142-3p, le miR-30b et le miR-342-3p) différemment exprimés entre des patients avec IC et des patients témoins sains ou se présentant pour une dyspnée d'origine non liée à une IC.

Au total, bien qu'étudié dans des études avec de petits effectifs, le dosage des miRNAs semble prometteur dans le domaine de l'IC notamment dans le cadre du diagnostic de cette pathologie. Toutefois, aucun miRNA n'a montré de valeur pronostique intéressante dans ce domaine à ce jour. De plus, certains miRNAs jugés prometteurs par des travaux antérieurs comparant des sujets atteints d'une IC à des sujets sains, tels que le miR-423-5p et le miR-133a, n'ont pas été validés dans un travail récemment publié en 2013.<sup>293</sup> Dans ce travail, Bauters et al.<sup>293</sup> n'ont pas retrouvé, par une approche « miRNA candidat », d'association entre les taux circulants de ces 2 miRNAs et le remodelage ventriculaire gauche en post-IDM dans une étude de 246 patients (patients ayant tous un IDM antérieur et le même traitement). Des travaux complémentaires doivent donc être réalisés afin de valider la place des miRNAs dans l'évaluation diagnostique et surtout pronostique de l'IC systolique.

#### 1.2.4.2. Les ARNs longs non codants

##### 1.2.4.2.1. Généralités

Les ARNs longs non codants sont définis par un transcrit de plus de 200 nucléotides ne codant pour aucune protéine. Les ARNs longs non codants ont été découverts en 1990 (avant même l'utilisation du terme consacré). A l'époque, le gène appelé H19 était décrit comme inhabituel codant pour une petite molécule d'ARN différente d'un ARNm classique.<sup>294</sup>

Actuellement la recherche sur les ARNs longs non codants n'en est qu'à ses débuts et leurs mécanismes d'action et leurs rôles ne sont pas très bien décrits. La découverte récente de plusieurs milliers d'ARNs longs non codants suggèrent que ces ARNs longs non codants pourraient rapidement devenir une classe de biomarqueurs d'intérêt dans de nombreuses pathologies, notamment en cancérologie et dans le domaine cardiovasculaire.<sup>295</sup>

Actuellement, plusieurs types d'ARNs longs non codants ont été décrits selon leur localisation génomique : sens, anti-sens, intronique, divergent, et intergénique.<sup>296</sup> Les ARNs longs non codants sens et anti-sens sont initiés dans une portion de gène codant pour une protéine et sont transcrits dans la même direction (sens) ou dans la direction inverse (anti-

sens). Ils chevauchent en général un ou plusieurs exons. Les ARNs longs non codants introniques ne chevauchent aucun exon. Pour les ARNs longs non codants divergents, la transcription peut se faire comme leur nom l'indique dans les 2 sens. Dans cette catégorie, l'une des spécificités est la proximité (quelques dizaines de paires de bases) entre le site d'initiation et le promoteur d'un gène codant. Enfin, les ARNs longs non codants intergéniques ont un site d'initiation en général très éloigné (plusieurs milliers de paires de bases) du promoteur d'un gène codant, empêchant ainsi tout recouvrement. L'initiation peut se faire dans les 2 sens.

Comme pour les miRNAs, des ARNs longs non codants intra-mitochondriaux ont été décrits récemment.<sup>297,298</sup> Les travaux de Yang et al. semblent même suggérer que plus de 70% des ARNs longs non codants trouvés au sein du ventricule gauche chez l'homme proviendraient de la mitochondrie et seraient donc possiblement codés à partir du génome mitochondrial.<sup>298</sup>

#### 1.2.4.2.2. Synthèse

La synthèse des ARNs longs non codants semble moins complexe que celle des miRNAs et très proche de celle d'un ARNm classique ce qui explique leur similarité structurale. Ils sont synthétisés par l'action de l'ARN polymérase II.

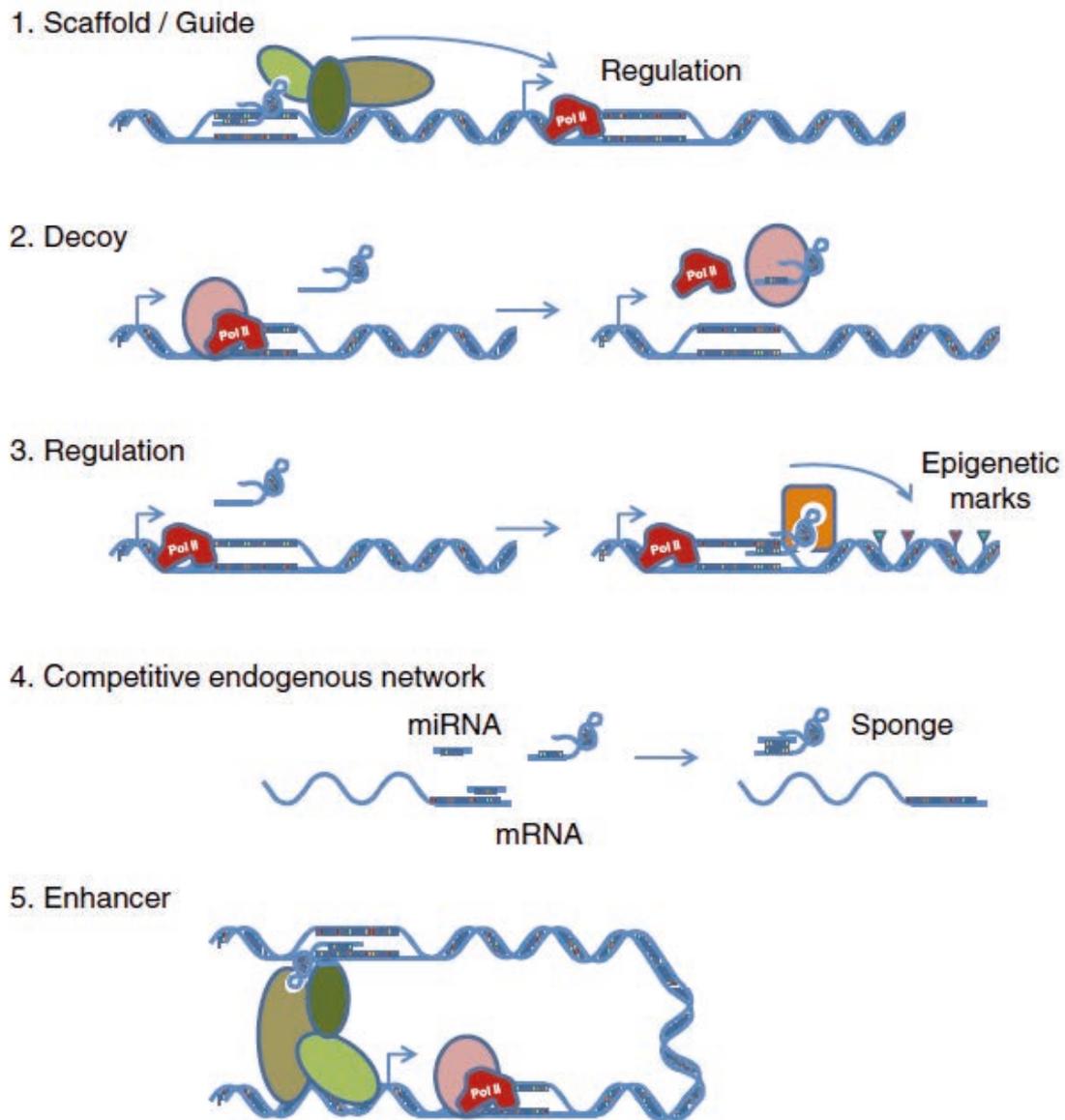
#### 1.2.4.2.3. Mode d'action

Le fait que bon nombre d'ARNs longs non codants aient un niveau d'expression bien inférieur aux ARNm classiques suggère un rôle de régulation. Plusieurs travaux convergent vers un rôle de régulation épigénétique et un rôle de régulation transcriptionnelle.<sup>295</sup>

Les mécanismes d'action et les cibles spécifiques sont en revanche mal décrits. Plusieurs mécanismes ont été évoqués parmi lesquelles figurent :<sup>295</sup>

- un rôle de guide moléculaire et d'échafaudage structurel, qui pourrait expliquer l'interaction possible entre le *chromatin modifying protein complexe* (n'ayant aucun domaine de reconnaissance pour l'ADN) et son gène cible,
- une interaction directe avec certains facteurs de transcription,
- une interaction avec différentes classes de protéines régulatrices épigénétiques, notamment les *epigenic modifying protein complexes*,
- une interaction compétitive directe avec l'ARNm ou un miRNA régulateur,
- une interaction avec des séquences cis-régulatrices de type *enhancer*, facilitant ainsi la formation de boucle de chromatine et l'activation de la transcription de certains gènes.

La Figure 18 reprend un schéma de ces principaux mécanismes d'action.<sup>295</sup>



**Figure 18. Principaux mécanismes d'action décrits des ARNs longs non codants. Adapté de Ounzain et al.<sup>295</sup>**

#### 1.2.4.2.4. Mécanismes de relargage dans la circulation sanguine

Les mécanismes de relargage des ARNs longs non codants dans la circulation ne sont pas aussi bien décrits que ceux des miRNAs. Toutefois, certains suggèrent que des mécanismes très proches de ceux des miRNAs sont à l'origine de la présence des ARNs longs non codants dans la circulation sanguine.

#### 1.2.4.2.5. Applications dans le domaine de l'IC systolique

Les travaux sur la place des ARNs longs non codants comme biomarqueurs ou cibles thérapeutiques sont débutants.

En cancérologie, Bussemakers et al. avaient identifié en 1999 l'ARN long non codant PCA3 urinaire comme spécifique du cancer de la prostate.<sup>299</sup> Quelques années plus tard, ce biomarqueur s'est révélé être le marqueur le plus sensible pour la détection du cancer de la prostate dans 2 travaux.<sup>300,301</sup>

Dans le domaine de l'IC, Ounzain et al. ont montré dans un modèle d'IDM chez la souris que certains ARNs longs non codants étaient associés au remodelage ventriculaire gauche délétère.<sup>171</sup> Ainsi, parmi plus de 2509 ARNs longs non codants testés, le *Novlnc6* a été retrouvé significativement augmenté chez les souris avec une IC systolique en post-IDM par rapport aux souris témoins ; et sa cible, le gène *Nkx2.5*, était significativement diminuée, attestant donc que les ARNs longs non codants pourraient avoir un rôle majeur dans la physiopathologie de l'IC systolique et le remodelage ventriculaire gauche.

Au sein de notre laboratoire de recherche et en collaboration avec une équipe allemande dirigée par le professeur T. Thum, nous avons analysé la place éventuelle des ARNs longs non codants pour prédire le pronostic des patients avec IC systolique (ANNEXE 3).<sup>297</sup> Nous avons pu démontrer pour la première fois, dans ce travail réalisé chez l'homme, que les taux d'un ARN long non codant, nommé *long intergenic noncoding RNA predicting cardiac remodeling* (LIPCAR), variaient en fonction du temps et étaient associés de manière indépendante au remodelage ventriculaire gauche après un IDM inaugural (Figure 19). LIPCAR était également associé à la mortalité cardiovasculaire chez les patients avec une IC systolique chronique et stable (Figure 20). Surtout, l'utilisation de LIPCAR permettait d'améliorer de manière significative la stratification du risque de décès cardiovasculaire de ces patients par rapport à un modèle combinant déjà l'âge, le sexe, la cause de la cardiopathie, le diabète, la classe NYHA, la FEVG, le BNP, la créatinine et le pic de VO<sub>2</sub>. Ce travail a été réalisé au sein de 3 populations de patients incluant un nombre total de 788 patients (246 patients post-IDM inaugural dont 102 patients avec un remodelage ventriculaire gauche et 542 patients avec IC systolique chronique stable dont 142 patients décédés dans les 3 ans suivant le prélèvement biologique). Ce travail est publié et présenté en ANNEXE 3.

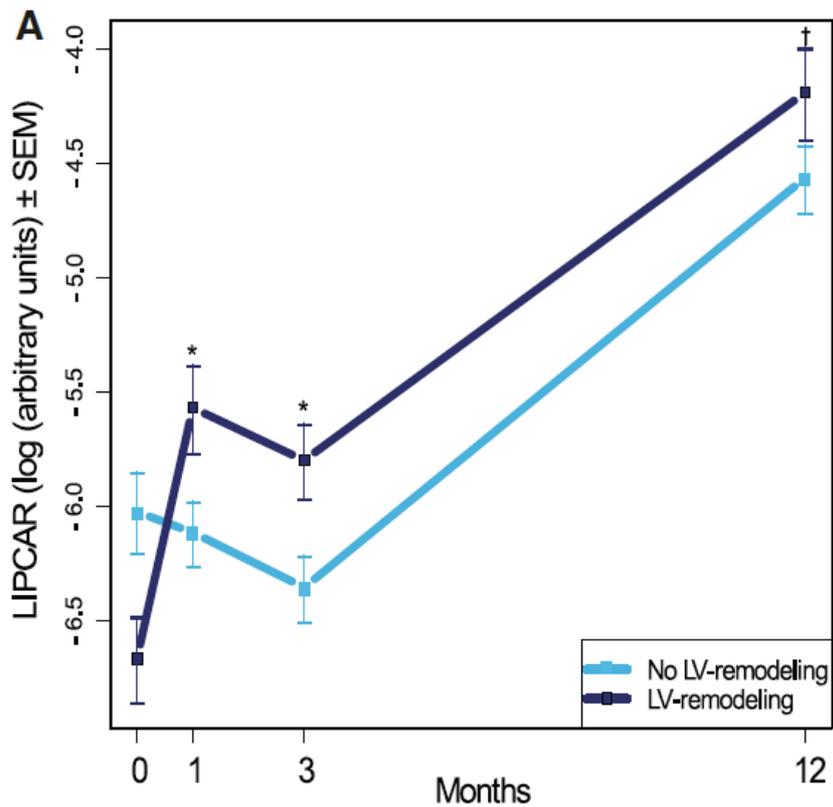


Figure 19. Impact de LIPCAR, un ARN long non codant, pour prédire le risque de remodelage ventriculaire gauche en fonction du temps après l'IDM. \* $P < 0.01$  vs. absence de remodelage ventriculaire gauche, † $P < 0.05$ .

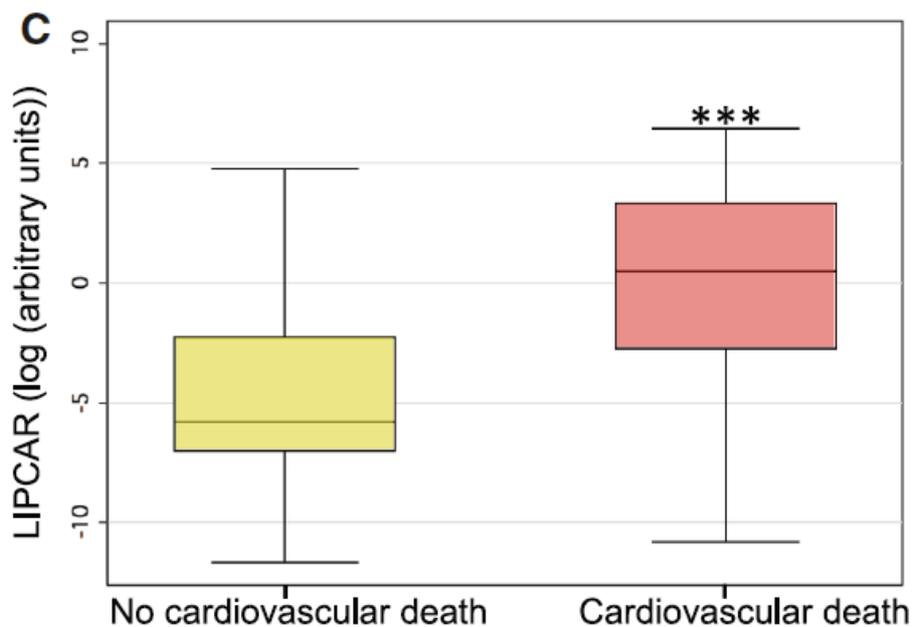


Figure 20. Impact de LIPCAR, un ARN long non codant, pour prédire le risque de décès cardiovasculaire chez les patients atteints d'une IC systolique chronique. \*\*\* $P < 0.0001$  vs. absence de décès cardiovasculaire.

## 1.2.5. Approche multi marqueurs et statistiques

### 1.2.5.1. L'approche multi marqueurs

A ce jour, de nombreux marqueurs pronostiques de l'IC systolique ont été individualisés et validés, et ce chiffre va probablement continuer de croître au vu des récentes publications et des nouvelles approches sans à priori testant souvent simultanément un nombre très important de variables. En matière d'évaluation pronostique, plus le nombre de variables pronostiques connues pour un patient donné est grand et plus la prédiction de son risque individuel sera fine et fiable. Dans le cadre de l'IC systolique, il est actuellement largement reconnu dans la littérature que la combinaison de plusieurs variables pronostiques est capable d'améliorer la stratification du risque des patients.

Comme mentionné plus tôt, des scores de risque basés sur une approche multiparamétrique ont été proposés par différents auteurs afin d'améliorer la stratification du risque des patients avec IC systolique.<sup>54,56,129,130,163</sup>

Concernant les biomarqueurs pronostiques circulants, cette approche multiparamétrique a également été utilisée avec succès.<sup>105,109,111,146,251,256,302-305</sup> Ainsi, l'utilisation du BNP et/ou du NT-proBNP en combinaison à d'autres biomarqueurs circulants tels que la troponine,<sup>105,109,305</sup> la copeptine,<sup>111</sup> la MR-proADM,<sup>303</sup> le facteur ST2,<sup>302</sup> la cystatine C,<sup>305</sup> l'hsCRP,<sup>251,304,305</sup> la MPO,<sup>304</sup> le H-FABP ou la pentraxine 3<sup>256</sup> par exemple permettait d'améliorer significativement la stratification des patients dans de nombreux travaux. De nombreux auteurs suggèrent donc l'intérêt de choisir plusieurs biomarqueurs circulants appartenant chacun à différents mécanismes physiopathologiques pour améliorer de façon très significative l'évaluation pronostique des patients.<sup>105,109,111,146,251,256,302-305</sup>

Néanmoins, la plupart des travaux ayant testé cette approche n'ont testé l'association que de quelques biomarqueurs circulants entre eux et aucune étude de large envergure n'a actuellement testé simultanément l'ensemble ou la majeure partie des biomarqueurs circulants aujourd'hui documentés. De plus, encore moins d'études les ont mis en compétition face aux paramètres pronostiques déjà validés tels que l'âge, la classe NYHA, la FEVG et le pic de VO<sub>2</sub> par exemple. Il est donc aujourd'hui très difficile de savoir quels seraient les marqueurs les plus informatifs et lesquels, à l'inverse, n'apporteraient qu'une information redondante. En effet, comme nous avons pu le voir précédemment, tous ces biomarqueurs n'ont pas la même puissance de discrimination et tous n'ont pas le même degré de validation dans la littérature. Il est très vraisemblable que plusieurs d'entre eux n'apportent pas d'information additionnelle majeure dans l'évaluation pronostique des patients par rapport aux paramètres déjà connus,

même s'ils peuvent amener une meilleure compréhension de la pathologie. Enfin, en pratique clinique, il est extrêmement difficile de recueillir l'ensemble de toutes les variables pour un patient donné pour des raisons évidentes de temps et de coûts de santé. Les études et travaux à venir devront donc absolument s'enquérir de savoir si les nouveaux biomarqueurs pronostiques retrouvés apportent effectivement une valeur additionnelle par rapport à une évaluation pronostique plus « classique ».

#### 1.2.5.2. Méthodes statistiques appliquées aux techniques de l'omique

##### 1.2.5.2.1. *Le nombre de variables explicatives*

Les approches actuelles sans à priori et les technologies à haut débit telles que l'analyse par spectromètre de masse, SELDI-TOF-MS et *microarrays* par exemple, génèrent très souvent un nombre extrêmement important de variables dites explicatives ( $p$ ), c'est à dire cherchant à expliquer une condition donnée (dans notre cas le mauvais pronostic des patients avec IC systolique). Ainsi, la plupart de ces techniques testent des centaines ou des milliers de biomarqueurs (gènes, ARNs non codants, protéines ou métabolites) simultanément.<sup>306</sup> Par ailleurs, ce nombre extrême de variables explicatives est très souvent opposé dans ces travaux au nombre relativement faible d'échantillons biologiques ( $n$ ) pour les tester (dans notre cas le nombre de patients avec IC systolique inclus dans l'étude).

De ce fait, la gestion des données générées par ces techniques nécessite très souvent des méthodes statistiques dédiées à ce type de problème particulier et appelé « *large p and small n problem* » par les statisticiens ( $p \gg n$ ).

##### 1.2.5.2.2. *La colinéarité et la redondance*

Au regard du très grand nombre de variables disponibles et analysées grâce aux techniques sans à priori mais aussi au regard du fait que bon nombre de ces variables sont possiblement impliquées dans des phénomènes biologiques communs (dégradation de la matrice extracellulaire par exemple) ou des voies de signalisation communes, il doit être mentionné qu'il existe toujours une très forte colinéarité entre les différentes variables. Cette colinéarité peut également être liée et/ou aggravée par le choix de la technique utilisée ; à titre d'exemple, l'utilisation de plusieurs puces différentes pour la technique de SELDI-TOF-MS peut être à l'origine d'une aggravation de cette colinéarité. En effet, comme mentionné plus tôt, il est aujourd'hui clairement reconnu qu'une seule et même protéine puisse se fixer sur plusieurs types de puces différentes.

Ainsi, la colinéarité et la redondance de l'information doivent absolument être considérées pour les différentes analyses statistiques et nécessitent là aussi l'utilisation de méthodes dédiées.

#### 1.2.5.2.3. Les méthodes statistiques

Dans la plupart de ces situations générées par les données provenant des techniques de « l'omique », l'objectif est habituellement de rechercher une association entre les variables analysées et un trait phénotypique particulier jugé d'intérêt (dans notre cas le risque de décès chez le patient avec IC systolique stable). Toutefois, l'un des objectifs est également de pouvoir sélectionner parmi toutes les variables, un plus petit nombre de variables permettant une bonne prédiction de ce trait phénotypique.

Le premier problème généré par ces situations est donc la nécessité de réaliser un très grand nombre de tests statistiques simples en lien avec le très grand nombre de variables. Cette situation peut, du simple fait du hasard, aboutir à des conclusions erronées, c'est à dire relier une variable au trait phénotypique à tort. Dans ces conditions, il existe plusieurs méthodes statistiques pour tenter de corriger ce problème de tests multiples. La plus connue et la plus utilisée est la correction de Bonferroni qui consiste à diminuer le seuil pour lequel la valeur de  $p < 0,05$  habituellement jugée significative par le nombre de variables testées. Par exemple, pour 100 variables testées, le nouveau seuil de significativité sera  $p < 0,05/100$  soit  $p < 0,0005$ . Ce problème rend également compte de la nécessité de valider les résultats dans une autre population.

Le deuxième problème est celui de la colinéarité et de la redondance de l'information portée par certaines variables. Dans ce contexte, les méthodes statistiques traditionnelles utilisées pour la prédiction d'un risque (régression linéaire multiple simple) ne peuvent pas être utilisées et des approches dédiées de pénalisation ou de « *machine learning* » sont nécessaires. Il existe aujourd'hui 4 grands types de méthodes : <sup>306</sup>

- Les méthodes avec pénalisation dite continue pour lesquelles la pénalisation du facteur lié à chaque variable est comprise entre 0 et l'infini. De ce fait, toutes les variables sont plus ou moins pénalisées mais conservées dans le modèle statistique final de prédiction du risque. Le choix des paramètres de pénalisation est réalisé habituellement par validation croisée. Parmi ces méthodes on retrouve la pénalisation de LASSO (LASSO), la pénalisation de RIDGE et la méthode Elastic Net (combinant les deux techniques). La pénalisation est

appliquée aux valeurs absolues des coefficients de régression pour la méthode de LASSO et aux carrés des coefficients de régression pour la méthode de RIDGE.

- Les méthodes avec pénalisation dite parcimonieuse pour lesquelles l'objectif est de sélectionner le nombre optimal de composantes pour prédire le risque. Le choix du nombre de composantes se fait par validation croisée. On note essentiellement 2 méthodes : la régression par composante principale (PCR) et la régression des moindres carrés partiels (PLS). Ces méthodes sont relativement abstraites. Ainsi, chaque composante est représentée par une combinaison linéaire des variables originales. La principale différence entre la PCR et la PLS est que la PLS prend également en compte la réponse (c'est à dire l'évènement à prédire) pour définir le modèle statistique final.

- Les méthodes avec pénalisation mixte (continue et parcimonieuse) combinant les 2 types de pénalisation susmentionnés. La principale méthode est la régression des moindres carrés partiels parcimonieuse (sPLS) qui combine une PLS classique et une pénalisation de LASSO.

- Les méthodes « *machine learning* » dont l'objectif est de construire un modèle mathématique également abstrait qui apprend de son expérience. Un peu plus concrètement, l'objectif est de tracer une ligne mathématique non linéaire permettant de discriminer les patients au regard du risque à prédire. L'avantage de ces méthodes est qu'elles peuvent parfaitement inclure des variables dont la distribution n'est pas normale. La méthode classiquement utilisée est la machine à vecteur de support (SVM). Les paramètres de réglage sont aussi définis par validation croisée.

L'avantage de toutes ces méthodes est qu'en plus de la gestion de la colinéarité, elle sont capable de diminuer le risque « *d'overfitting* » d'un modèle statistique : <sup>306</sup> c'est à dire de diminuer le risque qu'un modèle de prédiction fonctionne trop bien dans la population dans laquelle il est développé mais très peu ou pas du tout dans une autre population.

Enfin, du fait même de l'approche sans à priori, le dernier problème majeur est celui de savoir si les variables retrouvées associées au phénotype jugé d'intérêt par ces techniques apportent une valeur additionnelle par rapport aux variables déjà décrites dans la littérature. Pour ce faire, il existe plusieurs façons d'appréhender le problème. Si le nombre de variables retrouvées est faible ou si l'information de ces variables est préalablement combinée dans un score, il est alors possible de réaliser une simple régression logistique, ce qui permettra de voir si la variable en question porte une information intéressante et indépendante après ajustement sur les facteurs confondants. Une autre possibilité est de comparer les aires sous la courbe ROC du modèle avec et sans la nouvelle variable à tester et de voir si la différence des

*c statistics* est significative. Cette façon de faire est peu robuste notamment quand le modèle initial possède un *c statistics* déjà relativement élevé. Enfin des méthodes de reclassification ont été développées, notamment les index *Integrated Discrimination Improvement* (IDI) et *Net Reclassification Improvement* (NRI). Ces techniques permettent d'évaluer la capacité de la nouvelle variable à reclasser les échantillons par rapport à la réponse non plus attendue mais réellement observée. Ainsi dans notre cas, ces index permettent de juger si la nouvelle variable est capable de reclasser significativement les patients effectivement décédés mais jugés à faible risque par le modèle initial dans le groupe des patients qui vont décédés et inversement.

En conclusion, les données générées par ces nouvelles techniques nécessitent des analyses statistiques dédiées sous peine de générer des conclusions erronées.

## **2. OBJECTIFS**

Nous avons pu voir dans l'introduction que l'évaluation pronostique des patients atteints d'une IC systolique chronique et stable est primordiale en pratique clinique et fait partie intégrante de la prise en charge de ces patients dont le pronostic est souvent sévère. Toutefois, cette évaluation pronostique reste aujourd'hui perfectible et gagnerait à être encore améliorée.

L'objectif principal de ma thèse était la recherche de nouveaux biomarqueurs pronostiques circulants de l'IC systolique chronique et stable à partir d'une approche de protéomique différentielle et d'une technique sans à priori, le SELDI-TOF-MS.

Ce projet a été réalisé à partir de 2 sous populations différentes et indépendantes provenant de l'étude INsuffisance CARdiaque (INCA) qui a inclus des patients avec IC systolique chronique et stable (FEVG <45%). Brièvement, la recherche sans à priori des nouveaux biomarqueurs a été réalisée dans une première population cas/témoins de 198 patients dite « population test ». Ces biomarqueurs ont ensuite été validés dans une seconde population, cohorte de 344 patients consécutifs, dite « population de validation ». Nous avons porté une attention toute particulière à l'obtention d'un phénotype précis des patients inclus dans cette étude sur le plan de leur IC. Le suivi des patients a été réalisé à 3 ans après leur inclusion dans les 2 populations.

A l'inclusion, les patients avaient tous un prélèvement sanguin afin d'obtenir des échantillons de plasma. Afin d'avoir accès au « *deep proteome* », tous les échantillons de plasma ont été prétraités par la technique CPLL permettant d'obtenir une compression dynamique de l'ensemble des protéines présentes dans l'échantillon et d'analyser les protéines minoritaires du plasma qui sont des cibles de choix dans le cadre de ce projet. L'ensemble des échantillons des patients a ensuite été analysé par SELDI-TOF-MS.

L'analyse des pics  $m/z$  différentiellement intenses entre les patients décédés dans les 3 ans suivant leur inclusion et les survivants avait pour objectifs :

- 1- de développer des scores protéomiques pronostiques et
- 2- de purifier et d'identifier les protéines correspondant à ces pics d'intérêt.

Ainsi, la découverte de nouveaux biomarqueurs pronostiques dans l'IC systolique pourrait déboucher sur :

- une amélioration significative de la stratification du risque des patients avec IC systolique chronique
- la découverte de nouvelles voies physiopathologiques non encore impliquées dans cette pathologie
- la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques et le développement de nouveaux traitements permettant à terme d'améliorer le pronostic des patients.

# **3. RESULTATS**

## **3.1. PARTIE 1 : Description de la population *INCA***

---

### **3.1.1. Généralités**

Les échantillons de plasma analysés au cours de ce projet sont issus de l'étude INSuffisance CARdiaque (*INCA*, investigateur principal: Dr Pascal de Groot, Hôpital Cardiologique, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille). Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique du Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille et est en accord avec les principes de la déclaration d'Helsinki (N°CPPRB : CP-98/94)

Dans cette population, sont inclus depuis novembre 1998 et de manière consécutive tous les patients insuffisants cardiaques stables depuis au minimum 2 mois (c'est à dire sans notion de décompensation d'IC) ayant un traitement médical jugé optimal (dose maximale tolérée) et bénéficiant d'un bilan pronostique pour IC systolique ( $FEVG \leq 45\%$ ).

Ce bilan comporte en outre l'évaluation des marqueurs pronostiques de l'IC systolique reconnus comme les plus importants dans la littérature comme la classe NYHA, le dosage du BNP, la mesure de la FEVG et la mesure du pic de  $VO_2$  lors d'une épreuve d'effort métabolique. A noter que l'ensemble des patients a bénéficié d'une coronarographie systématique pour documenter la cause de la cardiopathie (ischémique versus non ischémique).

Les échantillons de plasma utilisés dans notre travail ont été prélevés à l'inclusion puis conservés à  $-80^\circ\text{C}$  à l'Institut Pasteur de Lille jusqu'au moment des analyses.

A partir de cette cohorte globale de 894 patients en mai 2010, 2 populations différentes ont été prédéterminées pour les besoins de notre projet : une population test (n=198 patients) et une population de validation (n=344 patients).

Le suivi clinique à 3 ans de la population *INCA* a été réalisé lors des visites de consultation ou en contactant le médecin traitant ou le cardiologue des patients. Les causes de décès ont été adjudiquées par au minimum deux investigateurs. La mortalité cardiaque est définie pour ce projet comme un décès d'origine cardiaque ou le recours à une assistance ou une transplantation cardiaque en urgence.

### 3.1.2. La population test (n=198 patients)

Dans le but d'identifier de nouveaux biomarqueurs et de développer des scores protéomiques pronostiques, nous avons conçu une étude cas/témoins nichée dans la cohorte *INCA* entre Novembre 1998 et Décembre 2005. Nous avons sélectionné 99 patients qui sont décédés de cause cardiovasculaire dans les 3 ans qui suivent leur entrée dans l'étude (cas). Ces patients ont été appariés individuellement (pour l'âge, le sexe, et l'étiologie de l'IC) avec 99 patients toujours vivants lors du suivi à 3 ans (témoins).

Les principales caractéristiques de la population test sont répertoriées dans le Tableau 12. Dans cette population, il y avait 91 paires d'hommes et 8 paires de femmes. Au total, 58 paires de patients étaient atteintes de cardiopathie ischémique. L'âge moyen était de 59 ans et 1/3 des patients étaient diabétiques.

**Tableau 12. Principales caractéristiques de la population test.**

	Décès Cardiovasculaire (n=99)	Pas de décès cardiovasculaire (n=99)	P value
Age (années)	58.6 ± 10.9	58.9 ± 10.6	na
Sexe masculin	91	91	na
Cause de l'IC			
Ischémique	58	58	na
Non ischémique	41	41	
Diabète	34	33	0.901
Classe NYHA			
1	1	8	
2	62	73	0.004
3	36	18	
FEVG (%)	27.8 ± 9.9	28.7 ± 9.2	0.490
Pic de VO <sub>2</sub> (ml/min/kg)	13.5 ± 3.7	17.2 ± 4.9	<0.0001
BNP*			
Bas	17	40	
Intermédiaire	43	33	0.002
Élevé	35	23	
Créatinine (mg/L)	12.5 ± 3.5	11 ± 2.6	0.0006
Traitement à inclusion			
IEC ou ARA2	92	92	1
β-bloquants	90	94	0.407
Diurétiques	87	77	0.06

\* Le BNP a été mesuré par une technique de radio-immuno-assay (Shionoria BNP kit, Shionogi & Co. Ltd., Osaka, Japan) entre 1998 et 2003 et par une technique de Triage BNP assay (Biosite diagnostics Inc., San Diego, CA, USA) entre 2003 et 2005. Le niveau de BNP a été défini comme bas (déciles 1, 2 and 3), intermédiaire (déciles 4,5, 6 and 7) ou élevé (déciles 8, 9 and 10) pour chaque individu de la population test.

na = non applicable.

Parmi les principaux marqueurs pronostiques, les patients cas (décédés de cause cardiovasculaire dans les 3 ans suivant l'inclusion) présentaient logiquement une classe NYHA plus élevée, un pic de VO<sub>2</sub> plus bas et un taux de BNP plus élevé que les patients témoins (vivants 3 ans après l'inclusion). La FEVG était plus basse chez les cas que chez les témoins mais cette différence n'était pas significative. Enfin, on notait un niveau de créatinine significativement plus élevé chez les cas. Sur le plan thérapeutique, les recommandations semblaient bien suivies et il n'y avait pas de différence significative sur les prescriptions d'IEC, β-bloquants et diurétiques. On notait néanmoins une tendance en faveur d'un recours plus fréquent au traitement diurétique chez les patients décédés de cause cardiovasculaire dans les 3 ans.

### **3.1.3. La population de validation (n=344 patients)**

La valeur pronostique des biomarqueurs et des scores protéomiques identifiés dans la population test sera confirmée dans une population de validation. Cette population comporte 344 patients consécutifs (différents de la population test) inclus dans la cohorte *INCA* entre janvier 2006 et mai 2010. Parmi ces 344 patients, 43 patients sont décédés de cause cardiovasculaire au cours des 3 ans de suivi. A noter que 35 patients décédés de cause non cardiovasculaire ont été exclus des analyses.

Les caractéristiques de la population de validation sont répertoriées dans le Tableau 13. Les 266 patients vivants à 3 ans ont été comparés aux 43 patients qui sont décédés de cause cardiovasculaire.

**Tableau 13. Principales caractéristiques de la population de validation.**

	Décès Cardiovasculaire (n=43)	Pas de décès cardiovasculaire (n=266)	p value
Age (années)	57 ± 12.6	54 ± 10.8	0.101
Sexe masculin	33	214	0.885
Cause de l'IC			
Ischémique	28	118	0.011
Non ischémique	15	148	
Diabète	14	66	0.282
Classe NYHA			
1	0	32	
2	25	211	0.0005
3	18	23	
FEVG (%)	28.4 ± 9	35 ± 9.1	<0.0001
Pic de VO <sub>2</sub> (ml/min/kg)	13 ± 3.4	18.7 ± 5.9	<0.0001
BNP (pg/mL)*	735 ± 757	238 ± 384	<0.0001
Créatinine (mg/L)	12.7 ± 4.9	11.1 ± 6.4	0.11
Traitement à inclusion			
IEC ou ARA2	43	258	0.605
β-bloquants	40	254	0.448
Diurétiques	40	195	0.005

\* Le BNP a été mesuré par la technique Advia Centaur BNP assay (Bayer Healthcare LLC, Tarrytown, NY, USA) pour tous les patients.

Les patients décédés de cause cardiovasculaire avaient logiquement une IC dont la cause était plus fréquemment ischémique, une classe NYHA plus élevée, une FEVG plus basse, un pic de VO<sub>2</sub> plus bas, et un taux de BNP plus élevé que les patients vivants à 3 ans. Ils recevaient plus souvent un traitement diurétique. Les patients, comme dans la population test, étaient traités selon les recommandations avec des taux de prescription d'IEC et de β-bloquants élevés dans les 2 groupes.

## **3.2. PARTIE 2 : Recherche de biomarqueurs pronostiques de l'IC systolique par approche de protéomique différentielle, Preuve de concept**

---

### **3.2.1. Introduction**

#### 3.2.1.1. Rationnel

La stratification du risque des patients atteints d'une IC systolique chronique est essentielle afin d'identifier ceux qui pourront bénéficier de stratégies invasives telles que la transplantation cardiaque. En dépit des avancées récentes, cette stratification nécessite d'être encore améliorée. En effet, certains patients caractérisés à faible risque vont décéder précocement ; et inversement, d'autres identifiés à haut risque auront une survie prolongée.

#### 3.2.1.2. Objectifs

Notre objectif était d'étudier la place d'une analyse protéomique différentielle du plasma par la technique SELDI-TOF-MS dans la stratification du risque des patients insuffisants cardiaques et de découvrir de nouveaux biomarqueurs circulants associés à la mortalité cardiovasculaire précoce de ces patients.

#### 3.2.1.3. Méthodes

Ce projet a été réalisé à l'aide de 2 populations : une population dite « test » et une dite « de validation », toutes les deux issues de la population *INCA* (FEVG <45%). Pour la phase test (population cas/témoins), nous avons sélectionné 198 patients: 99 patients décédés de cause cardiovasculaire dans les 3 ans suivant l'inclusion (cas) ont été comparés à 99 survivants à 3 ans appariés sur l'âge, le sexe et la cause de l'IC (témoins). Pour la phase de validation, nous avons évalué une cohorte de 344 patients consécutifs. Le critère dévaluation était la mortalité cardiovasculaire à 3 ans (cf. PARTIE 1).

Tous les patients avaient un prélèvement sanguin au moment de l'inclusion (évaluation pronostique initiale). Une analyse protéomique différentielle utilisant la technique SELDI-TOF-MS a ensuite été réalisée dans la population test sur des échantillons de plasma prélevés à l'inclusion. Les échantillons ont d'abord été prétraités par la technique CPLL permettant d'obtenir une compression dynamique de l'ensemble des protéines et d'analyser

les protéines minoritaires du plasma. Ces échantillons dits « égalisés » ont ensuite été analysés, après randomisation, en double en utilisant des puces CM10 (échange de cations) et H50 (hydrophobe).

#### 3.2.1.4. Résultats

Au total, parmi les 203 pic  $m/z$  détectés par le SELDI-TOF-MS dans la population test, 42 pics  $m/z$  étaient significativement différentiellement abondants entre les cas et les témoins et ont été utilisés pour développer des scores protéomiques prédicteurs de la mortalité cardiovasculaire à l'aide de 3 méthodes statistiques de régression : machine à vecteur de support, régression des moindres carrés partiels et régression logistique de Lasso.

Les scores protéomiques ont ensuite été testés dans la population de validation et étaient significativement plus élevés chez les patients qui vont décéder dans les 3 ans, et ce avec les 3 méthodes statistiques de manière consistante. Les aires sous la courbe ROC (prédiction de la mortalité cardiovasculaire à 3 ans dans la population de validation) étaient comprises entre 0,66 et 0,68 pour les 3 méthodes. Ces scores protéomiques persistaient très significativement associés à la mortalité cardiovasculaire après ajustement sur les facteurs confondants en analyse multivariée (âge, sexe, diabète, cause de la cardiopathie, classe NYHA, FEVG, BNP, créatinine, pic de  $VO_2$ ). De plus, l'utilisation de ces scores permettait une amélioration significative de la discrimination des patients par rapport à une évaluation pronostique classique selon les index suivants : IDI et NRI.

### **3.2.2. Article : Multimarker Proteomic Profiling For The Prediction Of Cardiovascular Mortality In Patients With Chronic Heart Failure**

Article sous presse dans la revue PlosOne.

### **3.2.3. Conclusion**

Une analyse protéomique différentielle des protéines minoritaires du plasma semble améliorer la stratification du risque de mortalité cardiovasculaire précoce chez les patients atteints d'une IC systolique chronique.

## **3.3. PARTIE 3 : Purification et identification des pics $m/z$ d'intérêt, Impact des Apolipoprotéines**

---

### **3.3.1. Généralités**

La technique SELDI-TOF-MS est relativement lourde et ne débouchera vraisemblablement pas sur une utilisation large en pratique clinique quotidienne dans les prochaines années. De ce fait, même si cette technique nous a permis de montrer pour la première fois que l'étude du « *deep proteome* » permettait d'améliorer la stratification des patients atteints d'une IC systolique (preuve de concept), la sélection d'un ou quelques pics  $m/z$  ne peut donc pas suffire en soit à l'heure actuelle pour passer à une utilisation large en clinique. L'étape d'identification des protéines correspondant aux pics  $m/z$  est donc cruciale.

Toutefois, comme déjà mentionné, la principale limite de la technique SELDI-TOF-MS est que l'identification des protéines correspondant aux différents pics  $m/z$  nécessite une étape supplémentaire. Cette étape, détaillée ci-dessous, peut s'avérer extrêmement complexe et l'identification d'un seul pic  $m/z$  peut prendre plusieurs mois ou n'être jamais réalisable.<sup>272</sup> Pour cette raison, il était bien sûr impossible d'envisager la purification et l'identification des 42 pics  $m/z$  retrouvés différentiellement intenses entre les cas et les témoins dans la population test.

### **3.3.2. La stratégie de sélection des pics $m/z$ à identifier en priorité**

Compte tenu de la difficulté pour identifier les pics  $m/z$  obtenus après SELDI-TOF-MS et du nombre relativement important de pics  $m/z$  différentiellement intenses entre les cas et les témoins dans la population test, il a fallu décider d'une stratégie globale pour sélectionner les pics  $m/z$  à identifier en priorité. La sélection des pics  $m/z$  à identifier en priorité a été basée sur 2 critères principaux : l'intérêt clinique potentiel d'une part et la faisabilité présumée d'autre part.

#### **3.3.2.1. Intérêt clinique**

Encore une fois, notre objectif était de découvrir un biomarqueur avec une valeur pronostique intéressante et additionnelle par rapport aux critères déjà connus dans la littérature. Le premier critère de choix a donc été de sélectionner les pics  $m/z$

différentiellement intenses entre les patients décédés et les patients survivants dans les 2 populations (test et validation). Ainsi, parmi les 203 pics  $m/z$  détectés et analysés, seuls 13 pics étaient différentiellement intenses ( $p < 0,05$ ) dans la population test et dans la population de validation. La liste de ces 13 pics  $m/z$  est la suivante : pic 12770 CM10-BM, pic 14511 CM10-BM, pic 29024 CM10-BM, pic 3267 H50-BM, pic 4679 H50-BM, pic 6416 H50-BM, pic 6616 H50-BM, pic 6825 H50-BM, pic 8764 H50-BM, pic 9421 H50-BM, pic 23922 H50-HM, pic 24017 H50-HM, pic 35840 H50-HM.

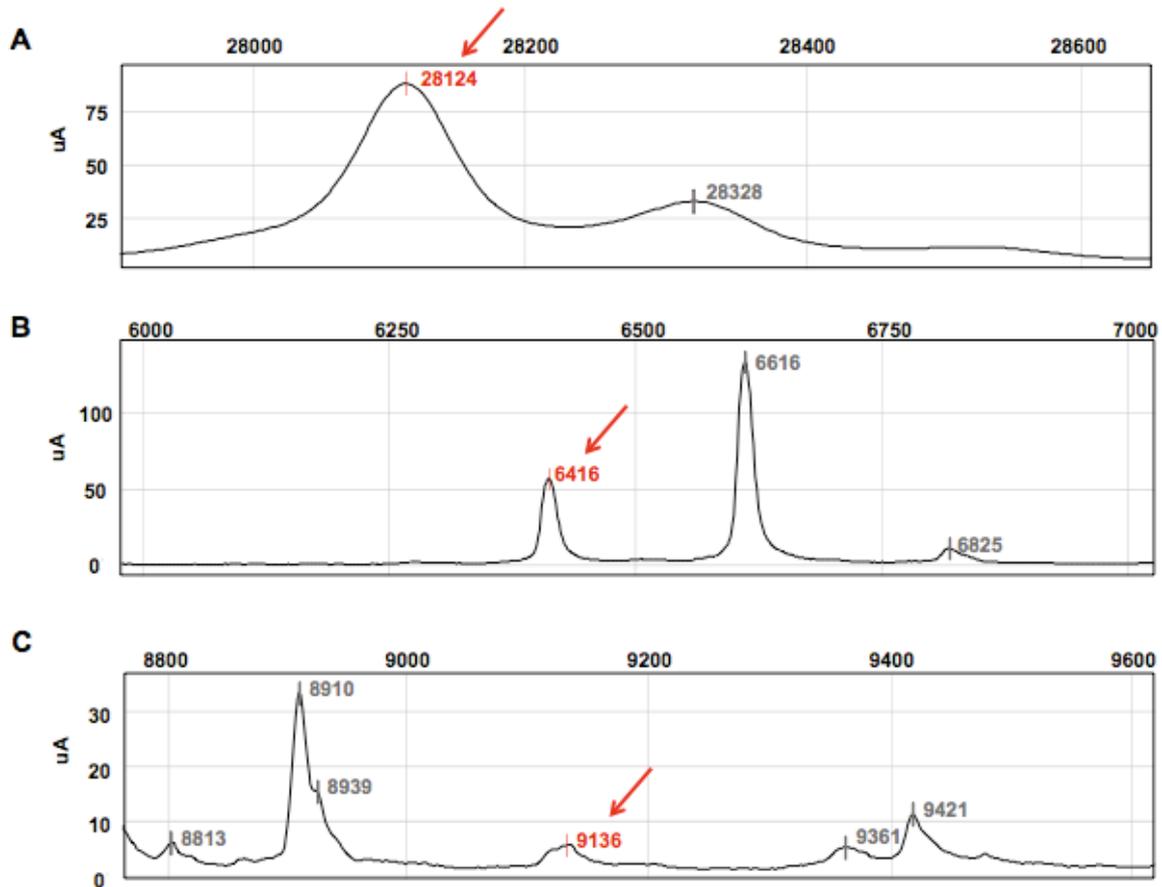
### 3.3.2.2. La faisabilité présumée de l'identification

Notre équipe a maintenant une certaine expérience dans l'évaluation du degré de difficulté de l'identification d'un pic  $m/z$  donné.<sup>272</sup> En effet, en fonction de la masse prédite du pic (difficultés pour les poids moléculaires extrêmes  $< 3$  kDa ou  $> 120$  kDa), de l'intensité du pic, de la présence de nombreux pics de même intensité autour du pic d'intérêt, de la notion de pics « virtuels », et du bruit de fond, il est possible de prédire, au moins en partie, les chances de succès d'une identification.

Nous avons donc analysé séparément les 13 pics  $m/z$  différentiellement intenses entre les patients décédés et les patients survivants dans les 2 populations (test et validation) pour les classer en 3 niveaux de difficulté : probabilité élevée, probabilité intermédiaire et probabilité faible de succès. L'ensemble des 13 pics  $m/z$  est réparti dans le Tableau 14 selon le niveau de difficulté présumée. Un exemple de chaque niveau de difficulté est montré sur la Figure 21.

**Tableau 14. Classement des 13 pics  $m/z$  différentiellement intenses entre les patients décédés et les survivants dans les deux populations en fonction de la probabilité de succès de leur identification.**

Probabilité	élevée	intermédiaire	faible
	6616 H50-BM	6416 H50-BM	3267 H50-BM
	29024 CM10-BM	8764 H50-BM	4679 H50-BM
		9421 H50-BM	6825 H50-BM
		35840 H50-HM	12770 CM10-BM
			14511 CM10-BM
			23922 H50-HM
			24017 H50-HM



**Figure 21.** Exemple des 3 niveaux de difficulté présumée de l'identification d'un pic  $m/z$  donné. A : probabilité de succès élevée pour le pic 28124 H50-BM. B : probabilité intermédiaire pour le pic 6416 H50-BM. C : probabilité faible pour le pic 9136 CM10-BM.

### 3.3.3. Le principe général

#### 3.3.3.1. Généralités

Il existe plusieurs étapes dans le processus de purification et d'identification d'un pic  $m/z$  donné :

- le choix d'un échantillon adéquat contenant le pic d'intérêt avec une intensité suffisante à partir d'une base de données SELDI-TOF-MS
- le choix du processus de purification lorsqu'il est nécessaire
- la séparation des protéines par électrophorèse
- l'excision de la bande d'intérêt pour identification après digestion trypsique
- l'identification par spectrométrie de masse
- la validation de la protéine identifiée par IP

Nous allons dans ce paragraphe revenir sur les différentes étapes en prenant l'exemple du pic  $m/z$  29024 CM10-BM. La probabilité de succès de l'identification de ce pic a été évaluée comme élevée par notre équipe et ce pic était significativement différentiellement intense entre les patients décédés et les patients survivants dans les 2 populations.

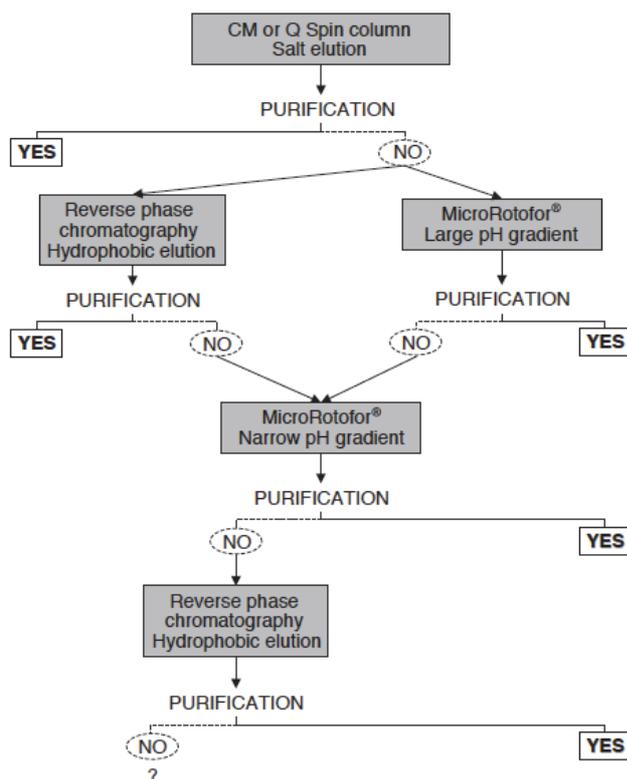
#### 3.3.3.2. La banque d'échantillons

Nous disposons, au sein de notre équipe, d'une banque d'échantillons plasmatiques pour le processus de purification et d'identification des pics  $m/z$ . Nous avons ainsi accès à une base de données répertoriant l'ensemble des pics  $m/z$  détectés dans différentes conditions (plasma brut ou égalisé, différents types de puces, ...). Cette base permet d'initier le processus de purification et d'identification à partir d'un échantillon dans lequel le pic d'intérêt est non seulement présent mais aussi suffisamment intense. L'objectif est bien entendu de faciliter les étapes suivantes mais aussi de ne pas consommer les échantillons des populations initiales qui seront nécessaires pour d'éventuels nouveaux projets de recherche. Dans le cas du pic  $m/z$  29024 CM10-BM, nous avons utilisé l'échantillon MR15.

#### 3.3.3.3. Etapes de purification

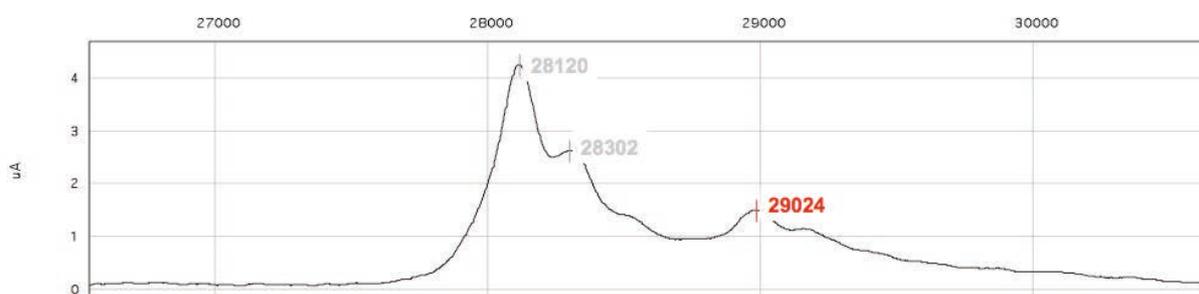
Cette étape n'est pas obligatoire mais très souvent nécessaire. Dans l'hypothèse où le pic à identifier serait très intense et non entouré de façon proche par d'autres pics d'intensité similaire, il serait alors possible de sursoir à cette étape.

Le plus souvent, un fractionnement de l'échantillon est néanmoins nécessaire pour tenter de séparer les protéines de poids moléculaires proches et de faciliter le repérage de la bande d'intérêt sur le gel d'électrophorèse et donc l'identification de la protéine d'intérêt. Ce fractionnement peut être réalisé soit à l'aide de colonnes de chromatographie (Kit Proteinchip® CM ou Q *spin columns*) qui sépare les protéines en fonction de leur charge nette en fonction du pH soit à l'aide de la technique de l'IEF en phase liquide (Kit Microrotofor®) qui permet une séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique grâce à un gradient de pH en phase liquide. Chacune de ces deux techniques peut être combiné avec une chromatographie en phase inverse si nécessaire. La stratégie globale de purification des pics  $m/z$  utilisée au sein de notre équipe est reprise dans la Figure 22.<sup>272</sup> Malgré les différentes techniques, cette étape peut s'avérer très complexe voire impossible.



**Figure 22. Stratégie de purification des pics  $m/z$  utilisée au sein de notre équipe. Adapté de Fertin et al.<sup>272</sup>**

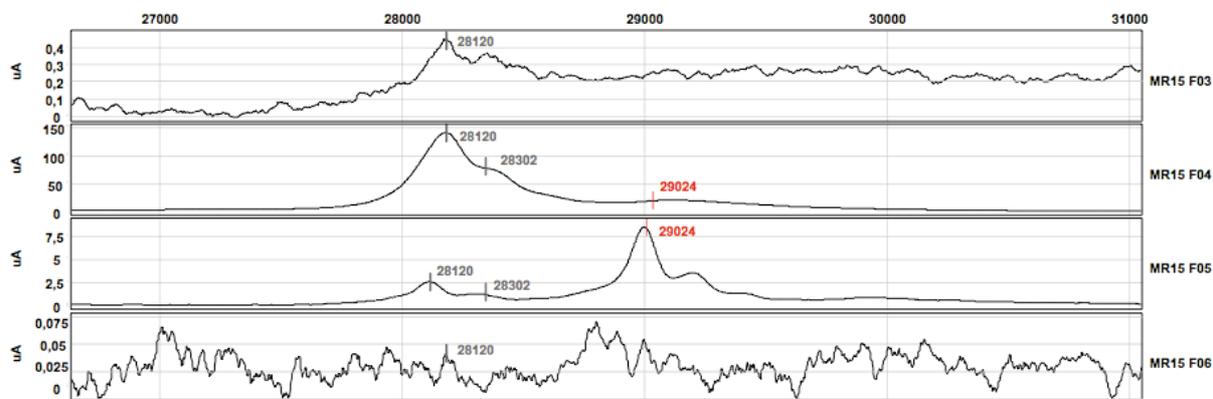
Dans le cas du pic  $m/z$  29024 CM10-BM, comme montré sur la Figure 23, il existe un cluster de pics  $m/z$  28120-28302 intenses et relativement proches, raison pour laquelle nous avons décidé de procéder à une phase de purification par IEF en phase liquide à l'aide du kit Microrotofor® avec un gradient de pH large 3-10.



**Figure 23. Exemple du pic  $m/z$  29024 CM10-BM. Présence d'un cluster de pics relativement proches et intenses.**

Cette étape a permis de séparer les pics : le pic  $m/z$  29024 CM10-BM se retrouvant majoritairement dans la fraction F5 du Microrotofor® et le cluster de pics  $m/z$  28120-28302 majoritairement dans une autre fraction, la fraction F4. La Figure 24 montre les fractions F3,

F4, F5 et F6 obtenues à partir de l'échantillon MR15 après Microrotofor® correspondant aux pH respectifs.



**Figure 24. Purification du pic  $m/z$  29024 CM10-BM.**

Après obtention d'une purification satisfaisante du pic d'intérêt par Microrotofor®, les protéines sont séparées par électrophorèse 1D. Le pourcentage d'acrylamide dans le gel de migration dépend de la masse moléculaire attendue de la protéine cible. Dans le cadre du pic 29024 CM10-BM, nous avons choisi un gel à 15%.

Le repérage des bandes se fait ensuite par une coloration qui doit être compatible avec les étapes de spectrométrie de masse. Dans notre travail, nous avons utilisé une coloration au bleu de Coomassie.<sup>307</sup>

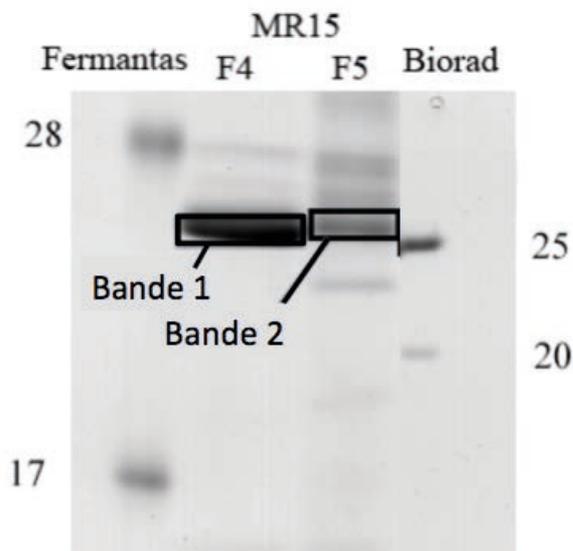
Le choix de la bande d'intérêt à exciser (correspondant au pic d'intérêt) est parfois complexe. Il s'agit en effet de repérer la bande qui correspond effectivement au pic identifié préalablement. Pour ce faire, plusieurs éléments peuvent nous aider :

- l'utilisation de marqueurs de taille de marques différentes pour mieux se repérer,
- la comparaison du profil des pics  $m/z$  obtenus en SELDI-TOF-MS et du profil des bandes sur le gel,
- la migration d'un ou plusieurs autres échantillons avec des pics  $m/z$  facilement repérables à côté de l'échantillon cible.

Il faut néanmoins savoir que la fiabilité et la précision des marqueurs de taille ne sont que relatives et que la comparaison entre le profil des pics et le profil des bandes reste, à ce jour, l'étape déterminante dans le choix de la bande à exciser. Il est par ailleurs parfois nécessaire de procéder à l'éluion passive d'une bande proche de la bande d'intérêt pour

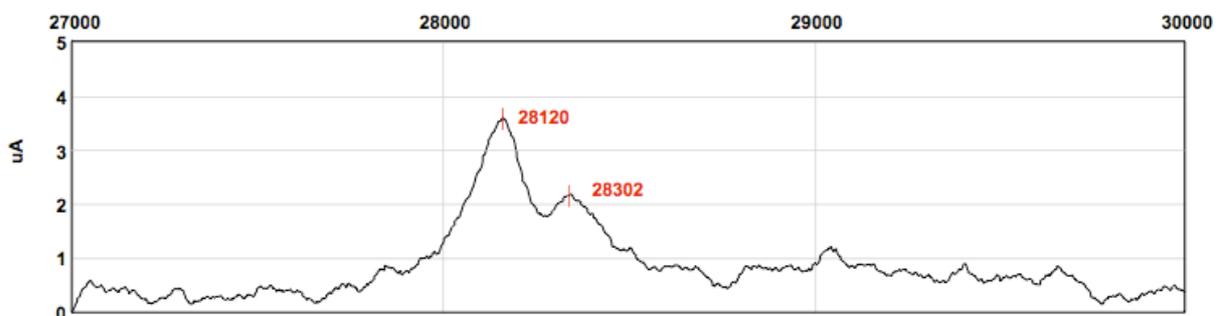
l'analyser en SELDI-TOF-MS afin de comparer la taille du pic de cette bande éluée à celle de la bande d'intérêt.

La Figure 25 montre l'exemple de la bande excisée correspondant au pic  $m/z$  29024 CM10-BM. Pour ce pic, nous avons donc utilisé les fractions F5 (contenant le pic d'intérêt) et F4 (contenant le cluster des pics 28120-28302 intenses et proches) obtenues après étape de purification par Microrotofor® de l'échantillon MR15. Ceci nous a permis d'avoir un repère simple sur le gel. Nous avons excisé 2 bandes : dans la fraction F4, la bande 1 correspondant à priori au cluster des pics 28120-28320, et dans la fraction F5, la bande 2 correspondant à priori au pic  $m/z$  29024 CM10-BM.



**Figure 25.** Gel d'électrophorèse des fractions F4 et F5 de l'échantillon MR15. Les bandes excisées sont annotées.

Pour valider que la bande 1 correspondait effectivement au cluster des pics  $m/z$  28120-28302, elle a été éluée passivement et analysée en SELDI-TOF-MS. L'analyse SELDI-TOF-MS montre que la bande 1 correspond effectivement au cluster des pics  $m/z$  28120-28302 de la fraction F4 de la purification par Microrotofor® (Figure 26).



**Figure 26.** Analyse SELDI-TOF-MS de l'éluât de la bande 1.

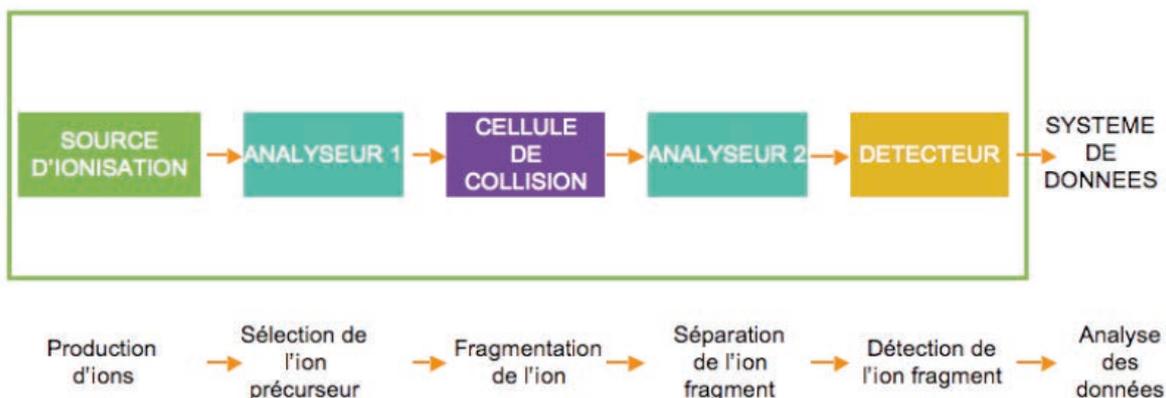
En conséquence, la bande 2 excisée correspondrait bien au pic  $m/z$  29024 CM10-BM et a été utilisée pour l'identification de la protéine.

#### 3.3.3.4. Identification par spectrométrie de masse

La digestion trypsique hydrolyse les protéines au niveau des lysines et des arginines générant ainsi des peptides courts et réguliers analysables en spectrométrie de masse. Par ailleurs, comme déjà mentionné, ces peptides sont répertoriés dans les bases de données sur internet permettant l'identification des protéines.

Après digestion trypsique, les peptides obtenus doivent être identifiés par spectrométrie de masse (technique détaillée précédemment). La technique MALDI-TOF-MS souffre néanmoins d'un certain nombre de limites et les résultats obtenus à partir de l'empreinte peptidique sont parfois ambigus ; en effet, seulement 60% des protéines d'un échantillon peuvent effectivement être identifiées avec succès, notamment dans le contexte de mélanges protéiques.<sup>164</sup>

Pour identifier la protéine, il est possible d'optimiser la technique en utilisant un spectromètre de masse en mode tandem (MALDI-TOF/TOF ou MS/MS). La première étape de cette technique est identique à celle d'un MALDI-TOF-MS standard. Une deuxième étape de fragmentation est ensuite réalisée. Pour cette deuxième étape, chaque peptide détecté par le premier détecteur est alors fragmenté dans une chambre de collision à l'aide d'un gaz neutre (type argon). Les ions dits « fils » ainsi générés sont ensuite analysés dans un second détecteur. Ensuite, une analyse est réalisée et permet le calcul de la différence de masse entre 2 ions de la même série et donc d'en déduire des éléments de la séquence en acides aminés des peptides. Cette étape permet d'améliorer les chances d'identification. Le principe du MALDI-TOF/TOF est représenté sur la Figure 27.



**Figure 27. Principe d'un spectromètre de masse en mode tandem.**

Il est également possible de réaliser une étape préalable de chromatographie (nanoLC) afin d'optimiser encore plus la technique notamment en présence de mélanges protéiques complexes.<sup>164</sup>

Dans notre travail, nous avons utilisé un système UltiMate nanoLC Dionex couplé à un Ultraflex MALDI-TOF/TOF-MS Bruckers Daltonics pour procéder aux identifications des protéines correspondant aux pics purifiés.

Dans le cadre du pic 29024 CM10-BM, bien que 12 protéines aient été suggérées en implémentant la liste des peptides obtenus après l'étape de spectrométrie de masse dans le logiciel *Matrix Science MASCOT MS/MS Ion Search* et en utilisant la base de données *UniProtKB/SwissProt*, seules 7 avaient un score de probabilité jugé significatif >26 (Tableau 15).

**Tableau 15. Liste des 7 protéines avec un score de probabilité >26 après implémentation de la liste des peptides dans le logiciel *Matrix Science MASCOT MS/MS Ion Search*.**

Nom	Poids moléculaire théorique	Nombre de peptides ayant permis l'identification	Pourcentage de recouvrement	Score
Apo A1	30759 Da	12	44	688
CRP	25194 Da	7	25	190
Ig Kappa chain C	11773 Da	2	32	101
Serum paraoxonase / arylerase 1	39895 Da	1	4	72
Clusterine	53031 Da	1	3	66
Ig Kappa chain V-I region	12099 Da	1	14	37
Ceruloplasmine	122983 Da	1	1	37

Une seule avait un score très significatif de 688 (pourcentage de recouvrement de 44%) : l'apolipoprotéine A1 (Apo A1). La répartition des peptides identifiés par spectrométrie de masse sur la séquence de l'Apo A1 est représentée sur la Figure 28.

1 MKA AVLTLAV LFLTGSQARH FWQQDEPPQS PWDRVKDLAT VYVDVLKDSG  
51 RDYVSQFEQS ALGKQLNLKL LDNWDSTST FSKLREQLGP VTQEFWDNLE  
101 KETEGLRQEM SKDLEEVKAK VQPYLDDFQK KWQEEMELYSR QKVEPLRAEL  
151 QEGARQKLHE LQEKLSPLGE EMRDARAHV DALRTHLAPY SDELRLAA  
201 RLEALKENGG ARLAEYHAKA TEHLSTLSEK AKPALEDLRQ GLLPVLESFK  
251 VSFLSALEEY TKKLNTQ

**Figure 28. Répartition des peptides identifiés (en rouge) par spectrométrie de masse sur la séquence de l'Apo A1.**

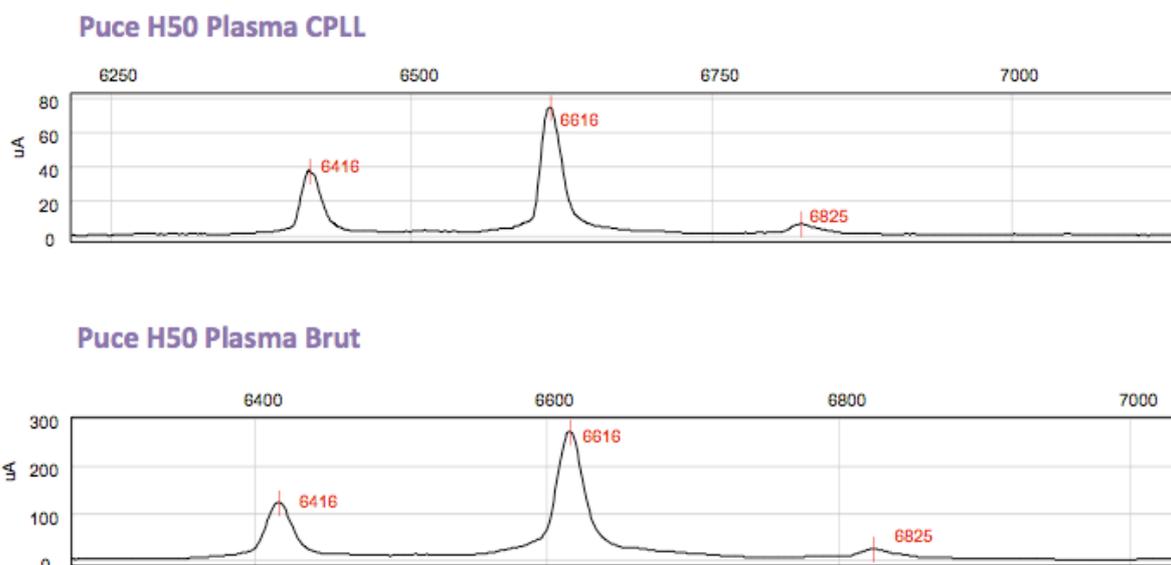
L'identification du pic  $m/z$  29024 CM10-BM a donc été possible grâce aux techniques habituellement utilisées au sein de notre laboratoire. Toutefois, d'autres pics ont été plus difficiles à identifier et certains ne pourront probablement jamais l'être.

### 3.3.4. Validation de l'identification

Il est ensuite nécessaire de valider que la protéine identifiée correspond effectivement au pic  $m/z$  d'intérêt. Il est donc nécessaire d'effectuer une étape d'IP, en utilisant un anticorps spécifique de la protéine en question, afin de s'assurer de la disparition du pic une fois l'échantillon dépleté de cette protéine. L'échantillon ayant servi à l'identification est donc analysé en SELDI-TOF-MS après IP de la protéine.

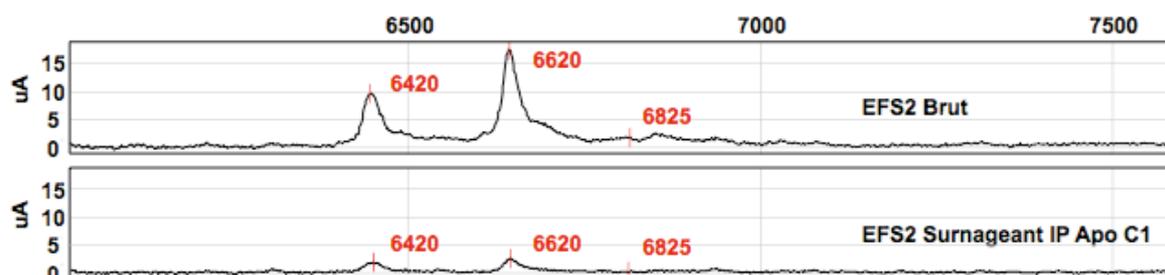
Dans notre travail, nous avons utilisé des échantillons de plasma équalisés afin d'avoir accès au « *deep proteome* ». Toutefois, cette technique s'est révélée être une source de difficultés supplémentaires au moment de la validation des résultats par IP. En effet, l'acidité importante des échantillons de plasma équalisés ( $pH \approx 3$ ) empêche le fonctionnement normal des anticorps pour reconnaître leur antigène et a rendu impossible cette étape de validation. Malgré les différentes tentatives pour tenter de tamponner l'acidité, cette étape n'a pas pu être réalisée sur les échantillons de plasma équalisés.

Dans ces conditions, nous avons donc ré-analysé l'ensemble des profils SELDI-TOF-MS des échantillons de plasma équalisés afin de les comparer aux échantillons de plasma non équalisés (ou bruts). L'objectif était de tenter de mettre en évidence des pics  $m/z$  d'intérêt communs sur les deux types d'échantillons. La Figure 29 montre l'exemple du cluster des pics 6000 présents sur les deux types d'échantillons mais en plus grande proportion dans le plasma brut. Le profil obtenu permet d'utiliser un échantillon de plasma brut pour l'IP de la protéine d'intérêt avec un anticorps spécifique.



**Figure 29.** Cluster des pics 6000 dans un échantillon de plasma égalisé (spectre du haut) et dans un échantillon de plasma brut (spectre du bas).

Le plasma brut ne pose pas de problème d'acidité. La mise en évidence de pics  $m/z$  communs sur les deux types d'échantillons rendait ainsi possible la réalisation de l'étape de confirmation par IP comme montré sur la Figure 30. Le cluster des pics  $m/z$  6000 a été identifié comme étant de l'Apo C1. La réalisation d'une étape d'IP avec des anticorps spécifiques de cette protéine a permis de dépleted l'échantillon de ces pics validant ainsi l'identification.



**Figure 30.** Profils SELDI-TOF-MS d'un échantillon de plasma brut et d'un échantillon immunoprécipité avec un anticorps spécifique de l'Apo C1.

Dans l'éventualité où le pic d'intérêt retrouvé et identifié à partir des échantillons de plasma égalisés ne serait pas retrouvé sur les échantillons de plasma bruts, il pourrait alors se discuter d'envisager une autre solution et notamment d'ajouter aux échantillons de plasma égalisés de la protéine identifiée « pure » afin de voir si le pic  $m/z$  d'intérêt serait augmenté

de manière significative. Nous n'avons pas jusqu'alors eu recours à cette technique pour les pics  $m/z$  que nous avons réussi à identifier.

### 3.3.5. Purification et identification des pics $m/z$ sélectionnés : place des Apolipoprotéines

Parmi les 13 pics  $m/z$  significativement différentiellement intenses entre les patients décédés et les survivants dans les 2 populations, nous avons pu identifier 8 pics  $m/z$ . La liste de ces pics est répertoriée ci-dessous et les identifications réalisées sont en accord avec les données de la littérature.<sup>308-316</sup> En effet, l'analyse de la littérature peut s'avérer d'une aide considérable pour l'identification de certains pics  $m/z$ . Dans notre projet, cela a notamment été le cas pour plusieurs pics  $m/z$ .

Actuellement, nous avons pu identifier 3 Apos et plusieurs polymorphismes fonctionnels différents de ces Apos : 14511 CM10-BM (Apo A1), 29024 CM10-BM (Apo A1), 3267 H50-BM (Apo C1), 6416 H50-BM (Apo C1), 6616 H50-BM (Apo C1), 6825 H50-BM (Apo C1), 8764 H50-BM (Apo C3), 9421 H50-BM (Apo C3). Le Tableau 16 reprend la liste des protéines identifiées à partir de ces pics  $m/z$ . Les pics 14511 CM10-BM, 3267 H50-BM et 6825 H50-BM sont des pics virtuels correspondant soit à une protéine dichargée lors de l'excitation par le laser soit à une protéine sur laquelle s'est fixé un morceau de matrice. Les pics 6616 H50-BM et 6416 H50-BM correspondent à 2 polymorphismes fonctionnels de l'Apo C1 : le pic 6616 étant l'Apo C1 totale et le pic 6416 étant l'Apo C1 tronquée de 2 acides aminés en position N-terminale. Enfin, les pics 8764 H50-BM et 9421 H50-BM correspondent à 2 polymorphismes fonctionnels de l'Apo C3 : le pic 9421 H50-BM étant de l'Apo C3 avec un groupe sialique (variant glyqué).

**Tableau 16. Liste des protéines identifiées.**

Pic $m/z$	Puce	Accession number	Nom de la protéine	Validation
14511	CM10-BM	P02647	Apo A1 (pic dichargé)	Littérature
29024	CM10-BM	P02647	Apo A1	Littérature
3267	H50-BM	P02654	Apo C1 (pic dichargé)	Littérature et IP
6416	H50-BM	P02654	Apo C1 des Thr-Pro N-term	Littérature et IP
6616	H50-BM	P02654	Apo C1	Littérature et IP
6825	H50-BM	P02654	Apo C1 (adjonction de matrice)	Littérature et IP
8764	H50-BM	PF05778	Apo C3 a-sialylated	Littérature
9421	H50-BM	PF05778	Apo C3 mono-sialylated	Littérature

L'étape suivante va être de quantifier, dans les échantillons de la population *INCA*, les différentes protéines identifiées à l'aide d'outils spécifiques tels que la technique ELISA, Multiplex ou la spectrométrie de masse quantitative. L'objectif reste bien sûr de pouvoir transposer ces résultats à la pratique clinique quotidienne. Les principaux avantages et les inconvénients de chacune de ces techniques sont repris dans le Tableau 17.

**Tableau 17. Avantages et inconvénients des techniques de dosage spécifique.**

Technique	Avantages	Inconvénients
ELISA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Spécificité</li> <li>- Transposition à la pratique clinique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dosage des apolipoprotéines une par une</li> <li>- Absence d'évaluation des clivages protéiques</li> <li>- Volume d'échantillon plus important</li> </ul>
Multiplex	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Spécificité</li> <li>- Faible volume échantillon</li> <li>- Dosage simultané de plusieurs protéines</li> <li>- Transposition à la pratique clinique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Absence d'évaluation des clivages protéiques</li> <li>- Dosage de toutes les apolipoprotéines impossible de manière simultanée (absence de kit sur le marché)</li> </ul>
Spectrométrie de masse quantitative	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Spécificité</li> <li>- Analyse des clivages et fragments protéiques</li> <li>- Faible volume échantillon</li> <li>- Dosage simultané de multiples protéines et notamment de toutes les Apos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lourdeur et coût</li> <li>- Difficulté de transposition à la pratique clinique quotidienne</li> </ul>

Comme mentionné ci-dessus, les identifications protéiques ont permis de mettre en exergue plusieurs Apos différentes ainsi que plusieurs polymorphismes fonctionnels différents de ces Apos. En conséquence, nous avons jugé qu'il pourrait s'avérer très intéressant de pouvoir obtenir un phénotype complet des Apos des patients de la population *INCA*. Bien que moins facilement transposable à la pratique clinique quotidienne, notre choix s'est donc porté sur une technique de spectrométrie de masse quantitative (*mass reaction monitoring*) permettant le dosage simultané de 16 Apos différentes à partir d'une faible quantité d'échantillon (40 µL).<sup>317-319</sup> Les Apos suivantes vont ainsi être dosées dans la population *INCA* : Apo A1, Apo A2, Apo A4, Apo B100, Apo C1, Apo C2, Apo C3, Apo C4, Apo D, Apo E, Apo F, Apo H (ou β2 glycoprotéine 1), Apo L1, Apo M, Apo Lp(a) et l'Apo J (ou clusterine). Les résultats de ces dosages réalisés en collaboration avec une équipe de recherche au Canada sont prévus mi-avril 2015.

## **4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

## 4.1. Les atouts de la population *INCA*

---

En comparaison des publications antérieures, il faut souligner que la population *INCA* présente plusieurs originalités.

Tout d'abord, cette population intéresse des patients particulièrement jeunes (moyenne d'âge d'environ 55 ans). En pratique clinique, la décision d'une stratégie thérapeutique lourde type assistance ou transplantation cardiaque est tout à fait primordiale pour cette catégorie de patients. Une évaluation fine du pronostic à moyen terme (3 ans ici) de ces patients est donc d'autant plus importante. Le choix de cette période de suivi est également primordial dans le cadre de notre projet. En effet, l'objectif était de pouvoir prédire la mortalité à moyen terme dans l'objectif toujours de transposer nos résultats à la réalité clinique et notamment au contexte de la difficulté de sélectionner les patients pour une stratégie invasive. Dans ce cadre, un suivi trop court n'aurait pas permis de recueillir suffisamment d'évènements (décès cardiovasculaire ici) pour les analyses statistiques. A l'inverse, un suivi beaucoup plus long aurait perdu de son intérêt clinique pour notre objectif précis.

Par ailleurs, il est tout à fait intéressant de voir que les patients de cette population sont traités de manière optimale sur le plan pharmacologique, en accord avec les recommandations actuelles de l'ESC, pour leur IC systolique. Notamment, l'utilisation des  $\beta$ -bloquants et des IEC/ARA2 était importante et similaire chez les patients décédés au cours du suivi et chez les patients survivants. Ce point est tout à fait essentiel. En effet, certains biomarqueurs peuvent être modifiés par les traitements pharmacologiques reçus par un patient donné.<sup>237</sup> Notre objectif était de pouvoir mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs pronostiques indépendants des traitements reçus par le patient.

Enfin, nous avons porté une attention toute particulière à l'obtention d'un phénotype précis des patients inclus dans cette étude sur le plan de leur IC. Ce point est primordial dans l'objectif d'évaluer la valeur ajoutée d'un nouveau biomarqueur par rapport aux paramètres pronostiques déjà connus dans la littérature et utilisés en pratique clinique quotidienne.

## 4.2. Le bilan pronostique de l'IC systolique : place des scores protéomiques

---

Comme nous avons pu le voir en introduction, l'évaluation du pronostic des patients atteints d'une IC systolique chronique est un point majeur de leur prise en charge, notamment lorsqu'il s'agit de discuter la place des stratégies thérapeutiques invasives telles que l'assistance ou la transplantation cardiaque. Nous avons également pu voir que l'évaluation pronostique de ces patients reste aujourd'hui perfectible. En effet, certains patients considérés à faible risque vont en pratique avoir une évolution défavorable, et d'autres patients évalués à haut risque auront de manière surprenante une survie très prolongée. De plus, certains paramètres pronostiques puissants, comme ceux de l'épreuve d'effort métabolique par exemple, ne sont pas toujours disponibles en pratique clinique car rarement réalisés au quotidien.

Dans ce contexte, il existe donc un besoin important de nouveaux indicateurs pronostiques. Idéalement, il devrait s'agir de marqueurs non invasifs, facilement disponibles, non opérateur dépendants, et relativement peu coûteux. Les biomarqueurs circulants correspondent à ce « cahier des charges ».

L'objectif de notre étude était de démontrer qu'une analyse protéomique différentielle sans a priori du « *deep proteome* » plasmatique, en utilisant la technique SELDI-TOF-MS, permettrait de découvrir de nouveaux biomarqueurs pronostiques circulants et d'améliorer la stratification du risque des patients atteints d'une IC systolique chronique. Dans le passé, la technique SELDI-TOF-MS a déjà montré qu'elle pouvait apporter une information pronostique intéressante dans plusieurs pathologies notamment dans le domaine de la cancérologie.<sup>320,321</sup> Dans notre étude, nous avons pu montrer pour la première fois que ce type d'approche pouvait améliorer de manière très significative la stratification du risque des patients atteints d'une IC systolique chronique. Ainsi, nous avons notamment montré que la construction de scores protéomiques à partir de 42 pics  $m/z$  différenciellement intenses dans une population test permettait d'apporter une information indépendante et additionnelle par rapport à une évaluation pronostique « classique » (âge, sexe, diabète, cause de la cardiopathie, classe NYHA, FEVG, BNP, créatinine, pic de  $VO_2$ ) dans une population de validation. De plus, l'utilisation de ces scores protéomiques permettait de reclasser un nombre significatif de patients (décédés/survivants) comme le montrent les résultats des analyses de reclassification (IDI et NRI).

Nos résultats suggèrent donc que le concept, qu'une approche multi marqueurs à partir d'une analyse du « *deep proteome* » plasmatique puisse améliorer l'évaluation pronostique des patients atteints d'une IC systolique, est bien valide. Il faut néanmoins admettre que la technique SELDI-TOF-MS est une technique relativement lourde et qu'elle ne pourra vraisemblablement pas être utilisée dans le futur en pratique clinique quotidienne. Toutefois, il faut également mettre en exergue que de nouvelles technologies d'analyse protéomique en cours de développement permettront peut être un accès plus facile au protéome plasmatique dans l'avenir.<sup>273,274</sup> En attendant, l'identification de la protéine correspondant aux pics  $m/z$  d'intérêt reste une étape cruciale pour envisager un passage à la pratique clinique quotidienne de ces biomarqueurs.

### **4.3. Purification et identification des pics $m/z$ SELDI-TOF-MS d'intérêt – Limites et difficultés**

---

Une des limites de la technique SELDI-TOF-MS est que l'identification des protéines correspondant aux différents pics  $m/z$  nécessite une étape supplémentaire de spectrométrie de masse. Cette étape peut s'avérer extrêmement complexe et l'identification d'un seul pic  $m/z$  peut prendre plusieurs mois ou n'être jamais réalisable.<sup>272</sup> Dans ce paragraphe, nous allons revenir sur les principales limites et difficultés qui peuvent être rencontrées au cours de cette étape d'identification.

#### **4.3.1. Le choix de la bande à exciser sur le gel d'électrophorèse**

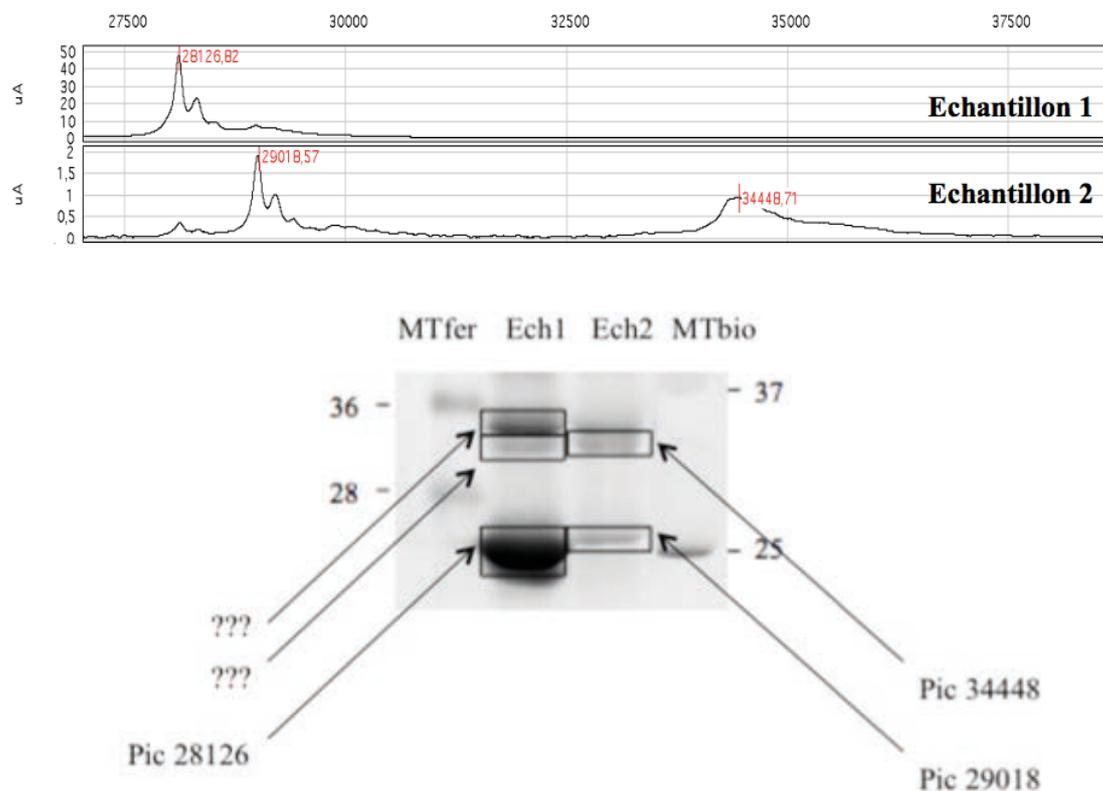
Nous avons pu voir avec le pic  $m/z$  29024 CM10-BM que les marqueurs de taille ne sont pas toujours fiables et les étapes de purification et d'analyse en SELDI-TOF-MS de l'éluât d'une bande proche de la bande d'intérêt sont donc d'une aide importante. Comme déjà mentionné, la comparaison du profil des pics en SELDI-TOF-MS et du profil des bandes sur le gel est également importante pour guider le choix de la bande à exciser.

Toutefois, un certain nombre de limites doivent être connues et peuvent rendre difficile le repérage de la bande à exciser.

- Premièrement, il faut savoir que la technique SELDI-TOF-MS est extrêmement sensible et qu'un pic détecté en SELDI-TOF-MS mais de très faible intensité peut ne pas être

visualisé sur le gel avec une coloration standard au bleu de Coomassie dont la sensibilité est de l'ordre de 100 ng.<sup>307,322</sup> De plus, quelque soit la coloration utilisée, certaines protéines ne seront pas colorées bien que présentes en concentration suffisante sur le gel. En effet, aucune coloration ne permet de visualiser 100% des bandes et/ou protéines présentes sur un gel d'électrophorèse. Ainsi, la bande d'intérêt peut ne pas être visualisable. Bien sur, il existe d'autres techniques de coloration plus sensibles (notamment le nitrate d'argent) mais il faudra néanmoins garder à l'esprit que la technique utilisée doit rester compatible avec la spectrométrie de masse qui est l'étape suivante. En ce qui nous concerne, nous avons fait le choix d'utiliser le bleu de Coomassie en première intention du faite de sa facilité et de sa rapidité d'utilisation mais également parce que les chances de succès d'identification par spectrométrie de masse d'une bande visualisable au bleu de Coomassie sont relativement élevées contrairement à des colorations plus sensibles.<sup>307,322</sup>

- Deuxièmement, la corrélation entre le profil des pics en SELDI-TOF-MS et le profil des bandes est parfois très loin d'être parfaite. En effet, la fixation des protéines sur les puces de chromatographie dépend bien sûr de la concentration de la protéine mais aussi, et nous l'avons vu précédemment, de ses propriétés physico-chimiques. Ainsi, une protéine peut ne pas être fixée du tout sur la puce utilisée et donc ne pas être visualisée sur le profil des pics SELDI-TOF-MS ou n'être fixée que très faiblement par rapport à sa véritable concentration. La comparaison des deux profils est donc parfois complexe rendant incertaine l'excision de la bande d'intérêt. Un exemple de cette situation est montré sur la Figure 31. La corrélation est relativement bonne pour l'échantillon 2 où les 2 bandes visualisées sur le gel correspondent aux 2 pics  $m/z$  en SELDI-TOF-MS. En revanche, la corrélation est très imparfaite pour l'échantillon 1 où il existe des bandes supplémentaires présentes sur le gel mais sans aucun pic correspondant détecté sur le profil SELDI-TOF-MS.



**Figure 31. Exemple de mauvaise corrélation entre le profil SELDI-TOF-MS et le profil des bandes sur le gel d'électrophorèse.**

- Troisièmement, la présence de nombreux pics très proches et d'intensité quasiment identique malgré les différentes tentatives de purification (cf. Figure 21C) peut entraîner la présence de mélanges protéiques parfois très complexes et donc difficiles à analyser.

Dans toutes ces situations, l'analyse de l'éluât d'une bande proche de la bande jugée d'intérêt (cf. ci-dessus) et l'utilisation d'une protéine purifiée de masse moléculaire connue et proche de la masse attendue du pic  $m/z$  d'intérêt peuvent être d'une aide majeure.

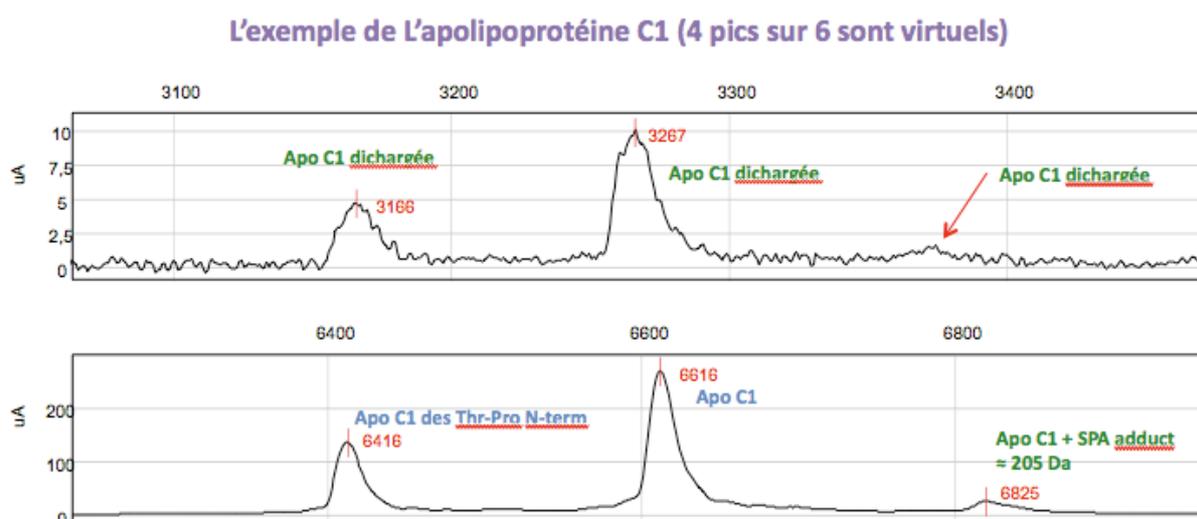
### 4.3.2. La notion de pic $m/z$ virtuel

Une autre limite importante à connaître lorsqu'on utilise la technique de SELDI-TOF-MS est qu'un certain nombre de pics  $m/z$  sont dits « virtuels » car ils ne correspondent pas directement à une protéine (ou fragment de protéine) à la taille annoncée par le pic lui-même. Ainsi, aucune bande en rapport avec le pic d'intérêt ne sera visualisée sur le gel d'électrophorèse. Ces pics dits « virtuels » peuvent être créés par 2 mécanismes principaux.

#### 4.3.2.1. Les pics dichargés

Comme énoncé précédemment, le temps de vol d'une protéine dépend de sa masse moléculaire ( $m$ ) mais également de sa charge électrique ( $z$ ). L'appareil SELDI-TOF-MS fourni ainsi un profil des pics  $m/z$ . En théorie, la charge électrique après excitation laser des protéines est égale à 1 et la valeur  $m/z$  indiquée pour un pic correspond dans ce cas également à la masse moléculaire de la protéine d'intérêt. Toutefois, il n'est pas rare qu'une partie des protéines soient doublement chargées après l'excitation par le laser ; dans ce cas la charge électrique  $z=2$ . La protéine doublement chargée vole 2 fois plus vite que celle monochargée et son rapport  $m/z$  est donc divisé par 2. L'appareil considère donc que le poids moléculaire de la protéine est la moitié de ce qu'il est en réalité. La complexité provient du fait que pour une même protéine, une partie sera chargée normalement et une autre partie sera chargée doublement. Dans cette situation, aucune bande visible ne sera observée sur le gel d'électrophorèse pour les pics correspondant aux protéines dichargées.

Ces pics peuvent toutefois être repérés car leur valeur  $m/z$  est strictement la moitié de celle de la véritable protéine. Par ailleurs, la corrélation entre les pics mono et dichargés d'une même protéine est souvent très importante avec un coefficient de corrélation  $>0,85$ . La Figure 32 reprend l'exemple du cluster des pics 6000 et des pics 3000 correspondants à l'apolipoprotéine C1 (Apo C1). Le cluster des pics  $m/z$  3000 correspond au cluster des pics  $m/z$  6000 dichargés.



**Figure 32. Exemple du cluster des pics  $m/z$  6000 et 3000 et de l'Apo C1.**

#### 4.3.2.2. La matrice

Un autre mécanisme est à l'origine des pics « virtuels ». Afin de déposer les échantillons de protéines sur les puces, il est nécessaire d'y déposer également une matrice. Il est important de savoir que dans certains cas, un morceau de la matrice se fixe à la protéine qui va ensuite voler dans le SELDI-TOF-MS après l'excitation par le laser. Ce morceau de matrice (205 Da environ) alourdit donc artificiellement la protéine en question. Le pic  $m/z$  est donc décalé de 205 Da par rapport au véritable poids de la protéine. La Figure 32 reprend l'exemple du cluster des pics 6000 et des pics 3000 correspondants à l'Apo C1. Le pic  $m/z$  6825 correspond à de l'Apo C1 avec un morceau de matrice de 205 Da.

Ces pics sont néanmoins facilement repérables car fortement corrélés au pic d'origine et relativement proches sur le profil.

## 4.4. Place des apolipoprotéines dans l'évaluation pronostique de l'IC systolique

---

### 4.4.1. La valeur ajoutée des apolipoprotéines

A ce jour, 8 pics  $m/z$  différentiellement intenses entre les patients décédés et les survivants ont pu être identifiés à partir de la population *INCA*. L'identification de ces pics a permis de mettre en exergue le système des Apos. En effet, 3 Apos différentes ainsi que plusieurs polymorphismes fonctionnels de ces Apos ont été identifiées : Apo A1, Apo C1 et Apo C3.

Suite à ces résultats, nous avons décidé de réaliser un phénotypage complet des Apos des patients de la population *INCA* et de doser 16 Apos différentes par une technique de spectrométrie de masse quantitative (*mass reaction monitoring*) : Apo A1, Apo A2, Apo A4, Apo B100, Apo C1, Apo C2, Apo C3, Apo C4, Apo D, Apo E, Apo F, Apo H (ou  $\beta$ 2 glycoprotéine 1), Apo L1, Apo M, Apo Lp(a) et l'Apo J (ou clusterine).

Les résultats de ces dosages sont prévus pour mi-avril 2015. La valeur ajoutée des différentes Apos d'intérêt par rapport aux paramètres pronostiques déjà connus et validés pourra être évaluée dans la population *INCA* comme l'on été les scores protéomiques. Par ailleurs, de nouveaux scores de risque incluant ces Apos d'intérêt pourront également être développés et validés en utilisant les mêmes approches statistiques que pour les données de protéomique obtenues par SELDI-TOF-MS.

#### 4.4.2. Le rationnel physiopathologique

Le système des Apos est largement impliqué dans le transport du cholestérol et dans le développement des plaques d'athérosclérose.<sup>323</sup> En effet, l'Apo A1 est l'Apo prédominante des *High Density Lipoprotein* (HDL) et l'Apo B100 celle qui prédomine dans les *Low Density Lipoprotein* (LDL). L'Apo C1 tout comme l'Apo A1 se retrouve majoritairement mais pas exclusivement dans les HDL. L'apo C3 est en revanche présente dans toutes les lipoprotéines. Toutefois, le rôle physiologique précis des Apos C1 et C3 est aujourd'hui mal connu. Il est néanmoins reconnu que les Apos C sont transférables entre les différentes lipoprotéines contrairement aux Apos A1 et B.

L'IDM et la cardiopathie ischémique étant la principale cause d'IC dans les pays industrialisés,<sup>2</sup> il est relativement aisé de comprendre le potentiel rôle pronostique des Apos dans l'IC systolique chronique. Boekholdt et al. ont notamment montré dans une méta-analyse de 8 essais randomisés sur le traitement par statines et ayant inclus 38153 patients que les taux abaissés d'Apo A1 étaient associés de manière indépendante à un sur-risque d'évènements cardiovasculaires majeurs y compris chez les patients avec un taux de LDL cholestérol bas et parfaitement contrôlé sous traitement.<sup>324</sup> Des résultats concordants ont été retrouvés dans une analyse *post hoc* de l'étude CORONA ayant inclus des patients avec IC systolique chronique d'origine ischémique.<sup>325</sup>

Toutefois, l'effet délétère des Apos et notamment de l'Apo A1 ne serait pas limité à leur rôle dans la progression de l'athérosclérose. En effet, l'Apo A1 a été montrée comme étant impliquée dans différents mécanismes physiopathologiques tels que l'inflammation,<sup>326,327</sup> le stress oxydatif<sup>326</sup> et la fibrose<sup>328-330</sup> qui ont eux même montré avoir un rôle délétère dans la progression de l'IC systolique. Ainsi, Iwaoka et al.<sup>326</sup> ont rapporté dans une étude de 117 patients atteints d'une IC systolique d'origine non ischémique que les taux d'Apo A1 étaient inversement corrélés aux marqueurs de l'inflammation comme la CRP ou le fibrinogène et qu'ils étaient également associés de manière significative et indépendante au pronostic des patients. Dans cette étude, les taux de HDL cholestérol n'étaient en revanche pas associés au pronostic des patients. D'autres travaux ont également montré que l'Apo A1 était capable d'inhiber l'expression du TNF- $\alpha$ , cytokine pro-inflammatoire.<sup>327</sup> Par ailleurs, plusieurs études ont également montré qu'il existait une corrélation importante entre les taux d'Apo A1 et le degré de fibrose de certains organes dans diverses pathologies fibrosantes comme la cirrhose hépatique chez les patients atteints d'une hépatite C chronique<sup>328</sup> ou la

fibrose pulmonaire idiopathique.<sup>329,330</sup> Le rôle de l'Apo A1 dans la fibrose myocardique n'a toutefois pas été mis en évidence à ce jour.

Concernant les Apo C1 et C3, là aussi, en dehors de leur rôle dans la progression de l'athérosclérose,<sup>310,331</sup> d'autres mécanismes pourraient expliquer leur rôle délétère dans l'IC systolique chronique. Comme l'Apo A1, l'Apo C3 a été associée au degré de fibrose hépatique chez les patients atteints d'une hépatite C chronique.<sup>332</sup> D'autres travaux ont suggéré que l'Apo C1 pouvait avoir un rôle dans la survie cellulaire. Takano et al.<sup>313</sup> ont ainsi montré que les cellules cancéreuses pancréatiques produisaient de l'Apo C1 en grande quantité et que l'inhibition de l'expression d'Apo C1 dans ces cellules entraînait une réduction de la prolifération cellulaire et induisait l'apoptose de ces cellules cancéreuses pancréatiques en culture. Enfin, l'Apo C1 a également été associée à la présence d'une néphropathie chez les patients diabétiques dans plusieurs travaux.<sup>311,333</sup>

Nos résultats, associés à ceux de la littérature, suggèrent qu'une évaluation précise du système des Apos des patients avec IC systolique chronique pourrait avoir un intérêt clinique important notamment dans le cadre de leur évaluation pronostique.

## **4.5. Conclusion**

---

Comme nous avons pu le voir, l'évaluation pronostique d'un patient atteint d'une IC systolique chronique reste perfectible et nécessite d'être encore améliorée. Nous avons également pu voir que de nombreux biomarqueurs circulants ont montré des résultats prometteurs et que des équipes de plus en plus nombreuses s'intéressent à cette problématique. La majeure partie de ces biomarqueurs nécessite néanmoins des études de validation afin de tester leur réelle valeur ajoutée par rapport aux paramètres pronostiques classiques. Dans ce travail, une analyse protéomique différentielle des protéines minoritaires du plasma a permis de découvrir de nouveaux biomarqueurs pronostiques circulants qui améliorent significativement la stratification du risque de mortalité cardiovasculaire précoce de ces patients atteints d'une IC systolique chronique. L'objectif est maintenant de développer des techniques de dosage simples de ces biomarqueurs qui pourront ainsi être implémentés en pratique clinique quotidienne et qui, à l'aide d'une approche multiparamétrique, faciliteront l'évaluation de ces patients.

## **5. REFERENCES**

1. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Kober L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Ronnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A. 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;33:1787-847.
2. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* 2007;93:1137-46.
3. 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;316:1429-35.
4. 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;325:293-302.
5. Packer M, Poole-Wilson PA, Armstrong PW, Cleland JG, Horowitz JD, Massie BM, Ryden L, Thygesen K, Uretsky BF. Comparative effects of low and high doses of the angiotensin-converting enzyme inhibitor, lisinopril, on morbidity and mortality in chronic heart failure. ATLAS Study Group. *Circulation* 1999;100:2312-8.
6. 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;327:685-91.
7. Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, Basta L, Brown EJ, Jr., Cuddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, Flaker GC, et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med* 1992;327:669-77.
8. Effect of ramipril on mortality and morbidity of survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure. The Acute Infarction Ramipril Efficacy (AIRE) Study Investigators. *Lancet* 1993;342:821-8.
9. Kober L, Torp-Pedersen C, Carlsen JE, Bagger H, Eliassen P, Lyngborg K, Videbaek J, Cole DS, Auclert L, Pauly NC. A clinical trial of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor trandolapril in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Trandolapril Cardiac Evaluation (TRACE) Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:1670-6.
10. Flather MD, Yusuf S, Kober L, Pfeffer M, Hall A, Murray G, Torp-Pedersen C, Ball S, Pogue J, Moye L, Braunwald E. Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group. *Lancet* 2000;355:1575-81.
11. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* 1999;353:9-13.
12. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 1999;353:2001-7.
13. Packer M, Coats AJ, Fowler MB, Katus HA, Krum H, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Castaigne A, Roecker EB, Schultz MK, DeMets DL. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001;344:1651-8.
14. A trial of the beta-blocker bucindolol in patients with advanced chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001;344:1659-67.
15. Flather MD, Shibata MC, Coats AJ, Van Veldhuisen DJ, Parkhomenko A, Borbola J, Cohen-Solal A, Dumitrascu D, Ferrari R, Lechat P, Soler-Soler J, Tavazzi L, Spinarova L, Toman J, Bohm M, Anker SD, Thompson SG, Poole-Wilson PA. 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;26:215-25.
16. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999;341:709-17.
  17. Zannad F, McMurray JJ, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, Vincent J, Pocock SJ, Pitt B. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med* 2011;364:11-21.
  18. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003;348:1309-21.
  19. Granger CB, McMurray JJ, Yusuf S, Held P, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J, Pfeffer MA, Swedberg K. 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;362:772-6.
  20. Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, Rouleau JL, Kober L, Maggioni AP, Solomon SD, Swedberg K, Van de Werf F, White H, Leimberger JD, Henis M, Edwards S, Zelenkofske S, Sellers MA, Califf RM. Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med* 2003;349:1893-906.
  21. Dickstein K, Kjekshus J. Effects of losartan and captopril on mortality and morbidity in high-risk patients after acute myocardial infarction: the OPTIMAAL randomised trial. Optimal Trial in Myocardial Infarction with Angiotensin II Antagonist Losartan. *Lancet* 2002;360:752-60.
  22. Cohn JN, Tognoni G. A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001;345:1667-75.
  23. McMurray JJ, Ostergren J, Swedberg K, Granger CB, Held P, Michelson EL, Olofsson B, Yusuf S, Pfeffer MA. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function taking angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Added trial. *Lancet* 2003;362:767-71.
  24. Swedberg K, Komajda M, Bohm M, Borer JS, Ford I, Dubost-Brama A, Lerebours G, Tavazzi L. Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 2010;376:875-85.
  25. Fox K, Ford I, Steg PG, Tendera M, Ferrari R. Ivabradine for patients with stable coronary artery disease and left-ventricular systolic dysfunction (BEAUTIFUL): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2008;372:807-16.
  26. McMurray JJ, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, Rouleau JL, Shi VC, Solomon SD, Swedberg K, Zile MR. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med* 2014;371:993-1004.
  27. Experience from controlled trials of physical training in chronic heart failure. Protocol and patient factors in effectiveness in the improvement in exercise tolerance. European Heart Failure Training Group. *Eur Heart J* 1998;19:466-75.
  28. Belardinelli R, Georgiou D, Cianci G, Purcaro A. Randomized, controlled trial of long-term moderate exercise training in chronic heart failure: effects on functional capacity, quality of life, and clinical outcome. *Circulation* 1999;99:1173-82.
  29. Hambrecht R, Niebauer J, Fiehn E, Kalberer B, Offner B, Hauer K, Riede U, Schlierf G, Kubler W, Schuler G. Physical training in patients with stable chronic heart failure: effects on cardiorespiratory fitness and ultrastructural abnormalities of leg muscles. *J Am Coll Cardiol* 1995;25:1239-49.

- 30.** McKelvie RS, Teo KK, Roberts R, McCartney N, Humen D, Montague T, Hendrican K, Yusuf S. Effects of exercise training in patients with heart failure: the Exercise Rehabilitation Trial (EXERT). *Am Heart J* 2002;144:23-30.
- 31.** Piepoli MF, Davos C, Francis DP, Coats AJ. Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH). *BMJ* 2004;328:189.
- 32.** O'Connor CM, Whellan DJ, Lee KL, Keteyian SJ, Cooper LS, Ellis SJ, Leifer ES, Kraus WE, Kitzman DW, Blumenthal JA, Rendall DS, Miller NH, Fleg JL, Schulman KA, McKelvie RS, Zannad F, Pina IL. Efficacy and safety of exercise training in patients with chronic heart failure: HF-ACTION randomized controlled trial. *JAMA* 2009;301:1439-50.
- 33.** A comparison of antiarrhythmic-drug therapy with implantable defibrillators in patients resuscitated from near-fatal ventricular arrhythmias. The Antiarrhythmics versus Implantable Defibrillators (AVID) Investigators. *N Engl J Med* 1997;337:1576-83.
- 34.** Kuck KH, Cappato R, Siebels J, Ruppel R. Randomized comparison of antiarrhythmic drug therapy with implantable defibrillators in patients resuscitated from cardiac arrest : the Cardiac Arrest Study Hamburg (CASH). *Circulation* 2000;102:748-54.
- 35.** Connolly SJ, Gent M, Roberts RS, Dorian P, Roy D, Sheldon RS, Mitchell LB, Green MS, Klein GJ, O'Brien B. Canadian implantable defibrillator study (CIDS) : a randomized trial of the implantable cardioverter defibrillator against amiodarone. *Circulation* 2000;101:1297-302.
- 36.** Oseroff O, Retyk E, Bochoeyer A. Subanalyses of secondary prevention implantable cardioverter-defibrillator trials: antiarrhythmics versus implantable defibrillators (AVID), Canadian Implantable Defibrillator Study (CIDS), and Cardiac Arrest Study Hamburg (CASH). *Curr Opin Cardiol* 2004;19:26-30.
- 37.** Bardy GH, Lee KL, Mark DB, Poole JE, Packer DL, Boineau R, Domanski M, Troutman C, Anderson J, Johnson G, McNulty SE, Clapp-Channing N, Davidson-Ray LD, Fraulo ES, Fishbein DP, Luceri RM, Ip JH. Amiodarone or an implantable cardioverter-defibrillator for congestive heart failure. *N Engl J Med* 2005;352:225-37.
- 38.** Moss AJ, Hall WJ, Cannom DS, Daubert JP, Higgins SL, Klein H, Levine JH, Saksena S, Waldo AL, Wilber D, Brown MW, Heo M. Improved survival with an implanted defibrillator in patients with coronary disease at high risk for ventricular arrhythmia. Multicenter Automatic Defibrillator Implantation Trial Investigators. *N Engl J Med* 1996;335:1933-40.
- 39.** Bristow MR, Saxon LA, Boehmer J, Krueger S, Kass DA, De Marco T, Carson P, DiCarlo L, DeMets D, White BG, DeVries DW, Feldman AM. Cardiac-resynchronization therapy with or without an implantable defibrillator in advanced chronic heart failure. *N Engl J Med* 2004;350:2140-50.
- 40.** Cleland JG, Daubert JC, Erdmann E, Freemantle N, Gras D, Kappenberger L, Tavazzi L. The effect of cardiac resynchronization on morbidity and mortality in heart failure. *N Engl J Med* 2005;352:1539-49.
- 41.** Moss AJ, Hall WJ, Cannom DS, Klein H, Brown MW, Daubert JP, Estes NA, 3rd, Foster E, Greenberg H, Higgins SL, Pfeiffer MA, Solomon SD, Wilber D, Zareba W. Cardiac-resynchronization therapy for the prevention of heart-failure events. *N Engl J Med* 2009;361:1329-38.
- 42.** Tang AS, Wells GA, Talajic M, Arnold MO, Sheldon R, Connolly S, Hohnloser SH, Nichol G, Birnie DH, Sapp JL, Yee R, Healey JS, Rouleau JL. Cardiac-resynchronization therapy for mild-to-moderate heart failure. *N Engl J Med* 2010;363:2385-95.
- 43.** Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Dipchand AI, Benden C, Christie JD, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Yusef RD, Stehlik J. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirtieth Official Adult Heart Transplant Report--2013; focus theme: age. *J Heart Lung Transplant* 2013;32:951-64.

44. Rose EA, Gelijns AC, Moskowitz AJ, Heitjan DF, Stevenson LW, Dembitsky W, Long JW, Ascheim DD, Tierney AR, Levitan RG, Watson JT, Meier P, Ronan NS, Shapiro PA, Lazar RM, Miller LW, Gupta L, Frazier OH, Desvigne-Nickens P, Oz MC, Poirier VL. Long-term use of a left ventricular assist device for end-stage heart failure. *N Engl J Med* 2001;345:1435-43.
45. Maybaum S, Mancini D, Xydias S, Starling RC, Aaronson K, Pagani FD, Miller LW, Margulies K, McRee S, Frazier OH, Torre-Amione G. Cardiac improvement during mechanical circulatory support: a prospective multicenter study of the LVAD Working Group. *Circulation* 2007;115:2497-505.
46. Jansen P, van Oeveren W, Capel A, Carpentier A. In vitro haemocompatibility of a novel bioprosthetic total artificial heart. *Eur J Cardiothorac Surg* 2012;41:e166-72.
47. Mohacsi P, LePrince P. The CARMAT total artificial heart. *Eur J Cardiothorac Surg* 2014;46:933-4.
48. Jhund PS, Macintyre K, Simpson CR, Lewsey JD, Stewart S, Redpath A, Chalmers JW, Capewell S, McMurray JJ. Long-term trends in first hospitalization for heart failure and subsequent survival between 1986 and 2003: a population study of 5.1 million people. *Circulation* 2009;119:515-23.
49. Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ, Capewell S, McMurray JJ. More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail* 2001;3:315-22.
50. Adams KF, Jr., Dunlap SH, Sueta CA, Clarke SW, Patterson JH, Blauwet MB, Jensen LR, Tomasko L, Koch G. Relation between gender, etiology and survival in patients with symptomatic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:1781-8.
51. Batin P, Wickens M, McEntegart D, Fullwood L, Cowley AJ. The importance of abnormalities of liver function tests in predicting mortality in chronic heart failure. *Eur Heart J* 1995;16:1613-8.
52. Cowie MR, Wood DA, Coats AJ, Thompson SG, Suresh V, Poole-Wilson PA, Sutton GC. Survival of patients with a new diagnosis of heart failure: a population based study. *Heart* 2000;83:505-10.
53. Ouwerkerk W, Voors AA, Zwinderman AH. Factors influencing the predictive power of models for predicting mortality and/or heart failure hospitalization in patients with heart failure. *JACC Heart Fail* 2014;2:429-36.
54. Lee DS, Austin PC, Rouleau JL, Liu PP, Naimark D, Tu JV. Predicting mortality among patients hospitalized for heart failure: derivation and validation of a clinical model. *JAMA* 2003;290:2581-7.
55. Muntwyler J, Abetel G, Gruner C, Follath F. One-year mortality among unselected outpatients with heart failure. *Eur Heart J* 2002;23:1861-6.
56. Aaronson KD, Schwartz JS, Chen TM, Wong KL, Goin JE, Mancini DM. Development and prospective validation of a clinical index to predict survival in ambulatory patients referred for cardiac transplant evaluation. *Circulation* 1997;95:2660-7.
57. Bart BA, Shaw LK, McCants CB, Jr., Fortin DF, Lee KL, Califf RM, O'Connor CM. Clinical determinants of mortality in patients with angiographically diagnosed ischemic or nonischemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:1002-8.
58. Gurunathan S, Ahmed A, Senior R. The Benefits of Revascularization in Chronic Heart Failure. *Curr Heart Fail Rep* 2014:[Epub ahead of print].
59. Rahimi K, Bennett D, Conrad N, Williams TM, Basu J, Dwight J, Woodward M, Patel A, McMurray J, MacMahon S. Risk prediction in patients with heart failure: a systematic review and analysis. *JACC Heart Fail* 2014;2:440-6.
60. The survival of patients with heart failure with preserved or reduced left ventricular ejection fraction: an individual patient data meta-analysis. *Eur Heart J* 2012;33:1750-7.

- 61.** Allen LA, Felker GM, Pocock S, McMurray JJ, Pfeffer MA, Swedberg K, Wang D, Yusuf S, Michelson EL, Granger CB. Liver function abnormalities and outcome in patients with chronic heart failure: data from the Candesartan in Heart Failure: Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity (CHARM) program. *Eur J Heart Fail* 2009;11:170-7.
- 62.** De Groot P, Lamblin N, Mouquet F, Plichon D, McFadden E, Van Belle E, Bauters C. Impact of diabetes mellitus on long-term survival in patients with congestive heart failure. *Eur Heart J* 2004;25:656-62.
- 63.** Felker GM, Allen LA, Pocock SJ, Shaw LK, McMurray JJ, Pfeffer MA, Swedberg K, Wang D, Yusuf S, Michelson EL, Granger CB. Red cell distribution width as a novel prognostic marker in heart failure: data from the CHARM Program and the Duke Databank. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:40-7.
- 64.** Pocock SJ, Wang D, Pfeffer MA, Yusuf S, McMurray JJ, Swedberg KB, Ostergren J, Michelson EL, Pieper KS, Granger CB. Predictors of mortality and morbidity in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 2006;27:65-75.
- 65.** Lassus JP, Siirila-Waris K, Nieminen MS, Tolonen J, Tarvasmaki T, Peuhkurinen K, Melin J, Pulkki K, Harjola VP. Long-term survival after hospitalization for acute heart failure--differences in prognosis of acutely decompensated chronic and new-onset acute heart failure. *Int J Cardiol* 2013;168:458-62.
- 66.** Solomon SD, Dobson J, Pocock S, Skali H, McMurray JJ, Granger CB, Yusuf S, Swedberg K, Young JB, Michelson EL, Pfeffer MA. Influence of nonfatal hospitalization for heart failure on subsequent mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2007;116:1482-7.
- 67.** Freedland KE, Carney RM, Rich MW. Effect of depression on prognosis in heart failure. *Heart Fail Clin* 2011;7:11-21.
- 68.** Murberg TA, Bru E, Svebak S, Tveteras R, Aarsland T. Depressed mood and subjective health symptoms as predictors of mortality in patients with congestive heart failure: a two-years follow-up study. *Int J Psychiatry Med* 1999;29:311-26.
- 69.** Sullivan MD, Levy WC, Crane BA, Russo JE, Spertus JA. Usefulness of depression to predict time to combined end point of transplant or death for outpatients with advanced heart failure. *Am J Cardiol* 2004;94:1577-80.
- 70.** Teychenne M, Ball K, Salmon J. Physical activity and likelihood of depression in adults: a review. *Prev Med* 2008;46:397-411.
- 71.** DiMatteo MR, Lepper HS, Croghan TW. Depression is a risk factor for noncompliance with medical treatment: meta-analysis of the effects of anxiety and depression on patient adherence. *Arch Intern Med* 2000;160:2101-7.
- 72.** Freedland KE, Carney RM, Skala JA. Depression and smoking in coronary heart disease. *Psychosom Med* 2005;67 Suppl 1:S42-6.
- 73.** Riegel B, Moser DK, Anker SD, Appel LJ, Dunbar SB, Grady KL, Gurvitz MZ, Havranek EP, Lee CS, Lindenfeld J, Peterson PN, Pressler SJ, Schocken DD, Whellan DJ. State of the science: promoting self-care in persons with heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2009;120:1141-63.
- 74.** Hofmann M, Bauer R, Handrock R, Weidinger G, Goedel-Meinen L. Prognostic value of the QRS duration in patients with heart failure: a subgroup analysis from 24 centers of Val-HeFT. *J Card Fail* 2005;11:523-8.
- 75.** Koga Y, Wada T, Toshima H, Akazawa K, Nose Y. Prognostic significance of electrocardiographic findings in patients with dilated cardiomyopathy. *Heart Vessels* 1993;8:37-41.
- 76.** Shamim W, Francis DP, Yousufuddin M, Varney S, Pieopli MF, Anker SD, Coats AJ. Intraventricular conduction delay: a prognostic marker in chronic heart failure. *Int J Cardiol* 1999;70:171-8.

77. Xiao HB, Roy C, Fujimoto S, Gibson DG. Natural history of abnormal conduction and its relation to prognosis in patients with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 1996;53:163-70.
78. Chen T, Koene R, Benditt DG, Lu F. Ventricular ectopy in patients with left ventricular dysfunction: should it be treated? *J Card Fail* 2013;19:40-9.
79. Ezzat VA, Liew R, Ward DE. Catheter ablation of premature ventricular contraction-induced cardiomyopathy. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008;5:289-93.
80. Yarlagadda RK, Iwai S, Stein KM, Markowitz SM, Shah BK, Cheung JW, Tan V, Lerman BB, Mittal S. Reversal of cardiomyopathy in patients with repetitive monomorphic ventricular ectopy originating from the right ventricular outflow tract. *Circulation* 2005;112:1092-7.
81. Doval HC, Nul DR, Grancelli HO, Varini SD, Soifer S, Corrado G, Dubner S, Scapin O, Perrone SV. Nonsustained ventricular tachycardia in severe heart failure. Independent marker of increased mortality due to sudden death. GESICA-GEMA Investigators. *Circulation* 1996;94:3198-203.
82. Le VV, Mitiku T, Hadley D, Myers J, Froelicher VF. Rest premature ventricular contractions on routine ECG and prognosis in heart failure patients. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2010;15:56-62.
83. Maggioni AP, Zuanetti G, Franzosi MG, Rovelli F, Santoro E, Staszewsky L, Tavazzi L, Tognoni G. Prevalence and prognostic significance of ventricular arrhythmias after acute myocardial infarction in the fibrinolytic era. GISSI-2 results. *Circulation* 1993;87:312-22.
84. Singh SN, Fisher SG, Carson PE, Fletcher RD. Prevalence and significance of nonsustained ventricular tachycardia in patients with premature ventricular contractions and heart failure treated with vasodilator therapy. Department of Veterans Affairs CHF STAT Investigators. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:942-7.
85. Szabo BM, van Veldhuisen DJ, Crijns HJ, Wiesfeld AC, Hillege HL, Lie KI. Value of ambulatory electrocardiographic monitoring to identify increased risk of sudden death in patients with left ventricular dysfunction and heart failure. *Eur Heart J* 1994;15:928-33.
86. Teerlink JR, Jalaluddin M, Anderson S, Kukin ML, Eichhorn EJ, Francis G, Packer M, Massie BM. Ambulatory ventricular arrhythmias in patients with heart failure do not specifically predict an increased risk of sudden death. PROMISE (Prospective Randomized Milrinone Survival Evaluation) Investigators. *Circulation* 2000;101:40-6.
87. De Maria R, Gavazzi A, Caroli A, Ometto R, Biagini A, Camerini F. Ventricular arrhythmias in dilated cardiomyopathy as an independent prognostic hallmark. Italian Multicenter Cardiomyopathy Study (SPIC) Group. *Am J Cardiol* 1992;69:1451-7.
88. Echt DS, Liebson PR, Mitchell LB, Peters RW, Obias-Manno D, Barker AH, Arensberg D, Baker A, Friedman L, Greene HL, et al. Mortality and morbidity in patients receiving encainide, flecainide, or placebo. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial. *N Engl J Med* 1991;324:781-8.
89. Waldo AL, Camm AJ, deRuyter H, Friedman PL, MacNeil DJ, Pauls JF, Pitt B, Pratt CM, Schwartz PJ, Veltri EP. Effect of d-sotalol on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent and remote myocardial infarction. The SWORD Investigators. Survival With Oral d-Sotalol. *Lancet* 1996;348:7-12.
90. Cairns JA, Connolly SJ, Roberts R, Gent M. Randomised trial of outcome after myocardial infarction in patients with frequent or repetitive ventricular premature depolarisations: CAMIAT. Canadian Amiodarone Myocardial Infarction Arrhythmia Trial Investigators. *Lancet* 1997;349:675-82.
91. Julian DG, Camm AJ, Frangin G, Janse MJ, Munoz A, Schwartz PJ, Simon P. Randomised trial of effect of amiodarone on mortality in patients with left-ventricular dysfunction after recent myocardial infarction: EMIAT. European Myocardial Infarct Amiodarone Trial Investigators. *Lancet* 1997;349:667-74.

- 92.** Bourassa MG, Gurne O, Bangdiwala SI, Ghali JK, Young JB, Rousseau M, Johnstone DE, Yusuf S. Natural history and patterns of current practice in heart failure. The Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD) Investigators. *J Am Coll Cardiol* 1993;22:14A-19A.
- 93.** Middlekauff HR, Stevenson WG, Stevenson LW. Prognostic significance of atrial fibrillation in advanced heart failure. A study of 390 patients. *Circulation* 1991;84:40-8.
- 94.** Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Hisanaga T, Maeda Y, Fukai D, Ohnishi M, Sugimoto Y, Kinoshita M. 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;96:509-16.
- 95.** de Groote P, Dagorn J, Soudan B, Lamblin N, McFadden E, Bauters C. B-type natriuretic peptide and peak exercise oxygen consumption provide independent information for risk stratification in patients with stable congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:1584-9.
- 96.** Arakawa N, Nakamura M, Aoki H, Hiramori K. Plasma brain natriuretic peptide concentrations predict survival after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:1656-61.
- 97.** Omland T, Aakvaag A, Bonarjee VV, Caidahl K, Lie RT, Nilsen DW, Sundsfjord JA, Dickstein K. Plasma brain natriuretic peptide as an indicator of left ventricular systolic function and long-term survival after acute myocardial infarction. Comparison with plasma atrial natriuretic peptide and N-terminal proatrial natriuretic peptide. *Circulation* 1996;93:1963-9.
- 98.** Takeishi Y. Biomarkers in heart failure. *Int Heart J* 2014;55:474-81.
- 99.** Dokainish H, Zoghbi WA, Lakkis NM, Ambriz E, Patel R, Quinones MA, Nagueh SF. Incremental predictive power of B-type natriuretic peptide and tissue Doppler echocardiography in the prognosis of patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1223-6.
- 100.** Jourdain P, Jondeau G, Funck F, Gueffet P, Le Helloco A, Donal E, Aupetit JF, Aumont MC, Galinier M, Eicher JC, Cohen-Solal A, Juilliere Y. Plasma brain natriuretic peptide-guided therapy to improve outcome in heart failure: the STARS-BNP Multicenter Study. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1733-9.
- 101.** Hartmann F, Packer M, Coats AJ, Fowler MB, Krum H, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Castaigne A, Anker SD, Amann-Zalan I, Hoersch S, Katus HA. Prognostic impact of plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide in severe chronic congestive heart failure: a substudy of the Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival (COPERNICUS) trial. *Circulation* 2004;110:1780-6.
- 102.** Masson S, Latini R, Anand IS, Vago T, Angelici L, Barlera S, Missov ED, Clerico A, Tognoni G, Cohn JN. Direct comparison of B-type natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal proBNP in a large population of patients with chronic and symptomatic heart failure: the Valsartan Heart Failure (Val-HeFT) data. *Clin Chem* 2006;52:1528-38.
- 103.** Richards AM, Doughty R, Nicholls MG, MacMahon S, Sharpe N, Murphy J, Espiner EA, Frampton C, Yandle TG. Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and adrenomedullin: prognostic utility and prediction of benefit from carvedilol in chronic ischemic left ventricular dysfunction. Australia-New Zealand Heart Failure Group. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:1781-7.
- 104.** Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Frampton C, Espiner EA, Turner JG, Buttimore RC, Lainchbury JG, Elliott JM, Ikram H, Crozier IG, Smyth DW. Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and adrenomedullin: new neurohormonal predictors of left ventricular function and prognosis after myocardial infarction. *Circulation* 1998;97:1921-9.

- 105.** Latini R, Masson S, Anand IS, Missov E, Carlson M, Vago T, Angelici L, Barlera S, Parrinello G, Maggioni AP, Tognoni G, Cohn JN. Prognostic value of very low plasma concentrations of troponin T in patients with stable chronic heart failure. *Circulation* 2007;116:1242-9.
- 106.** Peacock WFT, De Marco T, Fonarow GC, Diercks D, Wynne J, Apple FS, Wu AH. Cardiac troponin and outcome in acute heart failure. *N Engl J Med* 2008;358:2117-26.
- 107.** Sato Y, Yamada T, Taniguchi R, Nagai K, Makiyama T, Okada H, Kataoka K, Ito H, Matsumori A, Sasayama S, Takatsu Y. Persistently increased serum concentrations of cardiac troponin t in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy are predictive of adverse outcomes. *Circulation* 2001;103:369-74.
- 108.** Hudson MP, O'Connor CM, Gattis WA, Tasissa G, Hasselblad V, Holleman CM, Gaulden LH, Sedor F, Ohman EM. Implications of elevated cardiac troponin T in ambulatory patients with heart failure: a prospective analysis. *Am Heart J* 2004;147:546-52.
- 109.** Horwich TB, Patel J, MacLellan WR, Fonarow GC. Cardiac troponin I is associated with impaired hemodynamics, progressive left ventricular dysfunction, and increased mortality rates in advanced heart failure. *Circulation* 2003;108:833-8.
- 110.** Nakamura Y, Yoshihisa A, Takiguchi M, Shimizu T, Yamauchi H, Iwaya S, Owada T, Miyata M, Abe S, Sato T, Suzuki S, Oikawa M, Kobayashi A, Yamaki T, Sugimoto K, Kunii H, Nakazato K, Suzuki H, Saitoh S, Takeishi Y. High-sensitivity cardiac troponin T predicts non-cardiac mortality in heart failure. *Circ J* 2014;78:890-5.
- 111.** Tentzeris I, Jarai R, Farhan S, Perkmann T, Schwarz MA, Jakl G, Wojta J, Huber K. Complementary role of copeptin and high-sensitivity troponin in predicting outcome in patients with stable chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2011;13:726-33.
- 112.** Alla F, Briancon S, Juilliere Y, Mertes PM, Villemot JP, Zannad F. Differential clinical prognostic classifications in dilated and ischemic advanced heart failure: the EPICAL study. *Am Heart J* 2000;139:895-904.
- 113.** Stevenson WG, Middlekauff HR, Stevenson LW, Saxon LA, Woo MA, Moser D. Significance of aborted cardiac arrest and sustained ventricular tachycardia in patients referred for treatment therapy of advanced heart failure. *Am Heart J* 1992;124:123-30.
- 114.** Agostoni P, Corra U, Cattadori G, Veglia F, La Gioia R, Scardovi AB, Emdin M, Metra M, Sinagra G, Limongelli G, Raimondo R, Re F, Guazzi M, Belardinelli R, Parati G, Magri D, Fiorentini C, Mezzani A, Salvioni E, Scrutinio D, Ricci R, Bettari L, Di Lenarda A, Pastormerlo LE, Pacileo G, Vaninetti R, Apostolo A, Iorio A, Paolillo S, Palermo P, Contini M, Confalonieri M, Giannuzzi P, Passantino A, Cas LD, Piepoli MF, Passino C. Metabolic exercise test data combined with cardiac and kidney indexes, the MECKI score: a multiparametric approach to heart failure prognosis. *Int J Cardiol* 2013;167:2710-8.
- 115.** Hillege HL, Girbes AR, de Kam PJ, Boomsma F, de Zeeuw D, Charlesworth A, Hampton JR, van Veldhuisen DJ. Renal function, neurohormonal activation, and survival in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2000;102:203-10.
- 116.** Damman K, Voors AA, Navis G, van Veldhuisen DJ, Hillege HL. Current and novel renal biomarkers in heart failure. *Heart Fail Rev* 2012;17:241-50.
- 117.** Dries DL, Exner DV, Domanski MJ, Greenberg B, Stevenson LW. The prognostic implications of renal insufficiency in asymptomatic and symptomatic patients with left ventricular systolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:681-9.
- 118.** Mahon NG, Blackstone EH, Francis GS, Starling RC, 3rd, Young JB, Lauer MS. The prognostic value of estimated creatinine clearance alongside functional capacity in ambulatory patients with chronic congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1106-13.
- 119.** Rossignol P, Dobre D, McMurray JJ, Swedberg K, Krum H, van Veldhuisen DJ, Shi H, Messig M, Vincent J, Girerd N, Bakris G, Pitt B, Zannad F. Incidence, determinants, and

- prognostic significance of hyperkalemia and worsening renal function in patients with heart failure receiving the mineralocorticoid receptor antagonist eplerenone or placebo in addition to optimal medical therapy: results from the Eplerenone in Mild Patients Hospitalization and Survival Study in Heart Failure (EMPHASIS-HF). *Circ Heart Fail* 2014;7:51-8.
- 120.** Cauthen CA, Lipinski MJ, Abbate A, Appleton D, Nusca A, Varma A, Goudreau E, Cowley MJ, Vetrovec GW. Relation of blood urea nitrogen to long-term mortality in patients with heart failure. *Am J Cardiol* 2008;101:1643-7.
- 121.** Lin HJ, Chao CL, Chien KL, Ho YL, Lee CM, Lin YH, Wu YW, Hsu RB, Chou NK, Wang SS, Chen CY, Chen MF. Elevated blood urea nitrogen-to-creatinine ratio increased the risk of hospitalization and all-cause death in patients with chronic heart failure. *Clin Res Cardiol* 2009;98:487-92.
- 122.** Gotsman I, Zwas D, Planer D, Admon D, Lotan C, Keren A. The significance of serum urea and renal function in patients with heart failure. *Medicine (Baltimore)* 2010;89:197-203.
- 123.** He SW, Wang LX. The impact of anemia on the prognosis of chronic heart failure: a meta-analysis and systemic review. *Congest Heart Fail* 2009;15:123-30.
- 124.** Tang YD, Katz SD. The prevalence of anemia in chronic heart failure and its impact on the clinical outcomes. *Heart Fail Rev* 2008;13:387-92.
- 125.** Tang YD, Katz SD. Anemia in chronic heart failure: prevalence, etiology, clinical correlates, and treatment options. *Circulation* 2006;113:2454-61.
- 126.** Dhir M, Nagueh SF. Echocardiography and prognosis of heart failure. *Curr Opin Cardiol* 2002;17:253-6.
- 127.** Cintron G, Johnson G, Francis G, Cobb F, Cohn JN. Prognostic significance of serial changes in left ventricular ejection fraction in patients with congestive heart failure. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group. *Circulation* 1993;87:VI17-23.
- 128.** Nicod P, Gilpin E, Dittrich H, Chappuis F, Ahnve S, Engler R, Henning H, Ross J, Jr. Influence on prognosis and morbidity of left ventricular ejection fraction with and without signs of left ventricular failure after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1988;61:1165-71.
- 129.** Brophy JM, Dagenais GR, McSherry F, Williford W, Yusuf S. A multivariate model for predicting mortality in patients with heart failure and systolic dysfunction. *Am J Med* 2004;116:300-4.
- 130.** Levy WC, Mozaffarian D, Linker DT, Sutradhar SC, Anker SD, Cropp AB, Anand I, Maggioni A, Burton P, Sullivan MD, Pitt B, Poole-Wilson PA, Mann DL, Packer M. The Seattle Heart Failure Model: prediction of survival in heart failure. *Circulation* 2006;113:1424-33.
- 131.** de Groote P, Fertin M, Goeminne C, Petyt G, Peyrot S, Foucher-Hosseine C, Mouquet F, Bauters C, Lamblin N. Right ventricular systolic function for risk stratification in patients with stable left ventricular systolic dysfunction: comparison of radionuclide angiography to echoDoppler parameters. *Eur Heart J* 2012;33:2672-9.
- 132.** de Groote P, Millaire A, Foucher-Hosseine C, Nogue O, Marchandise X, Ducloux G, Lablanche JM. Right ventricular ejection fraction is an independent predictor of survival in patients with moderate heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:948-54.
- 133.** Di Salvo TG, Mathier M, Semigran MJ, Dec GW. Preserved right ventricular ejection fraction predicts exercise capacity and survival in advanced heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1995;25:1143-53.
- 134.** Meyer P, Filippatos GS, Ahmed MI, Iskandrian AE, Bittner V, Perry GJ, White M, Aban IB, Mujib M, Dell'Italia LJ, Ahmed A. Effects of right ventricular ejection fraction on outcomes in chronic systolic heart failure. *Circulation* 2010;121:252-8.

- 135.** Juilliere Y, Barbier G, Feldmann L, Grentzinger A, Danchin N, Cherrier F. Additional predictive value of both left and right ventricular ejection fractions on long-term survival in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 1997;18:276-80.
- 136.** Ghio S, Gavazzi A, Campana C, Inserra C, Klersy C, Sebastiani R, Arbustini E, Recusani F, Tavazzi L. Independent and additive prognostic value of right ventricular systolic function and pulmonary artery pressure in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:183-8.
- 137.** Komajda M, Jais JP, Reeves F, Goldfarb B, Bouhour JB, Juillieres Y, Lanfranchi J, Peycelon P, Geslin P, Carrie D, et al. Factors predicting mortality in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 1990;11:824-31.
- 138.** Saxon LA, Stevenson WG, Middlekauff HR, Fonarow G, Woo M, Moser D, Stevenson LW. Predicting death from progressive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1993;72:62-5.
- 139.** Rihal CS, Nishimura RA, Hatle LK, Bailey KR, Tajik AJ. Systolic and diastolic dysfunction in patients with clinical diagnosis of dilated cardiomyopathy. Relation to symptoms and prognosis. *Circulation* 1994;90:2772-9.
- 140.** Pinamonti B, Di Lenarda A, Sinagra G, Camerini F. Restrictive left ventricular filling pattern in dilated cardiomyopathy assessed by Doppler echocardiography: clinical, echocardiographic and hemodynamic correlations and prognostic implications. Heart Muscle Disease Study Group. *J Am Coll Cardiol* 1993;22:808-15.
- 141.** Giannuzzi P, Temporelli PL, Bosimini E, Silva P, Imparato A, Corra U, Galli M, Giordano A. Independent and incremental prognostic value of Doppler-derived mitral deceleration time of early filling in both symptomatic and asymptomatic patients with left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:383-90.
- 142.** Temporelli PL, Corra U, Imparato A, Bosimini E, Scapellato F, Giannuzzi P. Reversible restrictive left ventricular diastolic filling with optimized oral therapy predicts a more favorable prognosis in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:1591-7.
- 143.** Dini FL, Michelassi C, Micheli G, Rovai D. Prognostic value of pulmonary venous flow Doppler signal in left ventricular dysfunction: contribution of the difference in duration of pulmonary venous and mitral flow at atrial contraction. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:1295-302.
- 144.** Tamura H, Watanabe T, Nishiyama S, Sasaki S, Arimoto T, Takahashi H, Shishido T, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Hirono O, Kubota I. Increased left atrial volume index predicts a poor prognosis in patients with heart failure. *J Card Fail* 2011;17:210-6.
- 145.** Pecini R, Thune JJ, Torp-Pedersen C, Hassager C, Kober L. The relationship between mitral regurgitation and ejection fraction as predictors for the prognosis of patients with heart failure. *Eur J Heart Fail* 2011;13:1121-5.
- 146.** Koelling TM, Aaronson KD, Cody RJ, Bach DS, Armstrong WF. Prognostic significance of mitral regurgitation and tricuspid regurgitation in patients with left ventricular systolic dysfunction. *Am Heart J* 2002;144:524-9.
- 147.** Grigioni F, Enriquez-Sarano M, Zehr KJ, Bailey KR, Tajik AJ. Ischemic mitral regurgitation: long-term outcome and prognostic implications with quantitative Doppler assessment. *Circulation* 2001;103:1759-64.
- 148.** Francis DP, Shamim W, Davies LC, Piepoli MF, Ponikowski P, Anker SD, Coats AJ. Cardiopulmonary exercise testing for prognosis in chronic heart failure: continuous and independent prognostic value from VE/VCO<sub>2</sub> slope and peak VO<sub>2</sub>. *Eur Heart J* 2000;21:154-61.
- 149.** Hulsmann M, Stanek B, Frey B, Sturm B, Putz D, Kos T, Berger R, Woloszczuk W, Maurer G, Pacher R. Value of cardiopulmonary exercise testing and big endothelin plasma levels to predict short-term prognosis of patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:1695-700.

- 150.** Mancini DM, Eisen H, Kussmaul W, Mull R, Edmunds LH, Jr., Wilson JR. Value of peak exercise oxygen consumption for optimal timing of cardiac transplantation in ambulatory patients with heart failure. *Circulation* 1991;83:778-86.
- 151.** Cohn JN, Johnson GR, Shabetai R, Loeb H, Tristani F, Rector T, Smith R, Fletcher R. Ejection fraction, peak exercise oxygen consumption, cardiothoracic ratio, ventricular arrhythmias, and plasma norepinephrine as determinants of prognosis in heart failure. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group. *Circulation* 1993;87:VI5-16.
- 152.** Cattadori G, Agostoni P, Corra U, Di Lenarda A, Sinagra G, Veglia F, Salvioni E, La Gioia R, Scardovi AB, Emdin M, Metra M, Limongelli G, Raimondo R, Re F, Guazzi M, Belardinelli R, Parati G, Magri D, Fiorentini C, Mezzani A, Scrutinio D, Pacileo G, Apostolo A, Iorio A, Paolillo S, Palermo P, Contini M, Giannuzzi P, Battaia E, Ciccoira M, Passino C, Piepoli MF. Severe heart failure prognosis evaluation for transplant selection in the era of beta-blockers: role of peak oxygen consumption. *Int J Cardiol* 2013;168:5078-81.
- 153.** Curtis JP, Rathore SS, Wang Y, Krumholz HM. The association of 6-minute walk performance and outcomes in stable outpatients with heart failure. *J Card Fail* 2004;10:9-14.
- 154.** Sharma R, Anker SD. The 6-minute walk test and prognosis in chronic heart failure--the available evidence. *Eur Heart J* 2001;22:445-8.
- 155.** Opasich C, Pinna GD, Mazza A, Febo O, Riccardi R, Riccardi PG, Capomolla S, Forni G, Cobelli F, Tavazzi L. Six-minute walking performance in patients with moderate-to-severe heart failure; is it a useful indicator in clinical practice? *Eur Heart J* 2001;22:488-96.
- 156.** Dupont M, Mullens W, Skouri HN, Abrahams Z, Wu Y, Taylor DO, Starling RC, Tang WH. Prognostic role of pulmonary arterial capacitance in advanced heart failure. *Circ Heart Fail* 2012;5:778-85.
- 157.** Chatterjee NA, Lewis GD. What is the prognostic significance of pulmonary hypertension in heart failure? *Circ Heart Fail* 2012;4:541-5.
- 158.** Guglin M, Khan H. Pulmonary hypertension in heart failure. *J Card Fail* 2010;16:461-74.
- 159.** Di Salvo TG. Pulmonary hypertension and right ventricular failure in left ventricular systolic dysfunction. *Curr Opin Cardiol* 2012;27:262-72.
- 160.** Aronson D, Eitan A, Dragu R, Burger AJ. Relationship between reactive pulmonary hypertension and mortality in patients with acute decompensated heart failure. *Circ Heart Fail* 2011;4:644-50.
- 161.** Abramson SV, Burke JF, Kelly JJ, Jr., Kitchen JG, 3rd, Dougherty MJ, Yih DF, McGeehin FC, 3rd, Shuck JW, Phiambolis TP. Pulmonary hypertension predicts mortality and morbidity in patients with dilated cardiomyopathy. *Ann Intern Med* 1992;116:888-95.
- 162.** Cappola TP, Felker GM, Kao WH, Hare JM, Baughman KL, Kasper EK. Pulmonary hypertension and risk of death in cardiomyopathy: patients with myocarditis are at higher risk. *Circulation* 2002;105:1663-8.
- 163.** O'Connor CM, Whellan DJ, Wojdyla D, Leifer E, Clare RM, Ellis SJ, Fine LJ, Fleg JL, Zannad F, Keteyian SJ, Kitzman DW, Kraus WE, Rendall D, Pina IL, Cooper LS, Fiuzat M, Lee KL. Factors related to morbidity and mortality in patients with chronic heart failure with systolic dysfunction: the HF-ACTION predictive risk score model. *Circ Heart Fail* 2012;5:63-71.
- 164.** Nair KS, Jaleel A, Asmann YW, Short KR, Raghavakaimal S. Proteomic research: potential opportunities for clinical and physiological investigators. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;286:E863-74.
- 165.** Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N,

- Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Showkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-921.
- 166.** Nakashima I. Evolution of humans outside the genome. *Nagoya J Med Sci* 2005;67:59-64.
- 167.** El-Hefnawy T, Raja S, Kelly L, Bigbee WL, Kirkwood JM, Luketich JD, Godfrey TE. Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics. *Clin Chem* 2004;50:564-73.
- 168.** Elzenaar I, Pinto YM, van Oort RJ. MicroRNAs in heart failure: new targets in disease management. *Clin Pharmacol Ther* 2013;94:480-9.
- 169.** Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholakh H, Melamed N, Bentwich Z, Hod M, Goren Y, Chajut A. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 2008;3:e3148.
- 170.** Goren Y, Kushnir M, Zafrir B, Tabak S, Lewis BS, Amir O. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail* 2012;14:147-54.
- 171.** Ounzain S, Micheletti R, Beckmann T, Schroen B, Alexanian M, Pezzuto I, Crippa S, Nemir M, Sarre A, Johnson R, Dauvillier J, Burdet F, Ibberson M, Guigo R, Xenarios I, Heymans S, Pedrazzini T. Genome-wide profiling of the cardiac transcriptome after myocardial infarction identifies novel heart-specific long non-coding RNAs. *Eur Heart J* 2015;36:353-68.
- 172.** Rai AJ, Gelfand CA, Haywood BC, Warunek DJ, Yi J, Schuchard MD, Mehig RJ, Cockrill SL, Scott GB, Tammen H, Schulz-Knappe P, Speicher DW, Vitzthum F, Haab BB, Siest G, Chan DW. HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. *Proteomics* 2005;5:3262-77.
- 173.** Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 1984;311:819-23.
- 174.** Swedberg K, Eneroth P, Kjeksus J, Wilhelmsen L. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. *Circulation* 1990;82:1730-6.
- 175.** Yan RT, White M, Yan AT, Yusuf S, Rouleau JL, Maggioni AP, Hall C, Latini R, Afzal R, Floras J, Masson S, McKelvie RS. Usefulness of temporal changes in neurohormones as markers of ventricular remodeling and prognosis in patients with left ventricular systolic dysfunction and heart failure receiving either candesartan or enalapril or both. *Am J Cardiol* 2005;96:698-704.
- 176.** Ahmad T, Fiuzat M, Felker GM, O'Connor C. Novel biomarkers in chronic heart failure. *Nat Rev Cardiol* 2012;9:347-59.
- 177.** Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med* 2008;358:2148-59.
- 178.** Pousset F, Isnard R, Lechat P, Kalotka H, Carayon A, Maistre G, Escolano S, Thomas D, Komajda M. Prognostic value of plasma endothelin-1 in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 1997;18:254-8.

- 179.** Selvais PL, Robert A, Ahn S, van Linden F, Ketelslegers JM, Pouleur H, Rousseau MF. Direct comparison between endothelin-1, N-terminal proatrial natriuretic factor, and brain natriuretic peptide as prognostic markers of survival in congestive heart failure. *J Card Fail* 2000;6:201-7.
- 180.** Tsutamoto T, Hisanaga T, Fukai D, Wada A, Maeda Y, Maeda K, Kinoshita M. Prognostic value of plasma soluble intercellular adhesion molecule-1 and endothelin-1 concentration in patients with chronic congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1995;76:803-8.
- 181.** Van Beneden R, Gurne O, Selvais PL, Ahn SA, Robert AR, Ketelslegers JM, Pouleur HG, Rousseau MF. Superiority of big endothelin-1 and endothelin-1 over natriuretic peptides in predicting survival in severe congestive heart failure: a 7-year follow-up study. *J Card Fail* 2004;10:490-5.
- 182.** Pacher R, Stanek B, Hulsmann M, Koller-Strametz J, Berger R, Schuller M, Hartter E, Ogris E, Frey B, Heinz G, Maurer G. Prognostic impact of big endothelin-1 plasma concentrations compared with invasive hemodynamic evaluation in severe heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:633-41.
- 183.** Stanek B, Frey B, Berger R, Hartter E, Pacher R. Value of sequential big endothelin plasma concentrations to predict rapid worsening of chronic heart failure. *Transplant Proc* 1999;31:155-7.
- 184.** Stanek B, Frey B, Hulsmann M, Koller-Strametz J, Hartter E, Schuller M, Ogris E, Maurer G, Pacher R. Validation of big endothelin plasma levels compared with established neurohumoral markers in patients with severe chronic heart failure. *Transplant Proc* 1997;29:595-6.
- 185.** Masson S, Latini R, Carbonieri E, Moretti L, Rossi MG, Ciricugno S, Milani V, Marchioli R, Struck J, Bergmann A, Maggioni AP, Tognoni G, Tavazzi L. The predictive value of stable precursor fragments of vasoactive peptides in patients with chronic heart failure: data from the GISSI-heart failure (GISSI-HF) trial. *Eur J Heart Fail* 2010;12:338-47.
- 186.** Jankowska EA, Filippatos GS, von Haehling S, Papassotiriou J, Morgenthaler NG, Ciccoira M, Schefold JC, Rozentryt P, Ponikowska B, Doehner W, Banasiak W, Hartmann O, Struck J, Bergmann A, Anker SD, Ponikowski P. Identification of chronic heart failure patients with a high 12-month mortality risk using biomarkers including plasma C-terminal pro-endothelin-1. *PLoS One* 2011;6:e14506.
- 187.** Goldsmith SR, Gheorghiadu M. Vasopressin antagonism in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1785-91.
- 188.** Imamura T, Kinugawa K, Hatano M, Fujino T, Inaba T, Maki H, Kinoshita O, Nawata K, Kyo S, Ono M, Komuro I. Low cardiac output stimulates vasopressin release in patients with stage d heart failure. *Circ J* 2014;78:2259-67.
- 189.** Neuhold S, Huelsmann M, Strunk G, Stoiser B, Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A, Moertl D, Berger R, Pacher R. Comparison of copeptin, B-type natriuretic peptide, and amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide in patients with chronic heart failure: prediction of death at different stages of the disease. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:266-72.
- 190.** Stoiser B, Mortl D, Hulsmann M, Berger R, Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A, Pacher R. Copeptin, a fragment of the vasopressin precursor, as a novel predictor of outcome in heart failure. *Eur J Clin Invest* 2006;36:771-8.
- 191.** Glatz JF, Kleine AH, van Nieuwenhoven FA, Hermens WT, van Dieijen-Visser MP, van der Vusse GJ. Fatty-acid-binding protein as a plasma marker for the estimation of myocardial infarct size in humans. *Br Heart J* 1994;71:135-40.
- 192.** Arimoto T, Takeishi Y, Shiga R, Fukui A, Tachibana H, Nozaki N, Hirono O, Nitobe J, Miyamoto T, Hoit BD, Kubota I. Prognostic value of elevated circulating heart-type fatty acid binding protein in patients with congestive heart failure. *J Card Fail* 2005;11:56-60.

- 193.** Niizeki T, Takeishi Y, Arimoto T, Takabatake N, Nozaki N, Hirono O, Watanabe T, Nitobe J, Harada M, Suzuki S, Koyama Y, Kitahara T, Sasaki T, Kubota I. Heart-type fatty acid-binding protein is more sensitive than troponin T to detect the ongoing myocardial damage in chronic heart failure patients. *J Card Fail* 2007;13:120-7.
- 194.** Niizeki T, Takeishi Y, Takabatake N, Shibata Y, Konta T, Kato T, Kawata S, Kubota I. Circulating levels of heart-type fatty acid-binding protein in a general Japanese population: effects of age, gender, and physiologic characteristics. *Circ J* 2007;71:1452-7.
- 195.** Damman K, van der Harst P, Smilde TD, Voors AA, Navis G, van Veldhuisen DJ, Hillege HL. Use of cystatin C levels in estimating renal function and prognosis in patients with chronic systolic heart failure. *Heart* 2012;98:319-24.
- 196.** Laterza OF, Price CP, Scott MG. Cystatin C: an improved estimator of glomerular filtration rate? *Clin Chem* 2002;48:699-707.
- 197.** Sarnak MJ, Katz R, Stehman-Breen CO, Fried LF, Jenny NS, Psaty BM, Newman AB, Siscovick D, Shlipak MG. Cystatin C concentration as a risk factor for heart failure in older adults. *Ann Intern Med* 2005;142:497-505.
- 198.** Arimoto T, Takeishi Y, Niizeki T, Takabatake N, Okuyama H, Fukui A, Tachibana H, Nozaki N, Hirono O, Tsunoda Y, Miyashita T, Shishido T, Takahashi H, Koyama Y, Kubota I. Cystatin C, a novel measure of renal function, is an independent predictor of cardiac events in patients with heart failure. *J Card Fail* 2005;11:595-601.
- 199.** Haase-Fielitz A, Bellomo R, Devarajan P, Story D, Matalanis G, Dragun D, Haase M. Novel and conventional serum biomarkers predicting acute kidney injury in adult cardiac surgery--a prospective cohort study. *Crit Care Med* 2009;37:553-60.
- 200.** Damman K, Ng Kam Chuen MJ, MacFadyen RJ, Lip GY, Gaze D, Collinson PO, Hillege HL, van Oeveren W, Voors AA, van Veldhuisen DJ. Volume status and diuretic therapy in systolic heart failure and the detection of early abnormalities in renal and tubular function. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:2233-41.
- 201.** Damman K, Masson S, Hillege HL, Maggioni AP, Voors AA, Opasich C, van Veldhuisen DJ, Montagna L, Cosmi F, Tognoni G, Tavazzi L, Latini R. Clinical outcome of renal tubular damage in chronic heart failure. *Eur Heart J* 2011;32:2705-12.
- 202.** van Deursen VM, Damman K, Voors AA, van der Wal MH, Jaarsma T, van Veldhuisen DJ, Hillege HL. Prognostic value of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin for mortality in patients with heart failure. *Circ Heart Fail* 2014;7:35-42.
- 203.** Bolognani D, Basile G, Parisi P, Coppolino G, Nicocia G, Buemi M. Increased plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels predict mortality in elderly patients with chronic heart failure. *Rejuvenation Res* 2009;12:7-14.
- 204.** Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192:553-60.
- 205.** Jougasaki M, Wei CM, McKinley LJ, Burnett JC, Jr. Elevation of circulating and ventricular adrenomedullin in human congestive heart failure. *Circulation* 1995;92:286-9.
- 206.** Nishikimi T, Saito Y, Kitamura K, Ishimitsu T, Eto T, Kangawa K, Matsuo H, Omae T, Matsuoka H. Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:1424-31.
- 207.** Pousset F, Masson F, Chavirovskaia O, Isnard R, Carayon A, Golmard JL, Lechat P, Thomas D, Komajda M. Plasma adrenomedullin, a new independent predictor of prognosis in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 2000;21:1009-14.
- 208.** Meeran K, O'Shea D, Upton PD, Small CJ, Ghatei MA, Byfield PH, Bloom SR. Circulating adrenomedullin does not regulate systemic blood pressure but increases plasma prolactin after intravenous infusion in humans: a pharmacokinetic study. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:95-100.

- 209.** Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. Measurement of midregional proadrenomedullin in plasma with an immunoluminometric assay. *Clin Chem* 2005;51:1823-9.
- 210.** Adlbrecht C, Hulsmann M, Strunk G, Berger R, Mortl D, Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A, Jakowitsch J, Maurer G, Lang IM, Pacher R. Prognostic value of plasma midregional pro-adrenomedullin and C-terminal-pro-endothelin-1 in chronic heart failure outpatients. *Eur J Heart Fail* 2009;11:361-6.
- 211.** von Haehling S, Filippatos GS, Papassotiropoulos J, Ciccoira M, Jankowska EA, Doehner W, Rozentritt P, Vassanelli C, Struck J, Banasiak W, Ponikowski P, Kremastinos D, Bergmann A, Morgenthaler NG, Anker SD. Mid-regional pro-adrenomedullin as a novel predictor of mortality in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2010;12:484-91.
- 212.** Lemmens K, Doggen K, Keulenaer GW. Neuregulin-1 and its potential role in the control of cardiac function. *Heart Fail Monit* 2008;5:119-24.
- 213.** Bersell K, Arab S, Haring B, Kuhn B. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell* 2009;138:257-70.
- 214.** Liu X, Gu X, Li Z, Li X, Li H, Chang J, Chen P, Jin J, Xi B, Chen D, Lai D, Graham RM, Zhou M. Neuregulin-1/erbB-activation improves cardiac function and survival in models of ischemic, dilated, and viral cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1438-47.
- 215.** Ky B, Kimmel SE, Safa RN, Putt ME, Sweitzer NK, Fang JC, Sawyer DB, Cappola TP. Neuregulin-1 beta is associated with disease severity and adverse outcomes in chronic heart failure. *Circulation* 2009;120:310-7.
- 216.** Martinez-Martinez E, Miana M, Jurado-Lopez R, Rousseau E, Rossignol P, Zannad F, Cachofeiro V, Lopez-Andres N. A role for soluble ST2 in vascular remodeling associated with obesity in rats. *PLoS One* 2013;8:e79176.
- 217.** Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie AN, Lee RT. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest* 2007;117:1538-49.
- 218.** Bayes-Genis A, de Antonio M, Galan A, Sanz H, Urrutia A, Cabanes R, Cano L, Gonzalez B, Diez C, Pascual T, Elosua R, Lupon J. Combined use of high-sensitivity ST2 and NTproBNP to improve the prediction of death in heart failure. *Eur J Heart Fail* 2012;14:32-8.
- 219.** Ky B, French B, McCloskey K, Rame JE, McIntosh E, Shahi P, Dries DL, Tang WH, Wu AH, Fang JC, Boxer R, Sweitzer NK, Levy WC, Goldberg LR, Jessup M, Cappola TP. High-sensitivity ST2 for prediction of adverse outcomes in chronic heart failure. *Circ Heart Fail* 2011;4:180-7.
- 220.** Pascual-Figal DA, Ordonez-Llanos J, Tornel PL, Vazquez R, Puig T, Valdes M, Cinca J, de Luna AB, Bayes-Genis A. Soluble ST2 for predicting sudden cardiac death in patients with chronic heart failure and left ventricular systolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:2174-9.
- 221.** Shah RV, Januzzi JL, Jr. ST2: a novel remodeling biomarker in acute and chronic heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 2010;7:9-14.
- 222.** Fertin M, Lemesle G, Turkieh A, Beseme O, Chwastyniak M, Amouyel P, Bauters C, Pinet F. Serum MMP-8: a novel indicator of left ventricular remodeling and cardiac outcome in patients after acute myocardial infarction. *PLoS One* 2013;8:e71280.
- 223.** Lopez-Andres N, Rossignol P, Iraqi W, Fay R, Nuee J, Ghio S, Cleland JG, Zannad F, Lacolley P. Association of galectin-3 and fibrosis markers with long-term cardiovascular outcomes in patients with heart failure, left ventricular dysfunction, and dyssynchrony: insights from the CARE-HF (Cardiac Resynchronization in Heart Failure) trial. *Eur J Heart Fail* 2012;14:74-81.
- 224.** Sundstrom J, Evans JC, Benjamin EJ, Levy D, Larson MG, Sawyer DB, Siwik DA, Colucci WS, Sutherland P, Wilson PW, Vasan RS. Relations of plasma matrix

- metalloproteinase-9 to clinical cardiovascular risk factors and echocardiographic left ventricular measures: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2004;109:2850-6.
- 225.** Weir RA, Clements S, Steedman T, Dargie HJ, McMurray JJ, Squire IB, Ng LL. Plasma TIMP-4 predicts left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *J Card Fail* 2011;17:465-71.
- 226.** de Boer RA, Voors AA, Muntendam P, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ. Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression. *Eur J Heart Fail* 2009;11:811-7.
- 227.** Felker GM, Fiuzat M, Shaw LK, Clare R, Whellan DJ, Bettari L, Shirolkar SC, Donahue M, Kitzman DW, Zannad F, Pina IL, O'Connor CM. Galectin-3 in ambulatory patients with heart failure: results from the HF-ACTION study. *Circ Heart Fail* 2012;5:72-8.
- 228.** Lok DJ, Lok SI, Bruggink-Andre de la Porte PW, Badings E, Lipsic E, van Wijngaarden J, de Boer RA, van Veldhuisen DJ, van der Meer P. Galectin-3 is an independent marker for ventricular remodeling and mortality in patients with chronic heart failure. *Clin Res Cardiol* 2013;102:103-10.
- 229.** Lok DJ, Van Der Meer P, de la Porte PW, Lipsic E, Van Wijngaarden J, Hillege HL, van Veldhuisen DJ. Prognostic value of galectin-3, a novel marker of fibrosis, in patients with chronic heart failure: data from the DEAL-HF study. *Clin Res Cardiol* 2010;99:323-8.
- 230.** Shah RV, Chen-Tournoux AA, Picard MH, van Kimmenade RR, Januzzi JL. Galectin-3, cardiac structure and function, and long-term mortality in patients with acutely decompensated heart failure. *Eur J Heart Fail* 2010;12:826-32.
- 231.** Tang WH, Shrestha K, Shao Z, Borowski AG, Troughton RW, Thomas JD, Klein AL. Usefulness of plasma galectin-3 levels in systolic heart failure to predict renal insufficiency and survival. *Am J Cardiol* 2011;108:385-90.
- 232.** Ueland T, Aukrust P, Broch K, Aakhus S, Skardal R, Muntendam P, Gullestad L. Galectin-3 in heart failure: high levels are associated with all-cause mortality. *Int J Cardiol* 2011;150:361-4.
- 233.** de Boer RA, Lok DJ, Jaarsma T, van der Meer P, Voors AA, Hillege HL, van Veldhuisen DJ. Predictive value of plasma galectin-3 levels in heart failure with reduced and preserved ejection fraction. *Ann Med* 2011;43:60-8.
- 234.** Foley PW, Stegemann B, Ng K, Ramachandran S, Proudler A, Frenneaux MP, Ng LL, Leyva F. Growth differentiation factor-15 predicts mortality and morbidity after cardiac resynchronization therapy. *Eur Heart J* 2009;30:2749-57.
- 235.** Kempf T, von Haehling S, Peter T, Allhoff T, Cicoira M, Doehner W, Ponikowski P, Filippatos GS, Rozentryt P, Drexler H, Anker SD, Wollert KC. Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:1054-60.
- 236.** Eschalier R, Fertin M, Fay R, Bauters C, Zannad F, Pinet F, Rossignol P. Extracellular matrix turnover biomarkers predict long-term left ventricular remodeling after myocardial infarction: insights from the REVE-2 study. *Circ Heart Fail* 2013;6:1199-205.
- 237.** Iraqi W, Rossignol P, Angioi M, Fay R, Nuee J, Ketelslegers JM, Vincent J, Pitt B, Zannad F. Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with acute myocardial infarction complicated by left ventricular dysfunction and heart failure: insights from the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) study. *Circulation* 2009;119:2471-9.
- 238.** Radauceanu A, Ducki C, Virion JM, Rossignol P, Mallat Z, McMurray J, Van Veldhuisen DJ, Tavazzi L, Mann DL, Capiaumont-Vin J, Li M, Hanriot D, Zannad F. Extracellular matrix turnover and inflammatory markers independently predict functional status and outcome in chronic heart failure. *J Card Fail* 2008;14:467-74.

- 239.** Calvier L, Miana M, Reboul P, Cachofeiro V, Martinez-Martinez E, de Boer RA, Poirier F, Lacolley P, Zannad F, Rossignol P, Lopez-Andres N. Galectin-3 mediates aldosterone-induced vascular fibrosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:67-75.
- 240.** Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, Andre S, Crijns HJ, Gabius HJ, Maessen J, Pinto YM. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation* 2004;110:3121-8.
- 241.** Heger J, Schiegnitz E, von Waldthausen D, Anwar MM, Piper HM, Euler G. Growth differentiation factor 15 acts anti-apoptotic and pro-hypertrophic in adult cardiomyocytes. *J Cell Physiol* 2010;224:120-6.
- 242.** Hokamaki J, Kawano H, Yoshimura M, Soejima H, Miyamoto S, Kajiwara I, Kojima S, Sakamoto T, Sugiyama S, Hirai N, Shimomura H, Nagayoshi Y, Tsujita K, Shioji I, Sasaki S, Ogawa H. Urinary biopyrrins levels are elevated in relation to severity of heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:1880-5.
- 243.** Suzuki S, Shishido T, Ishino M, Katoh S, Sasaki T, Nishiyama S, Miyashita T, Miyamoto T, Nitobe J, Watanabe T, Takeishi Y, Kubota I. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine is a prognostic mediator for cardiac event. *Eur J Clin Invest* 2011;41:759-66.
- 244.** Muller MM, Curtius HC, Herold M, Huber CH. Neopterin in clinical practice. *Clin Chim Acta* 1991;201:1-16.
- 245.** Sasaki T, Takeishi Y, Suzuki S, Niizeki T, Kitahara T, Katoh S, Ishino M, Shishido T, Watanabe T, Kubota I. High serum level of neopterin is a risk factor of patients with heart failure. *Int J Cardiol* 2010;145:318.
- 246.** Polidori MC, Pratico D, Savino K, Rokach J, Stahl W, Mecocci P. Increased F2 isoprostane plasma levels in patients with congestive heart failure are correlated with antioxidant status and disease severity. *J Card Fail* 2004;10:334-8.
- 247.** Tang WH, Brennan ML, Philip K, Tong W, Mann S, Van Lente F, Hazen SL. Plasma myeloperoxidase levels in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol* 2006;98:796-9.
- 248.** Kittleson MM, St John ME, Bead V, Champion HC, Kasper EK, Russell SD, Wittstein IS, Hare JM. Increased levels of uric acid predict haemodynamic compromise in patients with heart failure independently of B-type natriuretic peptide levels. *Heart* 2007;93:365-7.
- 249.** Anker SD, Doehner W, Rauchhaus M, Sharma R, Francis D, Knosalla C, Davos CH, Ciccoira M, Shamim W, Kemp M, Segal R, Osterziel KJ, Leyva F, Hetzer R, Ponikowski P, Coats AJ. Uric acid and survival in chronic heart failure: validation and application in metabolic, functional, and hemodynamic staging. *Circulation* 2003;107:1991-7.
- 250.** Kamioka M, Suzuki H, Yamada S, Kamiyama Y, Saitoh S, Takeishi Y. High sensitivity C-reactive protein predicts nonresponders and cardiac deaths in severe heart failure patients after CRT implantation. *Int Heart J* 2012;53:306-12.
- 251.** Lamblin N, Mouquet F, Hennache B, Dagorn J, Susen S, Bauters C, de Groote P. High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for risk stratification in patients with stable congestive heart failure. *Eur Heart J* 2005;26:2245-50.
- 252.** Yin WH, Chen JW, Jen HL, Chiang MC, Huang WP, Feng AN, Young MS, Lin SJ. Independent prognostic value of elevated high-sensitivity C-reactive protein in chronic heart failure. *Am Heart J* 2004;147:931-8.
- 253.** Okuyama M, Yamaguchi S, Nozaki N, Yamaoka M, Shirakabe M, Tomoike H. Serum levels of soluble form of Fas molecule in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1997;79:1698-701.
- 254.** Fertin M, Bauters A, Pinet F, Bauters C. Circulating levels of soluble Fas ligand and left ventricular remodeling after acute myocardial infarction (from the REVE-2 study). *J Cardiol* 2012;60:93-7.

- 255.** Suzuki S, Takeishi Y, Niizeki T, Koyama Y, Kitahara T, Sasaki T, Sagara M, Kubota I. Pentraxin 3, a new marker for vascular inflammation, predicts adverse clinical outcomes in patients with heart failure. *Am Heart J* 2008;155:75-81.
- 256.** Ishino M, Takeishi Y, Niizeki T, Watanabe T, Nitobe J, Miyamoto T, Miyashita T, Kitahara T, Suzuki S, Sasaki T, Bilim O, Kubota I. Risk stratification of chronic heart failure patients by multiple biomarkers: implications of BNP, H-FABP, and PTX3. *Circ J* 2008;72:1800-5.
- 257.** Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:845-67.
- 258.** Anderson NL, Polanski M, Pieper R, Gatlin T, Tirumalai RS, Conrads TP, Veenstra TD, Adkins JN, Pounds JG, Fagan R, Lobley A. The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. *Mol Cell Proteomics* 2004;3:311-26.
- 259.** Tirumalai RS, Chan KC, Prieto DA, Issaq HJ, Conrads TP, Veenstra TD. Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Mol Cell Proteomics* 2003;2:1096-103.
- 260.** Zhou M, Lucas DA, Chan KC, Issaq HJ, Petricoin EF, 3rd, Liotta LA, Veenstra TD, Conrads TP. An investigation into the human serum "interactome". *Electrophoresis* 2004;25:1289-98.
- 261.** Adkins JN, Varnum SM, Auberry KJ, Moore RJ, Angell NH, Smith RD, Springer DL, Pounds JG. Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:947-55.
- 262.** Pieper R, Gatlin CL, Makusky AJ, Russo PS, Schatz CR, Miller SS, Su Q, McGrath AM, Estock MA, Parmar PP, Zhao M, Huang ST, Zhou J, Wang F, Esquer-Blasco R, Anderson NL, Taylor J, Steiner S. The human serum proteome: display of nearly 3700 chromatographically separated protein spots on two-dimensional electrophoresis gels and identification of 325 distinct proteins. *Proteomics* 2003;3:1345-64.
- 263.** Pieper R, Su Q, Gatlin CL, Huang ST, Anderson NL, Steiner S. Multi-component immunoaffinity subtraction chromatography: an innovative step towards a comprehensive survey of the human plasma proteome. *Proteomics* 2003;3:422-32.
- 264.** Beseme O, Fertin M, Drobecq H, Amouyel P, Pinet F. Combinatorial peptide ligand library plasma treatment: Advantages for accessing low-abundance proteins. *Electrophoresis* 2010;31:2697-704.
- 265.** Guerrier L, Righetti PG, Boschetti E. Reduction of dynamic protein concentration range of biological extracts for the discovery of low-abundance proteins by means of hexapeptide ligand library. *Nat Protoc* 2008;3:883-90.
- 266.** Panchaud A, Affolter M, Moreillon P, Kussmann M. Experimental and computational approaches to quantitative proteomics: status quo and outlook. *J Proteomics* 2008;71:19-33.
- 267.** Faber MJ, Agnetti G, Bezstarosti K, Lankhuizen IM, Dalinghaus M, Guarnieri C, Caldarera CM, Helbing WA, Lamers JM. Recent developments in proteomics: implications for the study of cardiac hypertrophy and failure. *Cell Biochem Biophys* 2006;44:11-29.
- 268.** O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250:4007-21.
- 269.** Hutchens TW, Yip TT. New desorption strategies for the mass spectrometry analysis of macromolecules. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1993;7:576-580.
- 270.** Lescuyer P, Chevallet M, Rabilloud T. [Concepts and therapeutic perspectives of proteomics]. *Med Sci (Paris)* 2004;20:587-92.
- 271.** Fertin M, Beseme O, Duban S, Amouyel P, Bauters C, Pinet F. Deep plasma proteomic analysis of patients with left ventricular remodeling after a first myocardial infarction. *Proteomics Clin Appl* 2010;4:654-73.

- 272.** Fertin M, Burdese J, Beseme O, Amouyel P, Bauters C, Pinet F. Strategy for purification and mass spectrometry identification of SELDI peaks corresponding to low-abundance plasma and serum proteins. *J Proteomics* 2011;74:420-30.
- 273.** Napoli C, Zullo A, Picascia A, Infante T, Mancini FP. Recent advances in proteomic technologies applied to cardiovascular disease. *J Cell Biochem* 2013;114:7-20.
- 274.** Peterman S, Niederkofler EE, Phillips DA, Krastins B, Kiernan UA, Tubbs KA, Nedelkov D, Prakash A, Vogelsang MS, Schoeder T, Couchman L, Taylor DR, Moniz CF, Vadali G, Byram G, Lopez MF. An automated, high-throughput method for targeted quantification of intact insulin and its therapeutic analogs in human serum or plasma coupling mass spectrometric immunoassay with high resolution and accurate mass detection (MSIA-HR/AM). *Proteomics* 2014;14:1445-56.
- 275.** Pinet F, Beseme O, Cieniewski-Bernard C, Drobecq H, Jourdain S, Lamblin N, Amouyel P, Bauters C. Predicting left ventricular remodeling after a first myocardial infarction by plasma proteome analysis. *Proteomics* 2008;8:1798-808.
- 276.** Wei Y, Cui C, Lainscak M, Zhang X, Li J, Huang J, Zhang H, Zheng Z, Hu S. Type-specific dysregulation of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in end-stage heart failure patients: relationship between MMP-10 and LV remodelling. *J Cell Mol Med* 2011;15:773-82.
- 277.** Dubois E, Fertin M, Burdese J, Amouyel P, Bauters C, Pinet F. Cardiovascular proteomics: translational studies to develop novel biomarkers in heart failure and left ventricular remodeling. *Proteomics Clin Appl* 2011;5:57-66.
- 278.** Scheler C, Li XP, Salnikow J, Dunn MJ, Jungblut PR. Comparison of two-dimensional electrophoresis patterns of heat shock protein Hsp27 species in normal and cardiomyopathic hearts. *Electrophoresis* 1999;20:3623-8.
- 279.** Urbonavicius S, Wiggers H, Botker HE, Nielsen TT, Kimose HH, Ostergaard M, Lindholt JS, Vorum H, Honore B. Proteomic analysis identifies mitochondrial metabolic enzymes as major discriminators between different stages of the failing human myocardium. *Acta Cardiol* 2009;64:511-22.
- 280.** Belluco C, Petricoin EF, Mammano E, Facchiano F, Ross-Rucker S, Nitti D, Di Maggio C, Liu C, Lise M, Liotta LA, Whiteley G. Serum proteomic analysis identifies a highly sensitive and specific discriminatory pattern in stage 1 breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2007;14:2470-6.
- 281.** Opstal-van Winden AW, Krop EJ, Karedal MH, Gast MC, Lindh CH, Jeppsson MC, Jonsson BA, Grobbee DE, Peeters PH, Beijnen JH, van Gils CH, Vermeulen RC. Searching for early breast cancer biomarkers by serum protein profiling of pre-diagnostic serum; a nested case-control study. *BMC Cancer* 2011;11:381.
- 282.** Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993;75:855-62.
- 283.** Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Zen K, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008;18:997-1006.
- 284.** Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:10513-8.
- 285.** Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res* 2012;110:483-95.

- 286.** Barrey E, Saint-Auret G, Bonnamy B, Damas D, Boyer O, Gidrol X. Pre-microRNA and mature microRNA in human mitochondria. *PLoS One* 2011;6:e20220.
- 287.** Filippin L, Magalhaes PJ, Di Benedetto G, Colella M, Pozzan T. Stable interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria. *J Biol Chem* 2003;278:39224-34.
- 288.** Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, Sun F, Lu J, Yin Y, Cai X, Sun Q, Wang K, Ba Y, Wang Q, Wang D, Yang J, Liu P, Xu T, Yan Q, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell* 2010;39:133-44.
- 289.** Divakaran V, Mann DL. The emerging role of microRNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Circ Res* 2008;103:1072-83.
- 290.** Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, Pinto YM. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res* 2010;106:1035-9.
- 291.** Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen JA, Heymans S, Schroen B. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2010;3:499-506.
- 292.** Ellis KL, Cameron VA, Troughton RW, Frampton CM, Ellmers LJ, Richards AM. Circulating microRNAs as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients. *Eur J Heart Fail* 2013;15:1138-47.
- 293.** Bauters C, Kumarswamy R, Holzmann A, Bretthauer J, Anker SD, Pinet F, Thum T. Circulating miR-133a and miR-423-5p fail as biomarkers for left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2013;168:1837-40.
- 294.** Brannan CI, Dees EC, Ingram RS, Tilghman SM. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol Cell Biol* 1990;10:28-36.
- 295.** Ounzain S, Crippa S, Pedrazzini T. Small and long non-coding RNAs in cardiac homeostasis and regeneration. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833:923-33.
- 296.** Kung JT, Colognori D, Lee JT. Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics* 2013;193:651-69.
- 297.** Kumarswamy R, Bauters C, Volkman I, Maury F, Fetisch J, Holzmann A, Lemesle G, de Groote P, Pinet F, Thum T. Circulating long noncoding RNA, LIPCAR, predicts survival in patients with heart failure. *Circ Res* 2014;114:1569-75.
- 298.** Yang KC, Yamada KA, Patel AY, Topkara VK, George I, Cheema FH, Ewald GA, Mann DL, Nerbonne JM. Deep RNA sequencing reveals dynamic regulation of myocardial noncoding RNAs in failing human heart and remodeling with mechanical circulatory support. *Circulation* 2014;129:1009-21.
- 299.** Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, Debruyne FM, Ru N, Isaacs WB. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* 1999;59:5975-9.
- 300.** de Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D, Kiemeny LA, Aalders TW, Swinkels DW, Schalken JA. DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res* 2002;62:2695-8.
- 301.** Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, Karthaus HF, van Leenders GJ, van Balken B, Kiemeny LA, Witjes JA, Schalken JA. DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol* 2003;44:8-15; discussion 15-6.
- 302.** Januzzi JL, Jr., Peacock WF, Maisel AS, Chae CU, Jesse RL, Baggish AL, O'Donoghue M, Sakhuja R, Chen AA, van Kimmenade RR, Lewandrowski KB, Lloyd-Jones DM, Wu AH. Measurement of the interleukin family member ST2 in patients with acute dyspnea: results from the PRIDE (Pro-Brain Natriuretic Peptide Investigation of Dyspnea in the Emergency Department) study. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:607-13.
- 303.** Khan SQ, O'Brien RJ, Struck J, Quinn P, Morgenthaler N, Squire I, Davies J, Bergmann A, Ng LL. Prognostic value of midregional pro-adrenomedullin in patients with acute

- myocardial infarction: the LAMP (Leicester Acute Myocardial Infarction Peptide) study. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1525-32.
- 304.** Ng LL, Pathik B, Loke IW, Squire IB, Davies JE. Myeloperoxidase and C-reactive protein augment the specificity of B-type natriuretic peptide in community screening for systolic heart failure. *Am Heart J* 2006;152:94-101.
- 305.** Zethelius B, Berglund L, Sundstrom J, Ingelsson E, Basu S, Larsson A, Venge P, Arnlov J. Use of multiple biomarkers to improve the prediction of death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 2008;358:2107-16.
- 306.** Acharjee A, Finkers R, Visser RG, Maliepaard C. Comparison of Regularized Regression Methods for ~Omics Data. *Metabolomics* 2013;3:1-9.
- 307.** Miller I, Crawford J, Gianazza E. Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics* 2006;6:5385-408.
- 308.** Hortin GL. The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. *Clin Chem* 2006;52:1223-37.
- 309.** Hegmans JP, Veltman JD, Fung ET, Verch T, Glover C, Zhang F, Allard WJ, T'Jampens D, Hoogsteden HC, Lambrecht BN, Aerts J. Protein profiling of pleural effusions to identify malignant pleural mesothelioma using SELDI-TOF MS. *Technol Cancer Res Treat* 2009;8:323-32.
- 310.** Moore D, McNeal C, Macfarlane R. Isoforms of apolipoprotein C-I associated with individuals with coronary artery disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;404:1034-8.
- 311.** Overgaard AJ, Hansen HG, Lajer M, Pedersen L, Tarnow L, Rossing P, McGuire JN, Pociot F. Plasma proteome analysis of patients with type 1 diabetes with diabetic nephropathy. *Proteome Sci* 2010;8:4.
- 312.** Andersson B, Hellgren G, Nierop AF, Hochberg Z, Albertsson-Wikland K. Proteins related to lipoprotein profile were identified using a pharmaco-proteomic approach as markers for growth response to growth hormone (GH) treatment in short prepubertal children. *Proteome Sci* 2009;7:40.
- 313.** Takano S, Yoshitomi H, Togawa A, Sogawa K, Shida T, Kimura F, Shimizu H, Tomonaga T, Nomura F, Miyazaki M. Apolipoprotein C-1 maintains cell survival by preventing from apoptosis in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 2008;27:2810-22.
- 314.** Engwegen JY, Alberts M, Knol JC, Jimenez CR, Depla AC, Tuynman H, van Heukelem HA, Snel P, Smits ME, Cats A, Schellens JH, Beijnen JH. Influence of variations in sample handling on SELDI-TOF MS serum protein profiles for colorectal cancer. *Proteomics Clin Appl* 2008;2:936-45.
- 315.** Timms JF, Arslan-Low E, Gentry-Maharaj A, Luo Z, T'Jampens D, Podust VN, Ford J, Fung ET, Gammerman A, Jacobs I, Menon U. Preanalytic influence of sample handling on SELDI-TOF serum protein profiles. *Clin Chem* 2007;53:645-56.
- 316.** Flood-Nichols SK, Lutgendorf MA, Mesngon MT, Harroun AJ, Cesarini MS, Napolitano PG, Ippolito D. Impaired lipid transport in gestational diabetes mellitus. *J Diab Res Clin Met* 2013;2:1-8.
- 317.** Percy AJ, Yang J, Chambers AG, Simon R, Hardie DB, Borchers CH. Multiplexed MRM with Internal Standards for Cerebrospinal Fluid Candidate Protein Biomarker Quantitation. *J Proteome Res* 2014.
- 318.** Chambers AG, Percy AJ, Simon R, Borchers CH. MRM for the verification of cancer biomarker proteins: recent applications to human plasma and serum. *Expert Rev Proteomics* 2014;11:137-48.
- 319.** Percy AJ, Chambers AG, Yang J, Jackson AM, Domanski D, Burkhart J, Sickmann A, Borchers CH. Method and platform standardization in MRM-based quantitative plasma proteomics. *J Proteomics* 2013;95:66-76.

- 320.** Vermaat JS, van der Tweel I, Mehra N, Sleijfer S, Haanen JB, Roodhart JM, Engwegen JY, Korse CM, Langenberg MH, Kruit W, Groenewegen G, Giles RH, Schellens JH, Beijnen JH, Voest EE. Two-protein signature of novel serological markers apolipoprotein-A2 and serum amyloid alpha predicts prognosis in patients with metastatic renal cell cancer and improves the currently used prognostic survival models. *Ann Oncol* 2010;21:1472-81.
- 321.** Petrik V, Saadoun S, Loosemore A, Hobbs J, Opstad KS, Sheldon J, Tarelli E, Howe FA, Bell BA, Papadopoulos MC. Serum alpha 2-HS glycoprotein predicts survival in patients with glioblastoma. *Clin Chem* 2008;54:713-22.
- 322.** Majek P, Riedelova-Reicheltova Z, Suttner J, Dyr JE. Staining of proteins for 2D SDS-PAGE using Coomassie Blue--speed versus sensitivity? *Electrophoresis* 2013;34:1972-5.
- 323.** Schaefer EJ, Eisenberg S, Levy RI. Lipoprotein apoprotein metabolism. *J Lipid Res* 1978;19:667-87.
- 324.** Boekholdt SM, Arsenault BJ, Hovingh GK, Mora S, Pedersen TR, Larosa JC, Welch KM, Amarencu P, Demicco DA, Tonkin AM, Sullivan DR, Kirby A, Colhoun HM, Hitman GA, Betteridge DJ, Durrington PN, Clearfield MB, Downs JR, Gotto AM, Jr., Ridker PM, Kastelein JJ. Levels and changes of HDL cholesterol and apolipoprotein A-I in relation to risk of cardiovascular events among statin-treated patients: a meta-analysis. *Circulation* 2013;128:1504-12.
- 325.** Wedel H, McMurray JJ, Lindberg M, Wikstrand J, Cleland JG, Cornel JH, Dunselman P, Hjalmarsen A, Kjekshus J, Komajda M, Kuusi T, Vanhaecke J, Waagstein F. Predictors of fatal and non-fatal outcomes in the Controlled Rosuvastatin Multinational Trial in Heart Failure (CORONA): incremental value of apolipoprotein A-1, high-sensitivity C-reactive peptide and N-terminal pro B-type natriuretic peptide. *Eur J Heart Fail* 2009;11:281-91.
- 326.** Iwaoka M, Obata JE, Abe M, Nakamura T, Kitta Y, Kodama Y, Kawabata K, Takano H, Fujioka D, Saito Y, Kobayashi T, Hasebe H, Kugiyama K. Association of low serum levels of apolipoprotein A-I with adverse outcomes in patients with nonischemic heart failure. *J Card Fail* 2007;13:247-53.
- 327.** Hyka N, Dayer JM, Modoux C, Kohno T, Edwards CK, 3rd, Roux-Lombard P, Burger D. Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Blood* 2001;97:2381-9.
- 328.** Ho AS, Cheng CC, Lee SC, Liu ML, Lee JY, Wang WM, Wang CC. Novel biomarkers predict liver fibrosis in hepatitis C patients: alpha 2 macroglobulin, vitamin D binding protein and apolipoprotein AI. *J Biomed Sci* 2010;17:58.
- 329.** Kim TH, Lee YH, Kim KH, Lee SH, Cha JY, Shin EK, Jung S, Jang AS, Park SW, Uh ST, Kim YH, Park JS, Sin HG, Youm W, Koh ES, Cho SY, Paik YK, Rhim TY, Park CS. Role of lung apolipoprotein A-I in idiopathic pulmonary fibrosis: antiinflammatory and antifibrotic effect on experimental lung injury and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:633-42.
- 330.** Lee E, Lee EJ, Kim H, Jang A, Koh E, Uh ST, Kim Y, Park SW, Park CS. Overexpression of apolipoprotein A1 in the lung abrogates fibrosis in experimental silicosis. *PLoS One* 2013;8:e55827.
- 331.** van der Ham RL, Dehnavi RA, van den Berg GA, Putter H, de Roos A, Berbee JF, Romijn JA, Rensen PC, Tamsma JT. Apolipoprotein CI levels are associated with atherosclerosis in men with the metabolic syndrome and systemic inflammation. *Atherosclerosis* 2009;203:355-7.
- 332.** Rowell J, Thompson AJ, Guyton JR, Lao XQ, McHutchison JG, McCarthy JJ, Patel K. Serum apolipoprotein C-III is independently associated with chronic hepatitis C infection and advanced fibrosis. *Hepatol Int* 2011.

**333.** Hirano T, Sakaue T, Misaki A, Murayama S, Takahashi T, Okada K, Takeuchi H, Yoshino G, Adachi M. Very low-density lipoprotein-apoprotein CI is increased in diabetic nephropathy: comparison with apoprotein CIII. *Kidney Int* 2003;63:2171-7.

## **6. ANNEXES**

## **6.1. ANNEXE 1 : Copeptin in acute coronary syndrome and heart failure management: state of the art and future directions**

---

Article soumis à la revue Archives of Cardiovascular Diseases.

## **6.2. ANNEXE 2 : Serum MMP-8: a novel indicator of left ventricular remodeling and cardiac outcome in patients after acute myocardial infarction**

---

Article publié dans la revue PlosOne. 2013 Aug 14;8(8):e71280.

### **6.3. ANNEXE 3 : The circulating long non-coding RNA *LIPCAR* predicts survival in heart failure patients**

---

Article publié dans la revue *Circulation Research*. 2014 May 9;114(10):1569-75.