



HAL
open science

Analyse des réseaux moléculaires impliqués dans le remodelage ventriculaire gauche post-infarctus du myocarde et dans l'insuffisance cardiaque

Marie Cuvelliez

► **To cite this version:**

Marie Cuvelliez. Analyse des réseaux moléculaires impliqués dans le remodelage ventriculaire gauche post-infarctus du myocarde et dans l'insuffisance cardiaque. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2019. Français. NNT : 2019LILUS027 . tel-02614193

HAL Id: tel-02614193

<https://theses.hal.science/tel-02614193v1>

Submitted on 20 May 2020

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 DE LILLE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE – SANTE DE LILLE

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

**Analyse des réseaux moléculaires impliqués
dans le remodelage ventriculaire gauche
post-infarctus du myocarde et dans
l'insuffisance cardiaque**

Soutenue le 27 septembre 2019 par

Marie CUVELLIEZ

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Philippe AMOUYEL

Madame le Docteur Jane-Lise SAMUEL

Monsieur le Professeur Yvan DEVAUX

Madame le Docteur Cécile VINDIS

Madame le Docteur Florence PINET

Monsieur le Professeur Christophe BAUTERS

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Unité Inserm U1167, Institut Pasteur de Lille

Remerciements

Mes remerciements vont particulièrement à :

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

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire « Facteurs de risque et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement » depuis 2013 pour mon stage de Master 2 puis ma thèse. Je suis particulièrement honorée que vous présidiez mon jury. Soyez assuré de mes sincères remerciements et mon profond respect.

Monsieur le Professeur Christophe BAUTERS, directeur de thèse,

Je vous suis particulièrement reconnaissante d'avoir accepté d'encadrer ce travail de thèse. Je vous remercie pour votre bienveillance et les précieux conseils que vous m'avez toujours apportée au cours de ces 3 années. Je vous remercie également du temps que vous avez accordé à la relecture de ce manuscrit. Je tiens à vous exprimer ici mon profond respect.

Madame le Docteur Florence PINET, directrice de l'équipe 2 de l'unité U1167,

Je vous suis extrêmement reconnaissante de m'avoir accueillie dans votre équipe, d'abord pour mon stage de Master 2 puis pour ma thèse, et d'avoir encadré scientifiquement ce travail de thèse. Je vous remercie particulièrement de m'avoir confiée ce projet et de m'avoir permise et encouragée à participer à différentes formations et congrès, qui m'ont permis d'élargir mes compétences à la bioinformatique et à la biologie des systèmes. Je vous remercie du temps que vous m'avez accordée au quotidien et pour tous vos conseils. J'ai beaucoup appris à vos côtés au cours de ces 6 dernières années. Cela a été un honneur de pouvoir travailler avec vous.

Madame le Docteur Jane-Lise SAMUEL

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse.

Monsieur le Professeur Yvan DEVAUX

Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse.

Madame le Docteur Cécile VINDIS

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Madame le Docteur Hélène TOUZET et Monsieur le Professeur Vincent RICHARD, membres de mon Comité de Suivi Individuel

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à mes Comité de Suivi Individuel. Je vous suis reconnaissante de l'intérêt que vous avez porté à mon travail, de vos encouragements et de vos conseils pour mener à bien ce projet, et pour envisager mon avenir professionnel.

L'équipe Protéomique de l'unité U1167

Je vous remercie tous très chaleureusement pour ces années passées à travailler ensemble. Cela a été un véritable plaisir de travailler avec vous au quotidien.

Emilie DERUY, je te suis extrêmement reconnaissante pour ta bienveillance, ta patience et ton soutien tout au long de ma thèse. Tes conseils, aussi bien scientifiques que personnels, m'ont toujours été très précieux et le resteront. Je te remercie aussi pour tous les bons moments passés ensemble (des heures à refaire le monde ou commenter les matchs de rugby et de foot).

Annie TURKIEH, je te remercie pour ta bonne humeur communicative au quotidien et tes conseils toujours avisés. Nos discussions et nos petites sorties ont rendu ces dernières années plus agréables.

Victoriane PEUGNET, « ma copine », je te remercie pour ta gentillesse et ton soutien indéfectible dans les bons moments et les périodes plus difficiles. Nos sorties entre filles et nos fous-rires ont égayé mes journées. Ces 3 années n'auraient pas été les mêmes sans toi. Je te souhaite tout le meilleur pour ta fin de thèse et la suite.

Henri CHARRIER, nos longues discussions sur les microARNs et les exosomes ont été particulièrement enrichissantes. Je te remercie également pour tout ton soutien et les bons moments passés ensemble. Je te souhaite toute la réussite que tu mérites pour ta thèse à venir.

Olivia BESEME et **Maggy CHWASTYNIAK**, je vous remercie pour votre aide et vos conseils techniques au cours de tout mon parcours. Merci pour les expériences réalisées ensemble et qui ont permis l'avancement de ce projet.

Je remercie également les autres membres de l'équipe protéomique actuels ou passés : Ouriel Saura, Marion Bouvet, Gilles Lemesle, Pascal de Groote pour l'étude INCA, Arthur Dechaumes, Thomas Mercier...

Madame le Docteur Guillemette MAROT, Monsieur le Docteur Vincent VANDEWALLE, Monsieur le Docteur Maxime BRUNIN, Audrey HULOT, de la plateforme Bilille

Je vous remercie pour le travail accompli ensemble sur l'étude INCA. Je vous suis aussi reconnaissante pour vos conseils de formations en statistiques qui m'ont permis d'acquérir de nouvelles connaissances dans ce domaine.

L'ensemble de l'unité U1167

Je tiens également à remercier tous les membres de l'unité U1167 pour leur bonne humeur, leurs conseils et leur soutien : Amandine, Fanny, Anaïs-Camille, Jean-Charles, Julien, Devrim, Tiago, Florie, Marcos, Ana-Raquel, Ortis, Anne-Sophie, Camille, Anne-Marie, Pierre, Aline, Jean, Nadine, Julie, Benjamin, Céline, Vincent, Audrey, Hugo, Xavier, Valérie... et j'en oublie certainement beaucoup.

Enfin, je tiens à remercier particulièrement :

Toute ma famille, en particulier **ma mère, ma grand-mère et mon frère**, pour m'avoir toujours encouragée et soutenue dans mes projets. Sans vous je n'en serais pas là.

Mes kinés, qui me permettent de rester en bonne santé au quotidien et de pouvoir mener à bien tout mes projets : **Eric, Damien, Didier**. Mais surtout **Marie-Joe**, merci de t'être toujours si bien occupée de moi et d'avoir été ma confidente pendant ces 24 dernières années.

Enfin, toutes mes pensées vont à **mon grand-père**, qui serait tellement fier de mon parcours.

Liste des publications et communications

- **Publications**

Cuvelliez M*, Vandewalle V*, Brunin M, Beseme O, Hulot A, de Groote P, Amouyel P, Bauters C, Marot G, Pinet F. Circulating proteomic signature of early death in heart failure patients with reduced ejection fraction. *co-first authors (soumis)

Charrier H*, **Cuvelliez M***, Dubois-Deruy E, Mulder P, Richard V, Bauters C, Pinet F. Integrative systems biology analyses identify seven microRNAs to predict heart failure. *Non coding RNA*. 2019;5(22):1-9. *co-first authors

Dubois-Deruy E, **Cuvelliez M**, Fiedler J, Charrier H, Mulder P, Hebbar E, Pfanne A, Beseme O, Chwastyniak M, Amouyel P, Richard V, Bauters C, Thum T, Pinet F. MicroRNAs regulating superoxyde dismutase 2 are new circulating biomarkers of heart failure. *Sci. Rep.* 2017;7(1):14747.

Pinet F, **Cuvelliez M**, Kelder T, Amouyel P, Radonjic M, Bauters C. Integrative network analysis reveals time-dependent molecular events underlying left ventricular remodeling in post-myocardial infarction patients. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1863(6):1445-1453

- **Communications orales (séminaires, colloques, congrès)**

Cuvelliez M, Brunin M, Beseme O, Kelder T, Vanderwalle V, Radonjic M, Amouyel P, de Groote P, Marot G, Bauters C and Pinet F. Identification of new circulating biomarkers of early death in heart failure patients by a systems biology approach. *Printemps de la Cardiologie*, avril 2019, Lille (en anglais)

Cuvelliez M, Dubois-Deruy E, Charrier H, Kelder T, Mulder P, Chwastyniak M, Radonjic M, Amouyel P, Richard V, Bauters C, Pinet F. Analysis of the molecular network underlying left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Journée André Verbert*, septembre 2018, Lille (en anglais)

Cuvelliez M, Bauters C, Kelder T, Radonjic M, Amouyel P, Pinet F. Analysis of the molecular network underlying left ventricular remodeling after myocardial infarction. *3rd BeNeLuxFra symposium*, Juillet 2017, Lille (en anglais)

- **Communications affichées (séminaires, colloques, congrès)**

Cuvelliez M, Brunin M, Beseme O, Kelder T, Vanderwalle V, Radonjic M, Amouyel P, de Groote P, Marot G, Bauters C and Pinet F. Identification of new circulating biomarkers of early death in heart failure patients by a systems biology approach. *Printemps de la Cardiologie*, avril 2019, Lille

Cuvelliez M, Dubois-Deruy E, Charrier H, Kelder T, Mulder P, Chwastyniak M, Radonjic M, Amouyel P, Richard V, Bauters C, Pinet F. Analysis of the molecular network underlying left

ventricular remodeling after myocardial infarction. *Journée André Verbert*, septembre 2018, Lille

Cuveliez M, Dubois-Deruy E, Charrier H, Kelder T, Mulder P, Chwastyniak M, Radonjic M, Amouyel P, Richard V, Bauters C, Pinet F. Analysis of the molecular network underlying left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Printemps de la Cardiologie*, avril 2018, Montpellier

Cuveliez M, Bauters C, Kelder T, Radonjic M, Amouyel P, Pinet F. Analysis of the molecular network underlying left ventricular remodeling after myocardial infarction. *JOBIM 2017*, Juillet 2017, Lille

Sommaire

Sommaire

LISTES DES FIGURES ET DES TABLES	5
ABREVIATIONS.....	9
AVANT-PROPOS	15
INTRODUCTION.....	19
1 PHYSIOPATHOLOGIE DU CŒUR	21
1.1 <i>Le cœur sain.....</i>	<i>21</i>
1.1.1 Anatomie du cœur.....	21
1.1.2 Le cycle cardiaque.....	23
1.2 <i>L'infarctus du myocarde.....</i>	<i>24</i>
1.2.1 Définition.....	24
1.2.2 Epidémiologie.....	25
1.2.3 Facteurs de risques.....	26
1.2.4 Dépistage et biomarqueurs de l'IDM.....	27
1.3 <i>Le remodelage ventriculaire gauche post-infarctus du myocarde.....</i>	<i>29</i>
1.3.1 Définition.....	29
1.3.2 Mécanismes physiopathologiques du RVG.....	30
1.3.2.1 Réexpression du programme fœtal.....	30
1.3.2.2 Remodelage de la matrice extracellulaire et fibrose.....	30
1.3.2.3 Principales voies de signalisation.....	31
1.3.2.4 Métabolisme énergétique.....	33
1.3.2.5 Stress oxydant.....	35
1.3.2.6 Inflammation post-IDM.....	36
1.3.2.7 Mort cellulaire.....	37
1.3.2.8 Protéines contractiles.....	37
1.3.3 Epidémiologie.....	39
1.4 <i>Insuffisance cardiaque.....</i>	<i>40</i>
1.4.1 Définition.....	40
1.4.2 Epidémiologie.....	41
1.4.3 Dépistage et biomarqueurs de l'IC.....	42
1.4.4 Traitements de l'IC.....	44
2 RECHERCHE DE BIOMARQUEURS	44
2.1 <i>Définition du biomarqueur.....</i>	<i>44</i>
2.2 <i>Approches de protéomique.....</i>	<i>46</i>
2.2.1 Evolution des approches de protéomique.....	46
2.2.1.1 Le Western Blot et le dosage ELISA.....	47
2.2.1.2 La technologie Multiplex.....	48
2.2.1.3 Analyse protéomique par électrophorèse bidimensionnelle.....	49
2.2.1.4 Spectrométrie de masse.....	51
2.2.1.5 Analyses protéomiques basées sur les aptamères.....	51
2.2.2 Avantages et inconvénients des différentes approches.....	53
2.3 <i>Les ARNs non codants.....</i>	<i>54</i>
2.3.1 Les microARNs.....	55
2.3.1.1 Biosynthèse des microARNs.....	55
2.3.1.2 Modes d'action des microARNs.....	56
2.3.1.3 Sécrétion des microARNs.....	57
2.3.1.4 Les microARNs : biomarqueurs du RVG post-IDM et de l'IC.....	58
2.3.2 Les ARNs longs non codants.....	58
2.3.2.1 Généralités.....	58
2.3.2.2 Modes d'action des ARNs longs non codants.....	59
2.3.2.3 Les ARNs longs non codants dans les maladies cardiovasculaires.....	60
2.4 <i>Analyses bioinformatiques pour l'identification de biomarqueurs.....</i>	<i>61</i>
2.4.1 Biologie des systèmes.....	61
2.4.2 Réseaux d'interactions moléculaires.....	62
2.4.3 La biologie des systèmes dans l'étude et la recherche de biomarqueurs des maladies cardiovasculaires.....	65
2.5 <i>Intérêt des analyses statistiques pour la recherche de biomarqueurs.....</i>	<i>66</i>
OBJECTIFS.....	69

MATERIEL ET METHODES.....	73
1 MODELES	75
1.1 <i>Etude REVE-2</i>	75
1.2 <i>Population INCA</i>	75
1.3 <i>Modèle expérimental d'IC chez le rat</i>	76
2 CONSTRUCTION DES RESEAUX D'INTERACTIONS MOLECULAIRE DE REVE-2 ET INCA	77
3 QUANTIFICATION DES ARNs PAR Q-PCR	79
3.1 <i>Extraction des ARNs du tissu</i>	79
3.2 <i>Rétro-transcription des ARNs</i>	80
3.3 <i>PCR quantitative</i>	80
4 QUANTIFICATION DES PROTEINES PAR <i>SOMASCAN ASSAY</i>	81
5 QUANTIFICATION DE LA CATHEPSINE S PAR ELISA	81
6 QUANTIFICATION DE C3, MMP-1 ET MMP-7 PAR LA TECHNOLOGIE LUMINEX	81
7 ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES DE PROTEOMIQUE A HAUT DEBIT	81
RESULTATS	83
1 PARTIE 1 : ANALYSE DU RESEAU MOLECULAIRE DE RVG POST-IDM : ETUDE REVE-2	85
1.1 <i>Objectifs de l'étude</i>	87
1.2 <i>Résultats</i>	88
1.2.1 <i>Caractéristiques de la population REVE-2</i>	88
1.2.2 <i>Analyse du réseau d'interactions moléculaires de REVE-2</i>	90
1.2.2.1 <i>Analyse de la topologie du réseau REVE-2</i>	91
1.2.2.2 <i>Analyse des modules actifs du réseau REVE-2 en fonction du temps</i>	98
1.2.2.3 <i>Analyse de la centralité d'intermédiarité des nœuds du réseau REVE-2</i>	100
1.2.2.4 <i>Identification de cibles potentiellement impliquées dans le RVG post-IDM</i>	101
1.2.3 <i>Analyse bibliographique des cibles identifiées dans le réseau REVE-2</i>	102
1.2.3.1 <i>EP300</i>	102
1.2.3.2 <i>ESR1</i>	104
1.2.3.3 <i>Les microARNs</i>	106
1.2.3.3.1 <i>miR-335-5p</i>	106
1.2.3.3.2 <i>miR-26b-5p</i>	107
1.2.3.3.3 <i>miR-375</i>	109
1.2.3.3.4 <i>miR-17-5p</i>	110
1.2.1 <i>Validation expérimentale des cibles identifiées dans le réseau REVE-2 dans un modèle d'IC post-IDM chez le rat</i>	112
1.2.1.1 <i>Quantification de ESR1</i>	112
1.2.1.2 <i>Quantification des microARNs</i>	112
1.2.2 <i>Comparaison de 2 approches de biologie des systèmes pour l'identification de microARNs comme potentiels biomarqueurs du RVG par biologie des systèmes</i>	114
1.2.2.1 <i>Analyse d'un réseau protéine-microARNs dérivé d'un modèle de rats post-IDM</i>	114
1.2.2.2 <i>Analyse des microARNs sélectionnés dans le réseau REVE-2</i>	115
1.2.2.3 <i>Analyse Gene Ontology des 7 microARNs sélectionnés</i>	117
1.3 <i>Conclusion-Discussion</i>	119
2 PARTIE 2 : ANALYSE DU RESEAU MOLECULAIRE DE L'IC : ETUDE INCA	122
2.1 <i>Objectifs de l'étude</i>	124
2.2 <i>Résultats</i>	125
2.2.1 <i>Caractéristiques de la population INCA</i>	125
2.2.2 <i>Clustering des patients de l'étude INCA</i>	126
2.2.3 <i>Stratégies d'analyse des données issues du SOMAscan assay</i>	127
2.2.4 <i>Analyse du réseau moléculaire de INCA</i>	127
2.2.4.1 <i>Analyse de la topologie du réseau</i>	128
2.2.4.2 <i>Analyse de la centralité d'intermédiarité des nœuds du réseau INCA</i>	134
2.2.5 <i>Analyse statistique en régression pénalisée</i>	137
2.2.6 <i>Quantification de C3, Cathépsine S, MMP-1 et MMP-7 par des dosages conventionnels dans une sous-population de l'étude INCA</i>	140
2.3 <i>Conclusion-Discussion</i>	141
DISCUSSION-CONCLUSION	144
1 INTERET DE LA BIOLOGIE DES SYSTEMES	146

2	MECANISMES IMPLIQUES DANS LE RVG POST-IDM ET DANS L'IC.....	148
2.1	<i>Rôle de EP300 dans le RVG post-IDM.....</i>	149
2.2	<i>Rôle des œstrogènes dans le RVG post-IDM.....</i>	151
2.3	<i>Implication des microARNs dans le RVG post-IDM et l'IC.....</i>	153
3	BIOMARQUEURS DU DECES PRECOCE DES PATIENTS IC	154
4	CONCLUSION GÉNÉRALE	156
BIBLIOGRAPHIE		158
ANNEXES.....		178
1	ANNEXE I : INTEGRATIVE NETWORK ANALYSIS REVEALS TIME-DEPENDENT MOLECULAR EVENTS UNDERLYING LEFT VENTRICULAR REMODELING IN POST-MYOCARDIAL INFARCTION PATIENTS	
2	ANNEXE II : MICRORNAs REGULATING SUPEROXIDE DISMUTASE 2 ARE NEW CIRCULATING BIOMARKERS OF HEART FAILURE	
3	ANNEXE III : INTEGRATIVE SYSTEM BIOLOGY ANALYSES IDENTIFY SEVEN MICRORNAs TO PREDICT HEART FAILURE	
4	ANNEXE IV : CIRCULATING PROTEOMIC SIGNATURE OF EARLY DEATH IN HEART FAILURE PATIENTS WITH REDUCED EJECTION FRACTION	

Listes des figures et des tables

Table of contents placeholder with multiple entries

Liste des tables

Table of contents placeholder with multiple entries

Abréviations

Liste des abréviations

2D : bidimensionnelle
ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine
Acétyl-CoA : Acétyl-coenzyme A
ADN : Adénosine dinucléotide
ADNc : ADN complémentaire
ADP : Adénosine diphosphate
Ago : Argonaute
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
AMPK : *Adenosine monophosphate-activated protein kinase*
AngI : Angiotensine I
AngII : Angiotensine II
ANOVA : *Analysis of variance*
ANP : *Atrial natriuretic peptide*
ARNm : ARNmessenger
ATP : Adénosine triphosphate
ATR1 : Récepteur de type 1 à l'angiotensine
AVC : Accident vasculaire cérébral
Bim : *Bcl2 like protein 11*
BIV : Critère d'Information Bayésien
BNP : *Brain natriuretic peptide*
C3 : Complément C3
CaMKII : *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*
CBP : *CREB-binding protein*
CITP : *Carboxy-terminal telopeptide of collagen type I*
CK-MB : Isoforme cardiaque de la créatine kinase
CRP : *C reactive protein*
cTn : Troponines cardiaques
cTnI : Troponine I cardiaque
cTnT : Troponine T cardiaque
CTSS : Cathepsine S
DAMP : *Danger-associated molecular pattern*
DKK1 : *Dickkopf 1*
E2 : 17 -oestradiol
ECG : Electrocardiogramme
EP300 : *E1A binding protein EP300*
EPAC : *Exchange Protein directly Activated by cAMP*
ERE : *Estrogen response element*
ER : *Estrogen Receptor*
ESR1 : *Estrogen Receptor 1*
ET1 : Endotheline 1
FAM107B : *Family with sequence similarity 107 member B*
FasL : Fas ligand
FDA : *Food and Drug Administration*
FEVG : Fraction d'éjection du ventricule gauche
FoxO : *Forkhead Box O*
GO : *Gene Ontology*
Gp130 : Glycoprotéine 130
GPCR : Récepteur couplé aux protéines G

GSK3 : *Glycogen synthase kinase 3*
H₂O₂ : Peroxyded'hydrogène
HAT : Histone acétyl-transférase
HDAC : Histone déacétylase
HDL : *High density lipoprotein*
HMGB1 : *High mobility group box 1*
HPRT : *Hypoxanthine guanine phosphoribisyl transferase*
HSP : Protéine de choc thermique
IC : Insuffisance cardiaque
ICAM : *Intercellular adhesion molecule*
IDM : Infarctus du myocarde
IL : Interleukine
IP3 : Inositol-3-phosphate
IPA : *Inginuity Pathway Analysis*
IRM : Imagerie par résonance magnétique
JAK : *Janus kinase*
KCNJ2 : *Inward rectifier potassium channel 2*
KO : *Knock out*
LASSO : *Least Absolute Shrinkage and Selection Operator*
LD1 : Lactate deshydrogénase 1
LDL : *Low density lipoprotein*
LIPCAR : *Long intergenic non-coding RNA predicting cardiac remodeling*
LncARN : ARN long non codant
MALDI-TOF : *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*
MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*
MAPKAPK5 : *Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 5*
MEF-2 : *Myocyte enhancer factor-2*
Mhrt : *Myosin Heavy-chain-associated RNA Transcripts*
miARN/miR : MicroARN
MIPIN : *Myocardial Infarction-specific Protein-protein Interaction Network*
mmHg : Millimètre de mercure
MMP : *Matrix metalloproteinase*
Myh7 : *Myosin Heavy chain 7*
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NFAT : *Nuclear factor of activated T-cells*
NF κ B : *Nuclear factor κ B*
NIH : *National Institutes of Health*
NT-proBNP : Fragment N-terminal du proBNP
NYHA : *New York Heart Association*
O₂⁻ : Anion superoxyde
OCl⁻ : Hypochlorites
OD : Oreillette droite
OG : Oreillette gauche
OH⁻ : Radical hydroxyle
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PDK1 : *3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*
PGC1 α : *Peroxisome-proliferator activated receptor α co activator 1*
PHLPP2 : *PH domain leucine-rich protein phosphatase 2*
pI : Point Isoélectrique

PI3K : *Phosphoinositide 3-kinase*
PICP : *Carboxyterminal propeptide of type I procollagen*
PKC : Protéine Kinase C
PLC : Phospholipase C
PPAR□: *Peroxisome-proliferator activated receptor* □
PTEN : *Phosphatase and tenson homolog*
qPCR : *quantitative Polymerase Chain Reaction*
REVE : REmodelageVentriculaire
RIN : *RNA integrity number*
RISC : *RNA-induced silencing complex*
RNase : Ribonucléotidase
ROCK1 : *Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase 1*
ROS : Espèce réactive de l'oxygène
RVG : Remodelage ventriculaire gauche
SELDI-TOF : *Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*
SIRT1 : Sirtuine 1
SMAD3 : *Mothers against decapentaplegic homolog 3*
SOD : Superoxyde dismutase
SOMAmer : *Slow-off rate modified aptamer*
SP1 : *Specificity protein 1*
SRF : *Serum response factor*
STAT : *Signal transducer and activator of transcription*
STEMI : IDM avec élévation du fragment ST
TAC : Constriction de l'aorte transverse
TGF□: *Transforming Growth factor* □
TIMP : *Tissue inhibitor of metalloproteinases*
TLR : Récepteur de mort cellulaire de type Toll
TNF□: *Tumor necrosis factor* □
TRAIL : *Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*
UTR : *Untranslated Transcribed Region*
VCAM : *Vascular cell adhesion molecule*
VD : Ventricule droit
VG : Ventricule gauche

Avant-propos

J'ai eu l'opportunité de réaliser mon stage de Master 2 puis mon doctorat dans l'équipe du Dr Florence Pinet, au sein de l'unité U1167 de l'Institut Pasteur de Lille. L'équipe a développé l'utilisation de la protéomique dans la recherche de nouveaux biomarqueurs des maladies cardiovasculaires. Les recherches menées au sein du laboratoire s'intéressent aussi aux mécanismes régulant l'expression et l'activité des protéines, tels que les ARNs non codants et les modifications post-traductionnelles.

Au cours de mon Master 2, j'ai eu l'occasion de travailler sur les microARNs régulant l'expression de la superoxyde dismutase 2 comme potentiels biomarqueurs de l'insuffisance cardiaque.

Pendant mon projet de doctorat, je me suis intéressée aux réseaux moléculaires impliqués dans le remodelage ventriculaire gauche post-infarctus du myocarde et dans l'insuffisance cardiaque. Le but de ces travaux était d'identifier des biomarqueurs (protéines et ARNs non codants) du remodelage ventriculaire gauche post-infarctus et de l'insuffisance cardiaque, mais également de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ces pathologies. Pour cela, j'ai utilisé des approches de protéomique à haut débit, de biologie des systèmes et de statistiques.

Au cours de ces dernières années, la protéomique a connu une importante évolution. En effet, les techniques les plus anciennes permettaient l'étude d'une seule protéine dans un petit nombre d'échantillons. Aujourd'hui, grâce aux techniques de protéomique à haut débit, il est devenu possible de quantifier plusieurs milliers de protéines dans un grand nombre d'échantillons en seulement quelques semaines. Au cours de mon travail de doctorat, nous avons utilisé la technologie SOMAscan pour mesurer l'expression simultanée de 1310 protéines dans le plasma de 164 patients insuffisants cardiaques.

Afin d'analyser les données obtenues par les analyses protéomiques, j'ai utilisé 2 approches parallèles et complémentaires : la biologie des systèmes et les statistiques. L'utilisation de la biologie des systèmes nous a ainsi permis de construire des réseaux moléculaires représentatifs du remodelage ventriculaire gauche post-infarctus du myocarde et de l'insuffisance cardiaque, à partir des données obtenues par des approches de protéomique classique et de protéomique à haut débit. Ces réseaux permettent une meilleure compréhension des mécanismes de régulation impliqués dans ces pathologies et d'identifier de nouveaux biomarqueurs. Enfin, l'utilisation d'outils statistiques puissants et adaptés permet le traitement du grand nombre de données obtenues par les analyses de protéomique, dans le but d'identifier un petit nombre de protéines pouvant être utilisées comme biomarqueurs du remodelage ventriculaire gauche et de l'insuffisance cardiaque.

Introduction

1 Physiopathologie du cœur

1.1 Le cœur sain

1.1.1 Anatomie du cœur

Le cœur est un organe musculaire creux qui est responsable de la circulation sanguine de l'organisme. La pompe cardiaque permet d'éjecter le sang dans les vaisseaux sanguins afin d'assurer les besoins en oxygène de tous les tissus de l'organisme et d'éliminer les déchets métaboliques tels que le dioxyde de carbone (CO₂).

Anatomiquement, le cœur se compose de 4 cavités distinctes : à droite, l'oreillette droite (OD) et le ventricule droit (VD), et à gauche, l'oreillette gauche (OG) et le ventricule gauche (VG) (Figure 1). Les parties droites et gauches du cœur sont séparées par une paroi appelée septum, pour éviter le mélange du sang oxygéné et du sang non oxygéné. Les oreillettes et les ventricules sont séparés par des valves : à droite, la valve tricuspide qui sépare l'OD et le VD, et à gauche, la valve mitrale qui sépare l'OG et le VG.

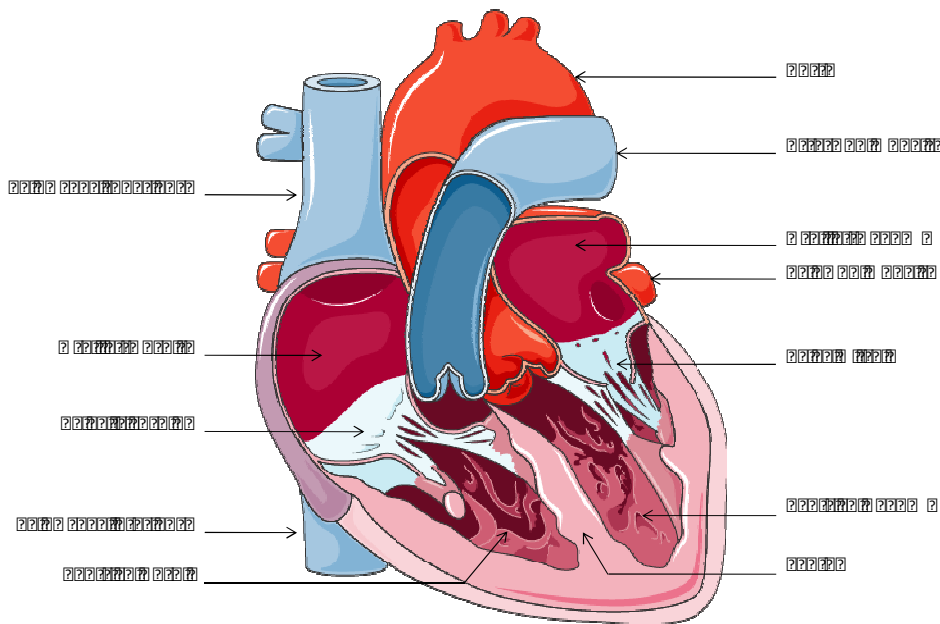


Figure 1 : Représentation schématique de l'anatomie du cœur

Le sang appauvri en oxygène est amené par les veines caves inférieure et supérieure au niveau de l'OD, puis est éjecté dans le VD. La valve tricuspide empêche alors le reflux du sang du VD vers l'OD. Le VD envoie ensuite le sang vers les poumons via l'artère pulmonaire. Le sang y est réapprovisionné en oxygène et déchargé en dioxyde de carbone. Le

sang oxygéné rejoint ensuite l'OG du cœur via les veines pulmonaires, puis est éjecté dans le VG. De la même façon, la valve mitrale empêche le reflux du sang du VG à l'OG. Le sang oxygéné est alors éjecté vers l'organisme via l'aorte (Figure 1). Le VG étant responsable de l'éjection du sang oxygéné vers l'ensemble des organes, il est beaucoup plus puissant que le VD.

A l'échelle tissulaire, le muscle cardiaque est composé de 3 tuniques avec chacune leur propre fonction : le péricarde, le myocarde et l'endocarde (Figure 2).

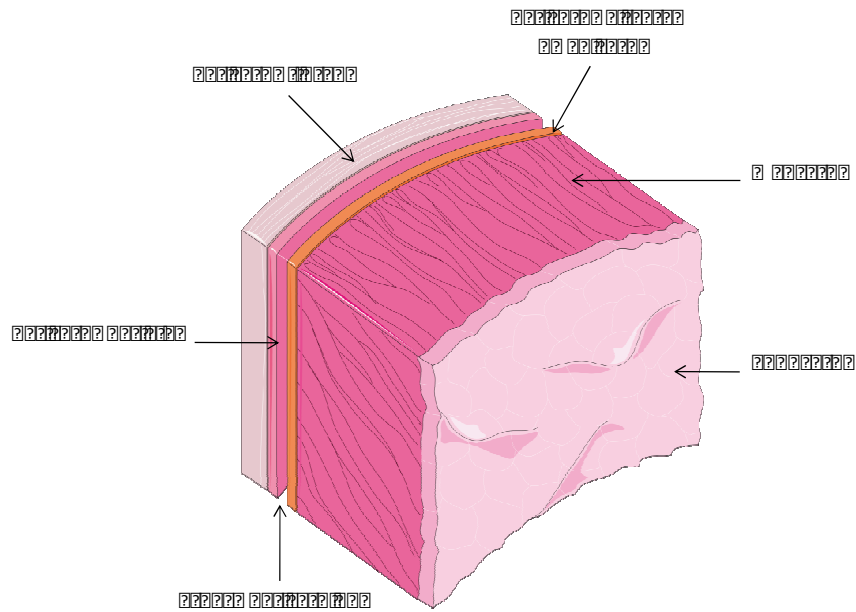


Figure 2 : Représentation schématique des 3 tuniques cardiaques

Le péricarde est une membrane très mince correspondant à l'enveloppe externe du cœur. Il est composé de 2 parties : le péricarde fibreux et le péricarde séreux. Le péricarde fibreux est un tissu conjonctif dense qui enveloppe le péricarde séreux et qui permet de protéger le cœur et de le fixer à la cage thoracique. Le péricarde séreux est quant à lui composé de 2 feuillets : le péricarde viscéral qui est en contact avec le myocarde et le péricarde pariétal aussi appelé épicaarde. Entre les 2 feuillets du péricarde séreux se trouve l'espace péricardique qui contient 50 à 75 mL de liquide péricardique permettant de faciliter les mouvements du cœur.

Le myocarde est la partie musculaire du cœur, constituée d'un muscle strié qui a la capacité de se contracter de manière régulière et autonome et est sensible à des stimulations hormonales et neuronales. Sa contraction permet la circulation sanguine en assurant la vidange et le remplissage des différentes cavités du cœur. Il contient différents types

cellulaires, dont 30 à 40% de cardiomyocytes qui représentent environ 75% du volume cardiaque, ainsi que des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses, des fibroblastes et des cellules immunitaires (Brutsaert, 2003; Tham et al., 2015).

L'endocarde est la tunique interne du cœur qui tapisse la face interne des oreillettes et ventricules. Elle est constituée essentiellement de cellules endothéliales qui sont impliquées dans la régulation de la contraction cardiaque par une activation hormonale endocrine des cardiomyocytes. L'endocarde se prolonge par l'intima de l'aorte et de veines caves inférieure et supérieure.

1.1.2 Le cycle cardiaque

Le cycle cardiaque se déroule en 3 phases distinctes : la systole auriculaire, la systole ventriculaire et la diastole (Figure 3).

Lors de la systole auriculaire, la contraction des oreillettes conduit à l'éjection du sang contenu dans les OD et OG vers respectivement les VD et VG.

Dans un second temps, a lieu la systole ventriculaire qui correspond à la contraction des ventricules. Le sang contenu dans le VD est alors éjecté dans l'artère pulmonaire vers les poumons et le sang contenu dans le VG dans l'aorte vers les organes. La systole ventriculaire se déroule en 2 phases. Lors de la contraction isovolumique, les valves mitrale et tricuspides se ferment, entraînant une augmentation de la pression intra-ventriculaire et une ouverture des valvules sigmoïdes (aortiques et pulmonaires). La seconde phase est la phase d'éjection, aussi appelée contraction isotonique. Le sang est alors expulsé des ventricules. La pression intra-ventriculaire devenant inférieure à la pression artérielle, les valvules sigmoïdes se referment pour empêcher le reflux du sang vers les ventricules.

Enfin, la diastole correspond à la phase de relaxation du myocarde, divisée en 2 phases. Tout d'abord, lors de la relaxation isométrique, la pression intra-ventriculaire inférieure à celle des oreillettes conduit à l'ouverture des valves auriculo-ventriculaires. La 2^e étape correspond au remplissage des OD et OG par le sang provenant, respectivement, des veines caves inférieures et supérieures et des veines pulmonaires. La diastole est suivie par la systole auriculaire et un nouveau cycle cardiaque.

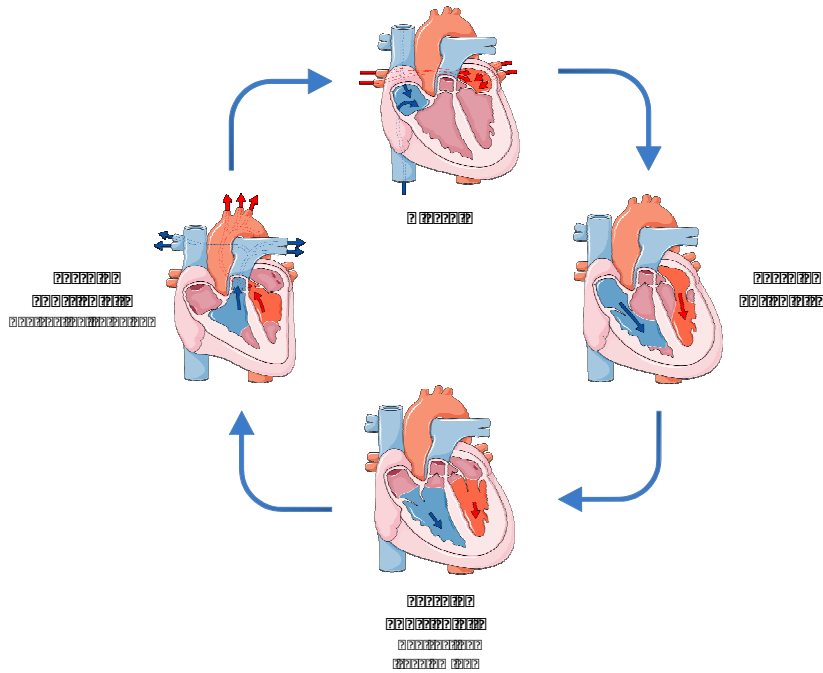


Figure 3 : Représentation schématique du cycle cardiaque

1.2 L'infarctus du myocarde

1.2.1 Définition

L'infarctus du myocarde (IDM) correspond à la nécrose plus ou moins importante du myocarde induite par une ischémie prolongée, correspondant à une diminution de l'apport sanguin en oxygène par les artères coronaires qui irriguent le cœur (Mendis et al., 2011; Thygesen et al., 2019).

L'IDM est en général la conséquence d'une athérosclérose coronaire, qui se caractérise par la formation d'une plaque d'athérome composée principalement de lipides. La rupture de cette plaque d'athérome est à l'origine de l'IDM (Figure 4).

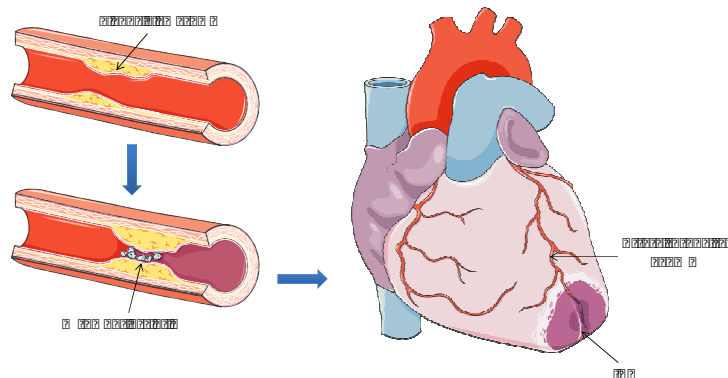


Figure 4 : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans l'IDM

La formation de la plaque d'athérome débute par la pénétration et l'accumulation de lipides, nommés LDL (*Low Density Lipoprotein*), dans l'intima des artères, dont les artères coronaires. Les LDL vont alors s'oxyder et ne pourront plus être dégradés, ce qui entraîne leur accumulation dans les macrophages et une réaction inflammatoire chronique. Les cellules musculaires lisses vont migrer dans l'intima des artères et constituer une chape fibreuse dont l'épaisseur est à l'origine de la rupture de la plaque d'athérome. La rupture de la plaque met en contact le sang circulant avec le sous-endothélium pro-thrombogène et conduit à la constitution d'un thrombus occlusif associé à une réponse inflammatoire. Ces phénomènes conduisent à l'ischémie myocardique (Figure 4).

1.2.2 Epidémiologie

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les cardiopathies ischémiques étaient la principale cause de décès dans la population mondiale en 2016, devant les accidents vasculaires cérébraux (AVC) (Figure 5), et sont responsables de 9,4 millions de décès par an. En 2008, en France, les maladies cardiovasculaires étaient la 2^e cause de mortalité, derrière les tumeurs, et étaient responsables d'environ 150 000 décès par an. Les cardiomyopathies ischémiques sont responsables d'un quart d'entre eux.

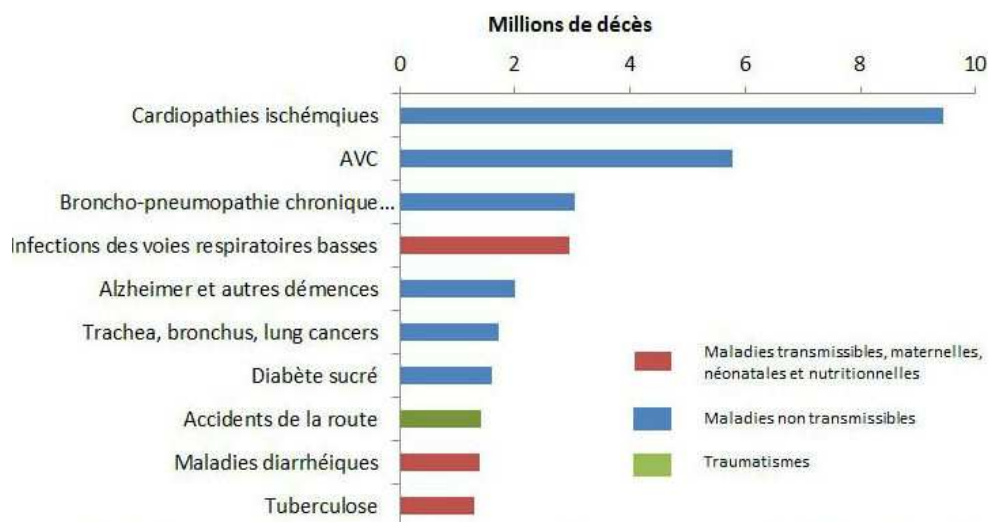


Figure 5 : Répartition des principales causes de décès dans la population mondiale en 2016 (données de l'OMS)

De façon intéressante, en France, les maladies cardiovasculaires restent la 1^{re} cause de mortalité chez les femmes, et la 2^e chez les hommes. Au sein des maladies cardiovasculaires, les cardiopathies ischémiques sont au 2^e rang des pathologies causant le plus de décès (Aouba et al., 2011).

Avant la ménopause, l'incidence des cardiopathies ischémiques est inférieure chez les femmes comparées aux hommes. L'hypothèse prédominante est celle d'un rôle protecteur des œstrogènes sur l'athérosclérose et l'IDM. Cependant, cette différence tend à diminuer depuis plusieurs années, en raison d'une plus grande exposition des femmes à certains facteurs de risques (tabac, obésité...) (Gabet et al., 2016).

En 2012, les IDM étaient responsables de l'hospitalisation de 61 600 patients en France, dont 31% de femmes. La même année, 16 000 patients sont décédés suite à un IDM, dont 6 700 femmes. Entre 2002 et 2012, la mortalité suite à un IDM a baissé de moitié chez les patients âgés de plus de 65 ans, aussi bien chez les hommes que chez les femmes, mais de façon moindre avant 65 ans (Figure 6) (Gabet et al., 2016).

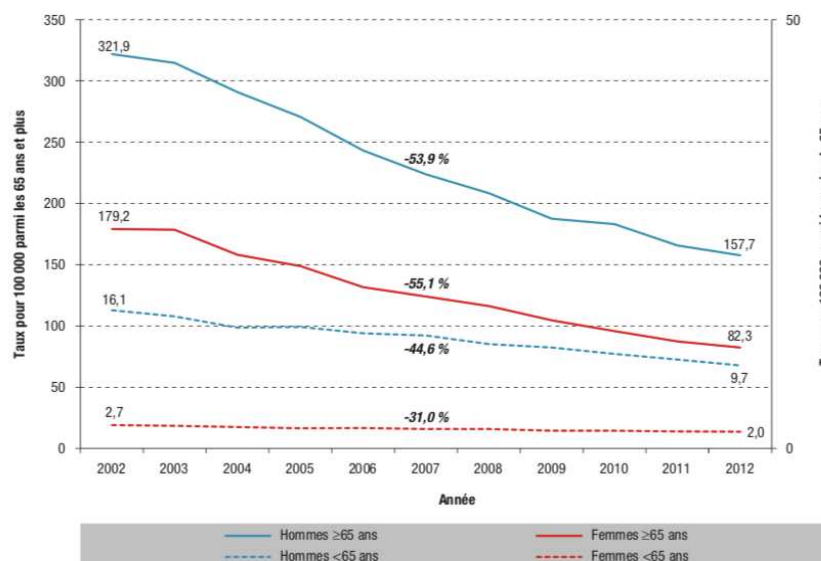


Figure 6 : Evolution du taux de mortalité par infarctus du myocarde selon le sexe et l'âge en France entre 2002 et 2012(d'après Gabet et al., 2016).

1.2.3 Facteurs de risques

L'IDM est une pathologie multifactorielle, conséquence de nombreux facteurs de risque génétiques et environnementaux. Ces facteurs de risque sont communs aux principales pathologies cardiovasculaires liées à l'athérosclérose et sont nommés facteurs de risque

cardiovasculaires. Ils peuvent se diviser en 2 catégories : les facteurs de risque irréversibles et les facteurs de risque réversibles (Mendis et al., 2011).

Les principaux facteurs de risque irréversibles sont l'âge, le sexe et l'hérédité cardiovasculaire (Poulter, 2003). En effet, comme le montre la figure 6, le taux de mortalité à la suite d'un IDM est nettement plus élevé chez les patients âgés de plus de 65 ans (Gabet et al., 2016). Le sexe est également un facteur de risque important de l'IDM. Avant la ménopause, les femmes ont un risque inférieur de survenue et de mortalité de l'IDM comparées aux hommes. Après la ménopause, ce risque tend à augmenter (Figure 6) (Gabet et al., 2016). Enfin, l'hérédité cardiovasculaire (antécédents familiaux) joue également un rôle dans le risque de survenue d'un IDM. Cependant, ce risque a un impact relativement faible, en comparaison des facteurs de risque réversibles.

Les facteurs de risque réversibles sont principalement liés à l'environnement et représentent environ 80% du risque cardiovasculaire. Ces facteurs environnementaux sont très nombreux. Les principaux sont le tabagisme, l'hypertension artérielle (pression artérielle systolique supérieure à 140 mmHg ou pression artérielle diastolique supérieure à 90 mmHg), l'hypercholestérolémie (taux de LDL-cholestérol supérieur à 4,13 mmol/L chez l'homme et 3,87 chez la femme ; ou taux de HDL-cholestérol inférieur à 0,45 g/L chez l'homme et 0,55 g/L chez la femme), l'obésité, le diabète de type 2, le stress et la sédentarité (Poulter, 2003). L'impact de ces facteurs de risque environnementaux sur l'IDM pouvant être réduit, il est important de mettre en place des campagnes de prévention efficaces.

1.2.4 Dépistage et biomarqueurs de l'IDM

En pratique clinique, le premier examen réalisé très rapidement après l'hospitalisation d'un patient avec suspicion d'IDM est l'électrocardiogramme (ECG) (Reddy, 2015; Thygesen et al., 2019). Il permet de réaliser un 1^{er} diagnostic en détectant un trouble de la repolarisation de type sus-décalage du fragment ST.

Il existe également différentes techniques d'imagerie médicale permettant le diagnostic de l'IDM. La plus communément utilisée est l'échocardiographie. Cette technique permet d'évaluer la structure et la fonction cardiaque (Thygesen et al., 2019). En effet, elle permet de mesurer la fraction d'éjection du VG ou encore la taille de la zone infarctée. D'autres techniques d'imagerie peuvent être utilisées pour le diagnostic de l'IDM, telles que l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Cependant, l'IRM est rarement utilisée en

routine en pratique clinique, étant une technique coûteuse et pas disponible dans tous les centres hospitaliers.

Enfin, il existe de nombreux biomarqueurs plasmatiques indispensables pour confirmer le diagnostic de l'IDM. Les principaux, comme la myoglobine, l'isoforme cardiaque de la créatine kinase (CK-MB) et les troponines cardiaques (cTn), sont produits lors de la nécrose des cardiomyocytes et sont donc le reflet de la souffrance du myocarde (Reddy, 2015; Thygesen et al., 2019).

En clinique, le dosage des cTn est préféré à celui de la myoglobine et de la CK-MB. En effet, les troponines T et I (TnT et TnI) ont l'avantage d'être plus spécifiques et plus sensibles, la myoglobine et la CK-MB étant relarguées en cas de souffrance musculaire non spécifique de l'ischémie (Thygesen et al., 2019). De plus, les TnT et TnI sont détectables beaucoup plus longtemps dans le plasma des patients, jusqu'à 6 jours post-IDM contre quelques heures pour la myoglobine et la CK-MB (Figure 7). Enfin, la quantité de cTn libérée dans le plasma a également l'avantage d'être proportionnelle à la taille de la zone infarctée (Park et al., 2017).

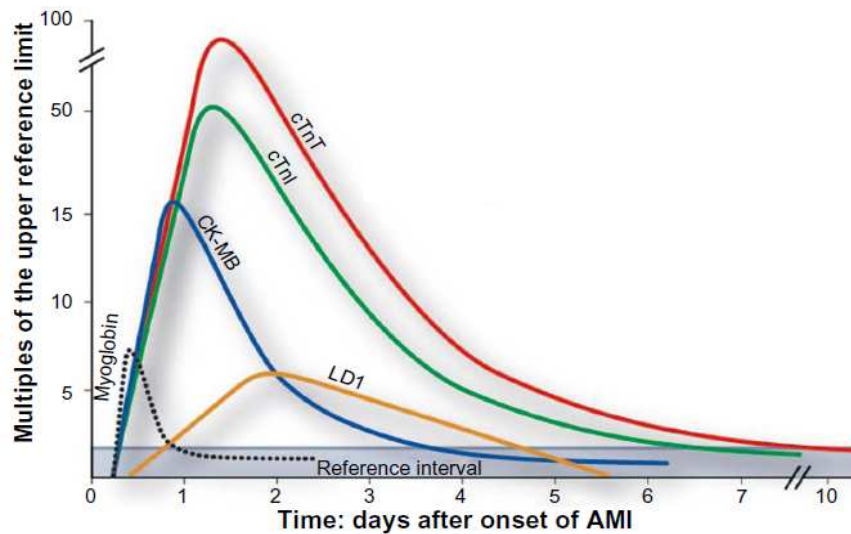


Figure 7 : Cinétique des biomarqueurs plasmatiques de l'IDM. CK-MB : isoforme cardiaque de la créatine kinase, LD1 : lactate déshydrogénase 1, cTnT : troponine T cardiaque, cTnI : troponine I cardiaque (d'après Archan & Fleisher, 2010)

1.3 Le remodelage ventriculaire gauche post-infarctus du myocarde

1.3.1 Définition

Le remodelage cardiaque est un mécanisme biologique pouvant survenir dans des conditions physiologiques, chez les sportifs de haut niveau ou les femmes enceintes par exemple, ou en réponse à un stress, comme l’IDM. Le remodelage ventriculaire gauche (RVG) post-IDM correspond aux modifications biologiques, structurales et fonctionnelles du VG. Dans un 1^{er} temps, il s’agit d’un mécanisme adaptatif compensatoire qui permet de maintenir un volume d’éjection proche de la normale. Cependant, à terme, ce RVG devient délétère. Le RVG peut être divisé en 2 phases : une phase précoce et une phase tardive (Figure8) (St John Sutton and Sharpe, 2000).

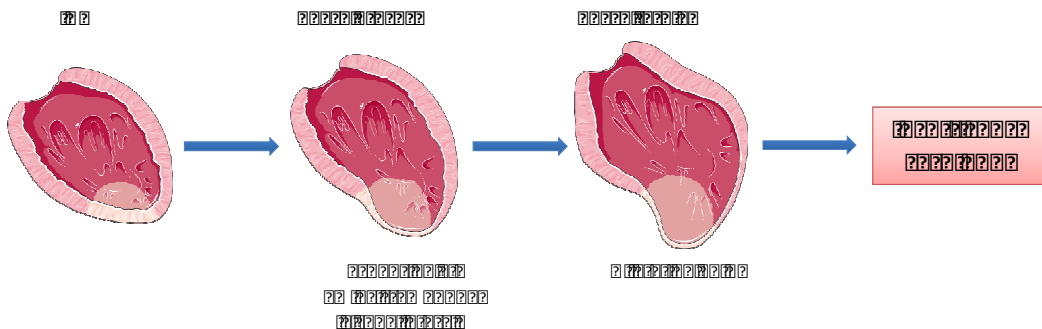


Figure 8 : Représentation schématique des différentes phases du RVG. La zone infarctée est représentée en rose claire.

Au cours de la phase précoce, qui a lieu entre quelques heures et quelques jours après l’IDM, on assiste à une expansion et un amincissement de la zone infarctée, ainsi qu’à une réponse inflammatoire. En effet, on observe la nécrose des cardiomyocytes, ce qui entraîne une infiltration du tissu par des cellules inflammatoires, dont des macrophages qui éliminent les cardiomyocytes nécrosés. L’infiltration des cellules inflammatoires conduit également à une dégradation de la matrice extracellulaire qui maintient l’intégrité du tissu cardiaque, entraînant ainsi l’expansion de la zone infarctée. Dans le même temps, les fibroblastes cardiaques déposent une nouvelle matrice de collagène au niveau de la zone infarctée, pour former un tissu cicatriciel fibreux qui rend la contraction du VG moins efficace (Gajarsa & Kloner, 2011; Bhatt, et al., 2017).

Lors de la phase tardive, qui intervient dans les semaines et les mois suivant l’IDM, on observe une hypertrophie des cardiomyocytes de la zone non infarctée et une augmentation de

la prolifération des fibroblastes cardiaques, ce qui entraîne une dilatation du VG et une perte de ses propriétés contractiles (Gajarsa & Kloner, 2011; Bhatt, et al., 2017).

1.3.2 Mécanismes physiopathologiques du RVG

1.3.2.1 Réexpression du programme fœtal

Au cours du RVG, on observe une réexpression du programme fœtal qui correspond à l'expression des gènes initialement impliqués dans le développement cardiaque embryonnaire (Arai et al., 1993).

Parmi ces gènes, une modulation de l'expression de certaines protéines contractiles a été décrite. En effet, on assiste à une augmentation de l'isoforme β et une diminution de l'isoforme γ de la chaîne lourde de la myosine, ce qui induirait une diminution de la vitesse de contraction du VG (Bernardo et al., 2010). On observe également l'expression de l'isoforme squelettique de l' α -actine à la place de l'isoforme cardiaque, ce qui pourrait altérer la contraction cardiaque (Taegtmeyer et al., 2010).

Enfin, une augmentation de l'expression des peptides natriurétiques de type A et B (ANP pour *Atrial natriuretic peptide* / BNP pour *Brain natriuretic peptide*), dont le rôle est d'inhiber l'hypertrophie, est observée lors du RVG. Ils sont également capables d'inhiber le système rénine-angiotensine-aldostérone ce qui entraîne une vasodilatation et donc une diminution de la pression artérielle (Taegtmeyer et al., 2010).

1.3.2.2 Remodelage de la matrice extracellulaire et fibrose

Le remodelage de la matrice extracellulaire est un des principaux phénomènes participant à l'expansion de la zone infarctée (Spinale, 2002; Spinale, 2007). En conditions physiologiques, la matrice extracellulaire constitue un réseau organisé qui assure le maintien et le bon fonctionnement du tissu cardiaque. Les fibroblastes localisés dans la matrice extracellulaire à proximité des cardiomyocytes produisent les composants de la matrice, en particulier les collagènes de type I et III. Dans le cœur sain, il existe une balance entre la synthèse de nouveau collagène et la dégradation de l'ancien collagène.

Les principales enzymes responsables du remodelage de la matrice extracellulaire sont les MMPs (*Matrix Metalloproteinases*). Il existe actuellement 25 MMPs connues et qui ont toutes pour rôle de dégrader les éléments de la matrice extracellulaire tels que le collagène

(DeLeon-Pennell et al., 2017). Toutes les MMPs sont également activées par fixation d'un ion zinc au niveau de leur site actif, et peuvent être sécrétées dans le milieu extracellulaire. Environ la moitié de ces MMPs ont été décrites dans le RVG, les principales étant les MMP-2 et MMP-9 (Table 1). Les MMPs sont inhibées par des inhibiteurs spécifiques, les TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) (Spinale, 2007; Vanhoutte & Heymans, 2010).

Table 1 : Localisation et activité des MMPs cardiaques

Nom	Localisation cellulaire	Activité	Inhibiteurs
MMP-1	Leucocytes, fibroblastes, cellules endothéliales	Collagénase	TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4
MMP-2	Cardiomyocytes, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, macrophages, fibroblastes	Gélatinase	TIMP-2, TIMP-3
MMP-3	Fibroblastes, macrophages	Stromélysine	TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4
MMP-7	Cellules endothéliales, cardiomyocytes, macrophages	Stromélysine	TIMP-1, TIMP-2, TIMP-4
MMP-8	Neutrophiles, macrophages	Collagénase	TIMP-1, TIMP-2
MMP-9	Cardiomyocytes, cellules endothéliales, neutrophiles, macrophages, fibroblastes	Gélatinase	TIMP-1, TIMP-3, TIMP-4
MMP-12	Macrophages, neutrophiles, cellules endothéliales, fibroblastes, cellules musculaires lisses	Stromélysine	TIMP-1, TIMP-2
MMP-13	Cardiomyocytes, macrophages, fibroblastes	Stromélysine	TIMP-1, TIMP-2

Lors du RVG, la libération de facteurs, tels que le TNF (*Tumor Necrosis Factor* □), certains facteurs de croissance et l'aldostérone, pendant la réponse inflammatoire conduit à une augmentation de l'expression des MMPs dans le myocarde et le plasma des patients. L'augmentation de l'activité des MMPs conduit donc à une dégradation de la matrice extracellulaire à proximité du myocarde et favorise la dilatation du VG.

Le RVG est également responsable de l'activation de voies pro-fibrotiques qui conduisent à une prolifération des fibroblastes cardiaques et leur différenciation en myofibroblastes qui jouent un rôle important dans la réparation du tissu cardiaque. Ces phénomènes conduisent à l'accumulation de collagène au niveau du cœur (Tham et al., 2015).

1.3.2.3 Principales voies de signalisation

Il existe un rôle très important du système neuro-hormonal dans le RVG qui est composé principalement du système sympathique et du système rénine-angiotensine-

aldostérone. L'activation du système sympathique entraîne la libération de catécholamines, en particulier de noradrénaline et d'adrénaline, qui se fixent alors sur les récepteurs α et β adrénergiques. Ce système est responsable d'une augmentation de la fréquence cardiaque.

Le système rénine-angiotensine-aldostérone est activé lors d'une surcharge de pression. Le précurseur de cette voie, l'angiotensinogène, est clivé par la rénine pour former l'angiotensine I. Ensuite, l'angiotensine I est à son tour clivée en angiotensine II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). L'angiotensine II se fixe sur le récepteur I à l'angiotensine et conduit à la production d'aldostérone (Figure 9). On observe alors une rétention de sodium et d'eau qui entraîne une vasoconstriction, une fibrose cardiaque et une hypertrophie cardiaque.

Ces deux voies sont la cible des principaux traitements du RVG actuels, tels que les inhibiteurs de l'ACE pour la voie rénine-angiotensine-aldostérone et les bêta-bloquants pour le système sympathique (Buggey et al., 2015).



Figure 9 : Le système rénine-angiotensine-aldostérone. Ang I : angiotensine I, Ang II : angiotensine II, ATR1 : récepteur de type 1 à l'angiotensine.

Les voies de signalisation impliquant les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) ont également un rôle essentiel dans le RVG et l'IC. Les GPCR sont une famille de protéines transmembranaires activées par de multiples facteurs de stress cardiaque, tels que l'angiotensine II et la noradrénaline. Ils activent ensuite d'autres protéines de signalisation, dont la phospholipase C (PLC), la protéine kinase C (PKC) et les MAPKs (*Mitogen-Activated*

Protein Kinase) (Bernardo et al., 2010). Les GPCR sont aussi associés à une augmentation de l'activation de la voie CaMKII (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II) qui conduit à une augmentation du calcium intracellulaire (Anderson et al., 2011).

L'AMPK (*Adenosine monophosphate-activated protein kinase*) est un régulateur particulièrement important du métabolisme énergétique du cœur (Kim and Dyck, 2015). Elle est activée par une augmentation de la quantité d'AMP cellulaire, une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou encore l'altération de la concentration en calcium. Elle active ensuite de multiples cibles qui permettent la régulation de l'homéostasie énergétique du cœur, telles que PGC1 (*Peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1*), FoxOs (*Forkhead Box O*) ou PPAR (*Peroxisome proliferator activated receptor gamma*) (Tham et al., 2015).

Enfin, la voie Gp130 (*Glycoprotein 130*)/JAK (*Janus Kinase*)/STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) est également impliquée dans le développement du RVG et de l'IC. Cette voie est activée par l'interleukine 6 produite par les cardiomyocytes en réponse à un stress cardiaque (Shi and Wei, 2012). Elle induit ensuite la transcription de gènes anti-apoptotiques, de gènes impliqués dans l'élimination des ROS et de gènes favorisant l'angiogénèse. Cependant, une activation excessive de la voie Gp130/JAK/STAT conduit à un stress oxydant et une inflammation, impliqués dans la progression du RVG et de l'IC (Shi and Wei, 2012).

1.3.2.4 Métabolisme énergétique

Le cœur est un des organes qui nécessitent le plus d'énergie et représente 11% de la consommation totale d'oxygène du corps. Cependant, les cardiomyocytes ne disposent que de faibles réserves d'ATP, ils doivent donc produire une grande quantité d'ATP en permanence. Cette synthèse est assurée par les mitochondries qui représentent environ 30% du volume des cardiomyocytes. En conditions physiologiques, entre 60 et 90% de l'ATP est produit via la -oxydation des acides gras, le reste étant produit principalement par la glycolyse (Tham et al., 2015). De façon très minoritaire, le lactate, les acides aminés et les corps cétoniques peuvent être utilisés comme sources d'énergie.

Les mitochondries sont le siège des phosphorylations oxydatives. La -oxydation des acides gras et la glycolyse conduisent à la production d'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) qui est ensuite utilisé par le cycle de Krebs et conduit à la synthèse de NADH (nicotinamide adénine dinucléotide réduit). Au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie, la

réoxydation du NADH est accompagnée de la création d'un gradient de protons qui permet la production d'ATP (Ventura-Clapier, et al., 2011; Lopaschuk, 2017) (Figure 10). Dans les cardiomyocytes, la créatine kinase mitochondriale, située au niveau de la membrane mitochondriale interne, transforme la majorité de l'ATP produit en phosphocréatine et permet ainsi sa sortie de la mitochondrie vers le cytoplasme. Dans le cytoplasme, l'ADP est rephosphorylé en ATP à partir de la phosphocréatine, et peut ainsi être utilisé comme source d'énergie par la cellule (Saks et al., 1991).

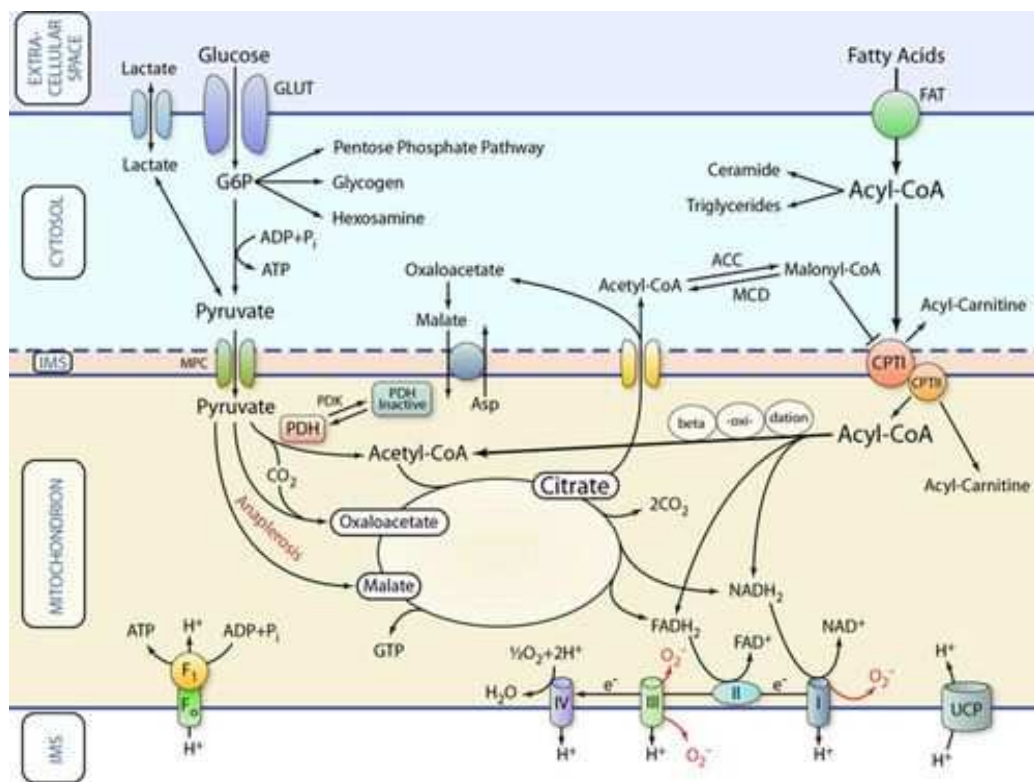


Figure 10 : Représentation schématique du métabolisme cardiaque(d'après Doenst, et al., 2013)

Lors du RVG, en raison de la diminution de la quantité d'oxygène disponible au niveau du cœur, on observe un changement de substrat pour la production d'énergie, aussi appelé « *shift* métabolique ». En effet, on constate une diminution de l'oxydation des acides gras et une augmentation progressive de la glycolyse (Lopaschuk, 2017). Ces changements s'expliquent par le fait que la glycolyse est moins gourmande en oxygène que la β -oxydation des acides gras, en condition d'hypoxie non ischémique. Cependant, cela entraîne une diminution de la quantité d'ATP produite (Tham et al., 2015). Par ailleurs, on observe une augmentation du nombre de petites mitochondries, due à une augmentation de la fission

mitochondriale, et une diminution de l'expression des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale (Doenst et al., 2013).

1.3.2.5 Stress oxydant

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre la synthèse de ROS, telles que les radicaux libres de l'oxygène (l'anion superoxyde O_2^- , le radical hydroxyle OH^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les hypochlorites (OCl^-), par les cardiomyocytes et les capacités anti-oxydantes du cœur (Münzel et al., 2015; Tham et al., 2015). Les ROS ont des effets toxiques et peuvent être impliquées dans l'oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN.

En conditions physiologiques, les ROS sont produites au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale dans les cardiomyocytes ou par les NADPH oxydases et la xanthine déshydrogénase / xanthine oxydase dans les cellules endothéliales. Les ROS ainsi produites sont prises en charge par les enzymes anti-oxydantes. L'anion superoxyde est pris en charge par les superoxydes dismutases (SOD) pour être réduit en H_2O_2 , qui est lui même réduit en eau par les catalases, les peroxyrédoxines et la glutathion peroxydase (Figure 11) (Tsutsui, et al., 2009; Ayoub, et al., 2017).

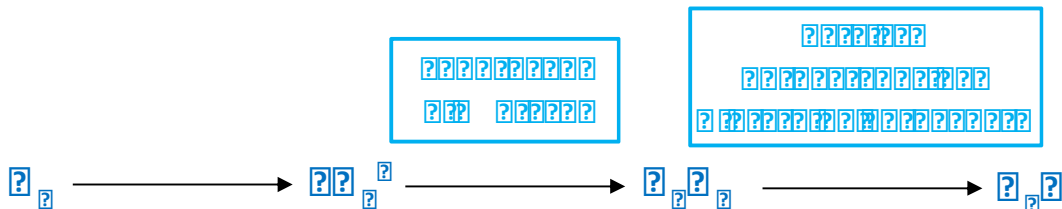


Figure 11 : Mécanismes de production et de détoxification des ROS

Lors du RVG, un excès de ROS est produit au cours de la réponse inflammatoire post-IDM. Cette quantité élevée de ROS est associée au développement de l'hypertrophie et de la fibrose cardiaque, ainsi qu'à l'apoptose des cardiomyocytes et à la perte de contractilité (Tham et al., 2015).

1.3.2.6 Inflammation post-IDM

L’IDM induit l’activation du système immunitaire inné qui entraîne une réponse inflammatoire. A court terme, il s’agit d’une réponse inflammatoire adaptative qui participe à la cicatrisation du tissu cardiaque en favorisant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Cependant, à long terme, l’inflammation devient chronique et conduit à des dommages tissulaires et à un remodelage cardiaque délétère.

La phase inflammatoire est initiée par la mort des cardiomyocytes. Ces cellules relarguent des alarmines, aussi appelées DAMPs (*Danger-Associated Molecular Pattern*), qui reconnaissent des récepteurs spécifiques à la surface des cellules immunitaires, comme HMGB1 (*High-Mobility Group Box 1*), l’interleukine (IL) 1 et les protéines de choc thermique (HSP pour *Heat shock protein*) (Chen and Frangogiannis, 2017). Les alarmines activent ensuite les cellules immunitaires du myocarde infarci et entraînent les cascades pro-inflammatoires dans les fibroblastes et les cellules endothéliales en activant les récepteurs de mort cellulaire de type Toll (TLR pour *Toll like receptor*). On observe alors une activation des MAPKs et du NF κ B (*Nuclear Factor κ B*) qui entraînent l’expression d’un grand nombre de gènes pro-inflammatoires tels que les cytokines inflammatoires (TNF α , IL-1, IL-6 et IL-18), les chémokines et les molécules d’adhésion (VCAM, ICAM et sélectines) au niveau des cellules endothéliales. Ces protéines d’adhésion permettent le recrutement de leucocytes au niveau du myocarde lésé (Prabhu and Frangogiannis, 2016) (Figure 12).

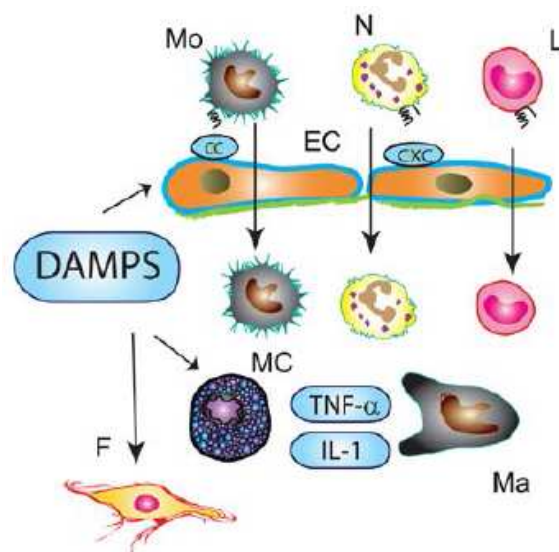


Figure 12 : Représentation schématique de la réponse inflammatoire post-IDM. DAMPS : *Danger-Associated Molecular Pattern*, Mo : Monocyte, N : Neutrophile, L : Lymphocyte, Ma : Macrophage, MC : Mast Cell, F :Fibroblaste (d'après Chen & Frangogiannis, 2017)

Au cours du RVG, cette réponse inflammatoire conduit à la détérioration de la fonction contractile, ainsi qu'à une augmentation de la synthèse des ROS, de l'apoptose et de la fibrose au niveau du myocarde (Tham et al., 2015).

1.3.2.7 Mort cellulaire

Dans le cœur sain, la régénération cellulaire et le taux de mort cellulaire sont très limités (Tham et al., 2015). Cependant, lors d'une maladie cardiaque, on observe à une augmentation du taux d'apoptose des cardiomyocytes. Il existe 2 voies d'activation de l'apoptose. La voie intrinsèque est induite par divers stress tels que la privation en facteurs de croissance, le stress oxydant et l'hypoxie. La voie extrinsèque de l'apoptose est quant à elle activée par les récepteurs de mort cellulaire après fixation de ligands tels que FasL (*Fas Ligand*), TNF (*Tumor Necrosis Factor*) ou TRAIL (*Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*) (Marín-García, 2016).

Après un IDM, on observe également une perte importante de cardiomyocytes par nécrose, ce qui altère les capacités contractiles du myocarde au cours du RVG.

Enfin, l'autophagie pourrait également contribuer à la mort des cardiomyocytes et participer au développement du RVG. Elle est activée en condition de stress, telles que l'ischémie-reperfusion ou la privation en nutriments. Dans un 1^{er} temps, l'autophagie est une réponse adaptative qui permet de recycler les composants intracellulaires et d'éliminer les organites endommagés ou les protéines mal-conformées. Cependant, une autophagie excessive conduit à une dysfonction et à la mort cellulaire (Tannous, et al., 2008; Marín-García, 2016).

1.3.2.8 Protéines contractiles

Le sarcomère est l'unité contractile de base du myocarde et est le résultat de l'assemblage des protéines contractiles. Le sarcomère est composé de plusieurs bandes visibles en microscopie électronique (Sweeney and Hammers, 2018) : la bande anisotrope (bande A), la bande isotrope (bande I), la zone H (*Hensen*), la ligne M (*Mittlemembrane*), la ligne Z (*Zwischenscheibe*) (Figure 13).

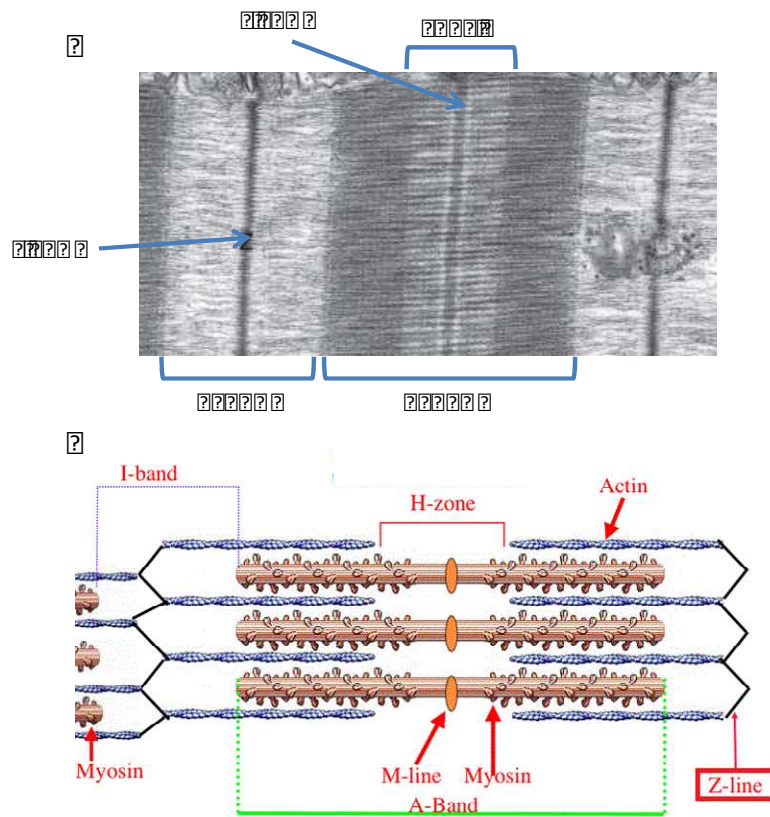


Figure 13 : Visualisation en microscopie électronique (A) et représentation schématique(B) du sarcomère (d’après Sweeney & Hammers, 2018)

La bande A est composée principalement des assemblages actine-myosine, des troponines C, T et I (TnC, TnT et TnI), et de la tropomyosine. La myosine constitue le filament épais, alors que l’actine, les troponines et la tropomyosine forme le filament fin. L’actine est polymérisée sous forme de double hélice et est l’une des protéines principalement impliquée dans la contraction musculaire (Pollard, 2016). Les troponines se lient à l’actine et sont impliquées dans la liaison au calcium, responsable de l’initiation de la contraction cardiaque (Sweeney and Hammers, 2018). La myosine est également responsable de l’hydrolyse de l’ATP nécessaire à la contraction musculaire (Sweeney and Holzbaur, 2018).

La bande I est constituée de l’ α -actinine, de la desmine, de la protéine C et de la titine. Le rôle de l’ α -actinine est principalement de faire le lien avec l’actine. La desmine permet de faire le lien entre les protéines contractiles et certains organites, tels que le noyau, les mitochondries et le réticulum endoplasmique, ou la matrice extracellulaire. Enfin, la titine est une protéine de très haut poids moléculaire qui permet de faire le lien entre l’ α -actinine et les lignes Z et M du sarcomère (Granzier and Labeit, 2002).

La zone H correspond à la partie de la bande A composée uniquement de filaments épais. Au sein de la zone H, la ligne M correspond à la liaison entre 2 filaments épais. Enfin, la ligne Z correspond à la zone de liaison des filaments fins (Sweeney and Hammers, 2018).

Au cours du RVG, on observe une perte des capacités contractiles du myocarde liée à une modulation de l'expression ou de la régulation post-traductionnelle de ces protéines sarcomériques (Yar et al., 2014). En effet, une diminution de l'expression de l'isoforme de la chaîne lourde de la myosine est associée à une augmentation de l'expression de son isoforme pendant le RVG (Bernardo et al., 2010). De même, une modulation de l'expression ventriculaire de la chaîne légère de la myosine est observée (Krenz and Robbins, 2004). De plus, on assiste à une réexpression de la forme squelettique de l'actine au niveau du myocarde pendant le RVG (Taegtmeyer et al., 2010). Enfin, l'expression de la TnT est également modulée au cours du RVG (Yin et al., 2015).

1.3.3 Epidémiologie

Les études REVE et REVE-2 ont montré que, suite à un IDM, au moins 30% des patients développent un RVG (Savoie, et al., 2006; Fertin, et al., 2010). Récemment, le suivi à long terme des patients des études REVE et REVE-2 a montré que, malgré les traitements très largement prescrits, le RVG reste associé à l'insuffisance cardiaque et à la mort de cause cardiovasculaire (Bauters et al., 2017) (Figure 14).

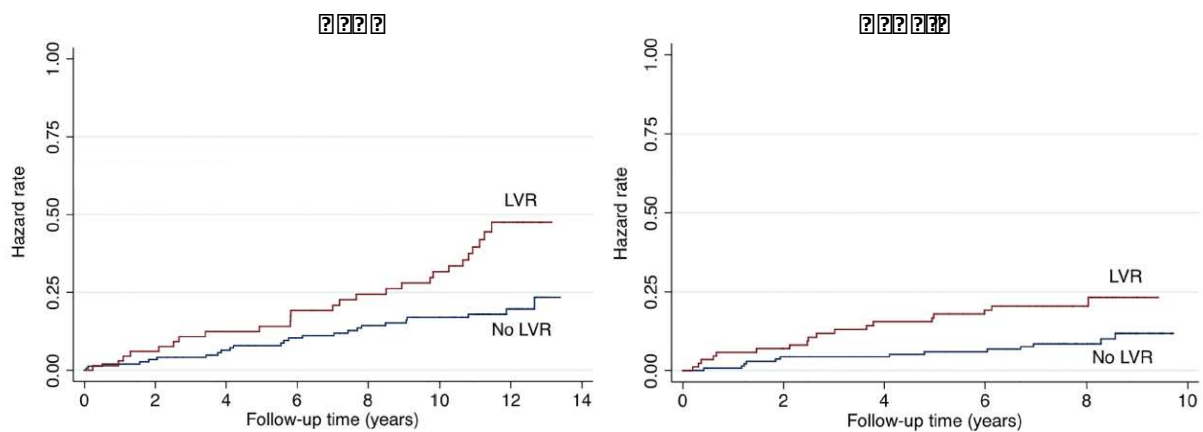


Figure 14 : Courbes de Kaplan-Meier pour le décès de cause cardiovasculaire ou l'hospitalisation pour insuffisance cardiaque, pour les études REVE et REVE-2 (d'après Bauters, et al., 2017)

De nombreux facteurs peuvent impacter la prévalence et le développement du RVG : la taille et la localisation de l'IDM, l'épaisseur de la zone infarctée ou encore la composition en collagène de type III de la cicatrice fibreuse. Le risque de développer un RVG est également augmenté chez les patients ayant des antécédents d'IDM. L'efficacité de la reperfusion myocardique après l'IDM peut aussi être un facteur impliqué dans le développement du RVG. Enfin, la diminution de la fraction d'éjection du ventricule gauche et la présence de facteurs de risque cardiovasculaires sont des facteurs aggravant du RVG.

Les principales méthodes de dépistage du RVG sont l'échocardiographie et l'IRM. Ces 2 techniques permettent de mesurer les volumes télédiastolique et télésystolique du VG, ce qui permet de calculer la fraction d'éjection du VG (FEVG). Ces techniques permettent également de déterminer l'étendue et la localisation du RVG.

1.4 Insuffisance cardiaque

1.4.1 Définition

L'insuffisance cardiaque (IC) se définit comme une anomalie cardiaque structurelle et/ou fonctionnelle qui conduit à une incapacité du cœur à fournir un débit sanguin suffisant pour assurer les besoins métaboliques de l'organisme aussi bien à l'effort qu'au repos (Ponikowski et al., 2016). L'IC se caractérise par des symptômes tels que l'essoufflement et la fatigue, ainsi que des signes cliniques comme une élévation de la pression de la veine jugulaire et des œdèmes périphériques.

L'IC peut être la conséquence de diverses pathologies cardiaques, telles que l'IDM, une cardiomyopathie dilatée, une cardiomyopathie hypertrophique, une hypertension artérielle, une myocardite, une valvulopathie... Il existe principalement 2 types d'IC, différenciées par la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) au moment du diagnostic : l'IC à fraction d'éjection préservée (FEVG normale à environ 60%) et l'IC systolique à FEVG réduite (inférieure à 50-40%) (Ponikowski et al., 2016). La FEVG est calculée en divisant le volume d'éjection par le volume télédiastolique du VG. L'IC systolique correspond à une diminution de la puissance d'éjection du VG, qui présente donc des difficultés à projeter le sang vers l'aorte. Au contraire, en cas d'IC à fraction d'éjection préservée, le cœur éprouve des difficultés à se remplir en sang oxygéné.

La classification NYHA (*New York Heart Association*) permet un classement de l'IC en fonction des symptômes et de la sévérité de la pathologie (Ponikowski et al., 2016) (Table 2).

Table 2 : Classification de l'IC systolique selon les critères de la NYHA

Stade NYHA	Caractéristiques
Stade I	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de symptôme • Pas de limitation de l'activité physique ordinaire
Stade II	<ul style="list-style-type: none"> • Limitation modeste de l'activité physique : <ul style="list-style-type: none"> - A l'aise au repos - Une activité ordinaire entraîne de la fatigue, des palpitations, un essoufflement
Stade III	<ul style="list-style-type: none"> • Limitation importante de l'activité physique : <ul style="list-style-type: none"> - A l'aise au repos - Une activité physique moins importante qu'à l'accoutumée entraîne de la fatigue, des palpitations, un essoufflement
Stade IV	<ul style="list-style-type: none"> • Limitation sévère de l'activité physique (symptômes même au repos)

1.4.2 Epidémiologie

De nos jours, l'IC représente un enjeu de santé publique majeur, augmenté par le vieillissement de la population. Dans les pays développés, la prévalence de l'IC est de 1 à 2% de la population adulte (Ponikowski et al., 2016). Cette prévalence dépasse les 10% chez les personnes âgées de plus de 70 ans (Ponikowski et al., 2016). Il a été montré que les patients présentant une IC à FEVG préservée sont souvent plus âgés, sont plus souvent des femmes et ont en général moins d'antécédents d'IDM.

Le taux de mortalité associé à l'IC reste élevé malgré une meilleure prise en charge des patients. En effet, les dernières données européennes (*ESC-HF pilot study*) ont montré un taux de mortalité dans l'année suivant le diagnostic de 17% et un taux de hospitalisation de 44% chez les patients IC hospitalisés pour une IC aiguë, et un taux de mortalité de 7% et un taux d'hospitalisation de 32% chez les patients atteints d'IC chronique (Maggioni et al., 2013). La figure 15 montre l'évolution de la mortalité et de la réhospitalisation dans les mois suivant le diagnostic de l'IC.

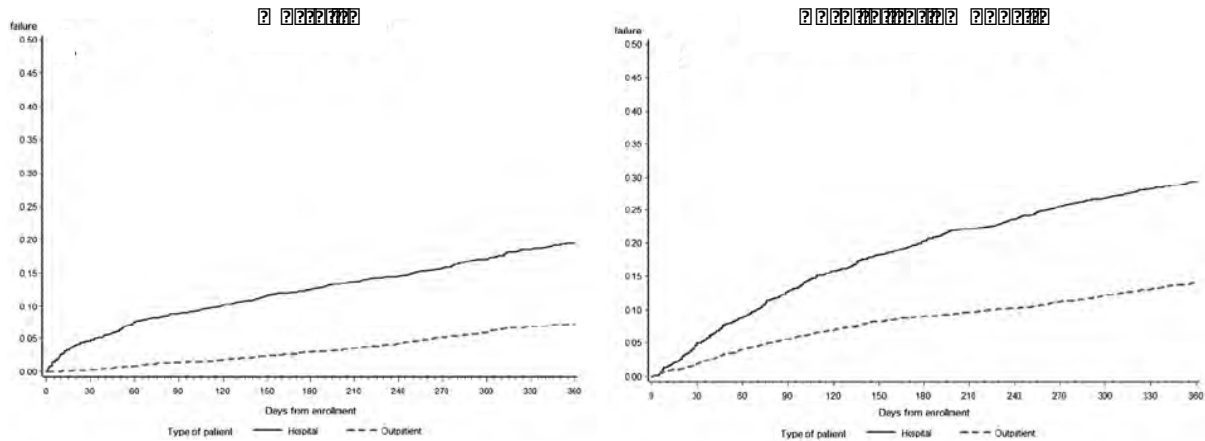


Figure 15 : Courbes de Kaplan-Meier pour la mortalité des patients IC (A) et l’hospitalisation pour IC (B) (d’après Maggioni, et al., 2013). La ligne continue représente les patients hospitalisés pour une IC aigüe et la ligne en pointillés les patients présentant une IC chronique.

L’IDM et le RVG sont connus comme étant des facteurs de risque importants de l’IC. En effet, il a été montré que 30% des patients développent une IC dans les 6 à 7 ans suivant un IDM. Le suivi à long terme de patients des études REVE et REVE-2 a mis en évidence que, malgré l’amélioration des traitements, le RVG reste toujours fortement associé à l’IC (Bauters et al., 2017).

Il a été montré que l’incidence de l’IC est moins élevée chez les femmes que chez les hommes avant 85 ans. Passé l’âge de 85 ans, la tendance s’inverse avec un risque d’IC plus élevé chez les femmes que chez les hommes (Magnussen et al., 2019). Ces différences entre les hommes et les femmes pourraient être dues en partie à des facteurs de risque différents. En effet, même si le surpoids et l’obésité sont des facteurs de risque communs aux 2 sexes, chez les hommes, certains facteurs de risque sont augmentés, comme la pression artérielle et les niveaux de CRP (*C reactive protein*) et de NT-proBNP (Magnussen et al., 2019). Du plus, les œstrogènes auraient un rôle cardioprotecteur chez les femmes pré-ménopausées.

1.4.3 Dépistage et biomarqueurs de l’IC

Les symptômes présentés par les patients ne sont souvent pas spécifiques à l’IC, et sont donc difficilement utilisables pour un diagnostic précis. Les biomarqueurs les plus utilisés en pratique clinique sont les peptides natriurétiques : le BNP (*Brain Natriuretic Peptide*) et le NT-proBNP (fragment N-terminal du proBNP) (Ponikowski et al., 2016). Ces peptides sont synthétisés par les cardiomyocytes soumis à un stress (Braunwald, 2009), sous la forme du pro-BNP composé de 108 acides aminés, et qui est ensuite clivé en NT-proBNP

composé de 76 acides aminés et en BNP de 32 acides aminés (Figure 16). D'un point de vue biologique, le BNP se fixe sur le récepteur du facteur natriurétique auriculaire et inhibe le système rénine-angiotensine-aldostérone et le système nerveux sympathique, ce qui entraîne une vasodilatation artérielle et une augmentation de la diurèse (Braunwald, 2009).

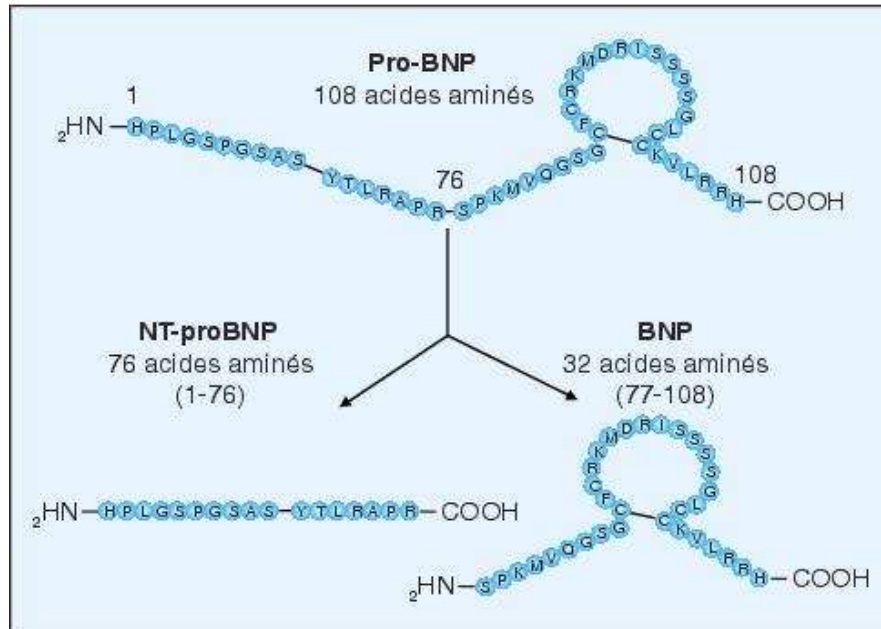


Figure 16 : Biosynthèse du BNP. Le pro-BNP est clivé en NT-proBNP et BNP

Il a été montré que les taux de BNP et de NT-proBNP sont augmentés chez les patients IC (à FEVG réduite ou préservée) (Ponikowski et al., 2016). Cependant, le dosage de ces peptides natriurétiques n'est pas suffisant pour établir un diagnostic d'IC. En effet, des causes non cardiovasculaires, telles que l'âge et l'insuffisance rénale, peuvent augmenter les taux de BNP et de NT-proBNP (Maisel et al., 2008). De plus, ces 2 marqueurs sont souvent très faibles chez les patients souffrant d'obésité (Madamanchi et al., 2014).

Un ECG anormal peut aussi orienter vers un diagnostic d'IC et donner des informations sur l'étiologie de l'IC. Enfin, l'échocardiographie reste la technique d'imagerie la plus utilisée pour le diagnostic de l'IC. En effet, elle fournit des informations sur les volumes des différentes chambres, l'épaisseur des parois, ou encore sur les fonctions systolique et diastolique des ventricules.

Une épreuve d'effort métabolique peut également être réalisée chez certains patients. Elle permet de mesurer la consommation maximale en O_2 (pic de VO_2), qui est un facteur pronostique très performant.

L'utilisation de ces différentes techniques permet d'aboutir à un diagnostic d'IC.

1.4.4 Traitements de l'IC

Il existe plusieurs traitements pharmacologiques de l'IC, dont la plupart repose sur l'inhibition des voies neuro-hormonales. Les traitements de base de l'IC sont les inhibiteurs de l'ACE et les β -bloquants, en particulier pour l'IC systolique. Ces traitements ont montré une amélioration des symptômes et une diminution de la mortalité des patients. Il existe d'autres traitements comme les antagonistes du récepteur à l'aldostérone ou à l'angiotensine II. Les diurétiques sont également très couramment utilisés en pratique clinique. Enfin, en cas d'IC très sévère, une transplantation cardiaque peut s'avérer nécessaire.

En parallèle de ces traitements, les pathologies associées (hypertension artérielle, diabète, cholestérol...) doivent également être traitées.

2 Recherche de biomarqueurs

2.1 Définition du biomarqueur

Selon la *Food and Drug Administration* (FDA) et le *National Institutes of Health* (NIH), un biomarqueur se définit comme un indicateur mesurable de processus biologiques normaux, de processus pathogéniques ou de réactions pharmacologiques à une intervention thérapeutique (Califf, 2018).

Il existe différents types de biomarqueurs en fonction de leurs applications : les biomarqueurs diagnostiques, les biomarqueurs de suivi, les biomarqueurs prédictifs et les biomarqueurs pronostiques. Un même biomarqueur peut appartenir à plusieurs catégories différentes.

Un biomarqueur diagnostique permet de détecter ou de confirmer la présence d'une pathologie ou d'identifier le sous-type d'une pathologie. C'est par exemple le cas des troponines qui permettent le diagnostic de l'IDM. Un biomarqueur de monitoring peut être mesuré de façon sériée pour évaluer le statut, l'évolution d'une maladie. Par exemple, la mesure des taux de LDL permet de suivre l'évolution de l'hypercholestérolémie. Un biomarqueur prédictif permet d'identifier des individus susceptibles de développer une maladie ou de répondre de façon favorable ou défavorable à un traitement médical. Enfin, un biomarqueur pronostique permet de déterminer la probabilité de survenue d'un événement clinique, d'une rechute ou d'une progression de la maladie (Califf, 2018).

Un bon biomarqueur doit répondre à 3 critères (Braunwald, 2009). Tout d'abord, un biomarqueur doit pouvoir être mesuré de façon rapide, reproductible et à faible coût en pratique clinique. Ensuite, il doit fournir une information supplémentaire indisponible lors d'un examen clinique classique. Enfin, il doit apporter une aide au diagnostic ou au pronostic.

Dans les décennies précédentes, la recherche reposait principalement sur l'identification de biomarqueurs individuels. Cependant, les maladies cardiovasculaires étant souvent multifactorielles, on s'oriente maintenant vers la recherche de panels de biomarqueurs, qui reflètent mieux la complexité des mécanismes mis en jeu. Ceci est facilité par le développement des analyses « omiques » à haut débit (génomique, protéomique, métabolomique...).

Le processus de recherche d'un biomarqueur débute toujours par une question scientifique à laquelle on cherche à répondre. Ensuite, il convient de sélectionner les échantillons les plus adaptés pour répondre à la question posée. Sur ces échantillons sont ensuite réalisées différentes analyses, telles que des analyses de protéomique. Les données obtenues doivent alors être traitées et analysées statistiquement pour ensuite sélectionner des potentiels biomarqueurs. Enfin, ces biomarqueurs sélectionnés doivent être validés dans une nouvelle population de patients (Figure17) (Suppers et al., 2018).

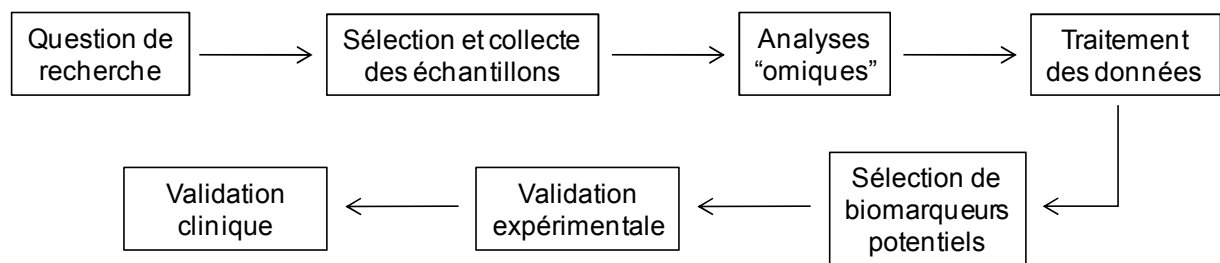


Figure17 : Processus de recherche de biomarqueurs

Les biomarqueurs biologiques peuvent être de différents types. Il peut s'agir d'ADN, d'ARN ou de protéines. La découverte de ces biomarqueurs nécessite l'utilisation respectivement de techniques de génomique, de transcriptomique ou de protéomique.

L'étude REVE, ayant inclus des patients post-IDM, a été utilisée pour étudier l'association de polymorphismes génétiques et le développement du RVG post-IDM (Bauters et al., 2007). Les polymorphismes ont été sélectionnés par une approche gène-candidat. Trois systèmes décrits comme étant impliqués dans le RVG ont été étudiés : le système rénine-angiotensine-aldostérone, le système adrénergique et le système MMP. Onze gènes candidats ont ainsi été sélectionnés : ACE, récepteur à l'angiotensine II, angiotensinogène, aldostérone

synthase, récepteur adrénergique de type 1, récepteur adrénergique de type 2, le récepteur adrénergique 2c, MMP1, MMP2, MMP3 et MMP9. Il a été montré qu'aucun de ces polymorphismes n'était associé au développement du RVG et ne permettait donc pas d'identifier les patients avec un risque élevé de développer un RVG post-IDM. Il a donc été décidé de réaliser des analyses protéomiques afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs du RVG.

Au laboratoire, nous nous intéressons donc à la sélection de protéines pouvant être de potentiels biomarqueurs du RVG et de l'IC par des approches de protéomique, mais aussi aux mécanismes régulant l'expression et l'activité des protéines, telles que les ARNs non codants et les modifications post-traductionnelles des protéines.

2.2 Approches de protéomique

L'analyse protéomique est une méthode d'identification de biomarqueurs sans *a priori*. Il s'agit d'une analyse quantitative et qualitative de l'ensemble des protéines présentes dans un échantillon biologique obtenu dans des conditions définies à un temps donné, appelé protéome.

Historiquement, la recherche de biomarqueurs reposait en particulier sur la génomique, mais la protéomique prend désormais de plus en plus d'importance. En effet, elle permet de prendre en compte la fonction des protéines, reflétée par les modifications post-traductionnelles, l'épissage alternatif, les interactions protéine-protéine, ou encore le renouvellement des protéines.

2.2.1 Evolution des approches de protéomique

Les approches de protéomique ont connu une importante évolution ces dernières années, qui s'accompagne d'une augmentation exponentielle du nombre de protéines étudiées dans un même échantillon. Les techniques les plus classiques, telles que le Western Blot ou l'ELISA, permettent l'étude d'une seule protéine dans un échantillon. La technologie Multiplex permet de quantifier une vingtaine de protéines dans un même échantillon. Les techniques reposant sur la spectrométrie de masse permettent, quant à elles, l'identification de 300 à 1000 peptides. Aujourd'hui, les techniques de protéomique à haut débit permettent le

dosage de plusieurs milliers de protéines simultanément dans un même échantillon (Figure 18).

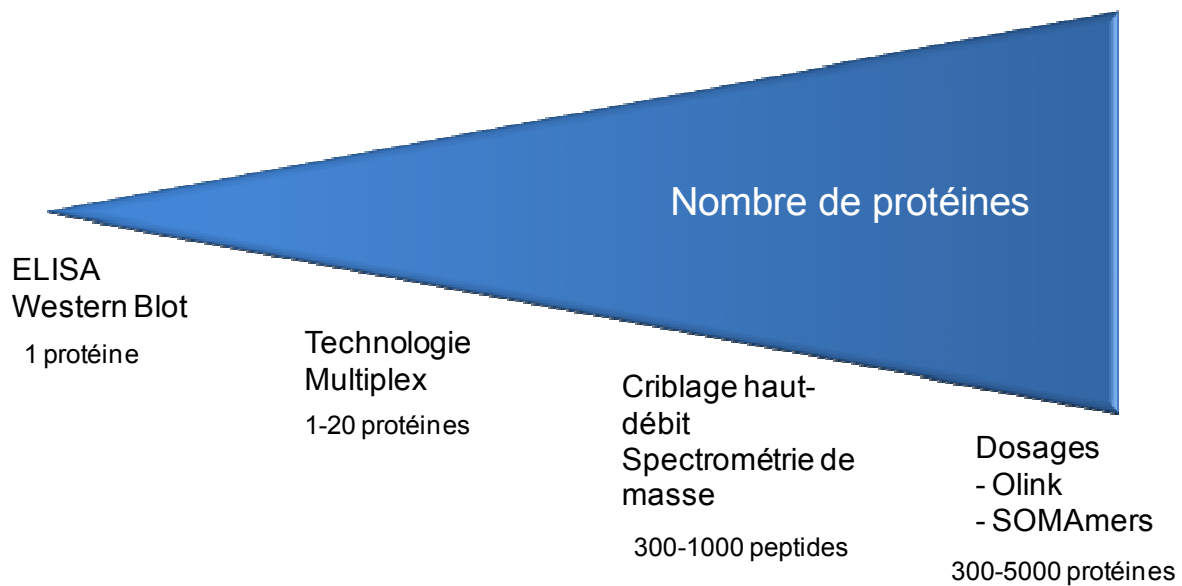


Figure 18 : Evolution de la quantification des protéines par les approches de protéomique

2.2.1.1 Le Western Blot et le dosage ELISA

L'approche la plus simple est le Western Blot. Il s'agit d'une technique semi-quantitative permettant de quantifier spécifiquement l'expression d'une protéine dans un échantillon protéique (extraits protéiques issus de tissus, de cellules en culture, ou encore de plasma). Cette technique repose sur la séparation des protéines dans un gel d'acrylamide par électrophorèse. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane poreuse grâce à un courant électrique. Les protéines sont incubées avec un anticorps primaire spécifique de la protéine étudiée puis un anticorps secondaire couplé à une enzyme et dirigé contre l'anticorps primaire. La révélation est réalisée avec le substrat de l'enzyme couplé à l'anticorps secondaire et permet de détecter le signal correspondant à la protéine d'intérêt.

L'ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) est une autre technique permettant de doser une protéine donnée dans un échantillon. Il s'agit d'une technique immunoenzymatique. Il existe plusieurs type de dosage ELISA (en sandwich, par compétition et indirect). L'ELISA en sandwich est le plus utilisé et consiste en la capture d'un antigène entre 2 anticorps. L'antigène est donc, dans un premier temps, reconnu par un anticorps dit « de capture » fixé sur une plaque, puis par un 2^e anticorps primaire en solution. Ce dernier est ensuite reconnu par un anticorps secondaire conjugué à la HRP. Une solution de révélation,

contenant un substrat de la HRP, est alors ajoutée et la réaction enzymatique est mesurée par colorimétrie. L'intensité de la coloration reflète la concentration de l'antigène (Figure 19).

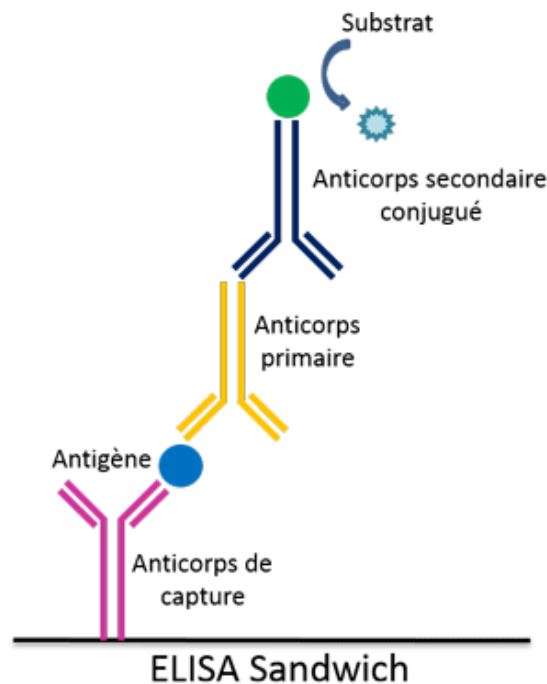


Figure 19 : Principe de la technique ELISA en sandwich

2.2.1.2 La technologie Multiplex

La technologie Multiplex permet la quantification d'une vingtaine de protéines dans un même échantillon. Elle repose sur l'utilisation de billes possédant un code couleur qui leur est propre, en fonction de l'analyte à mesurer. Ces billes sont couvertes d'un anticorps spécifique de l'analyte d'intérêt. Dans un premier temps, l'échantillon est incubé avec ces billes et la protéine d'intérêt est capturée sur les billes. Dans un second temps, une solution contenant un anticorps de détection biotinylé spécifique de la protéine d'intérêt est ajoutée. On ajoute ensuite de la streptavidine conjuguée à de la phycoérythrine, qui se lie à l'anticorps biotinylé. Enfin, les billes sont lues par un double laser. Un 1^{er} laser classe les billes grâce à leur code couleur et détermine la protéine fixée. Un 2^e laser détermine l'intensité du signal dérivé de la phycoérythrine, qui est proportionnel à la concentration de la protéine d'intérêt (Figure 20).

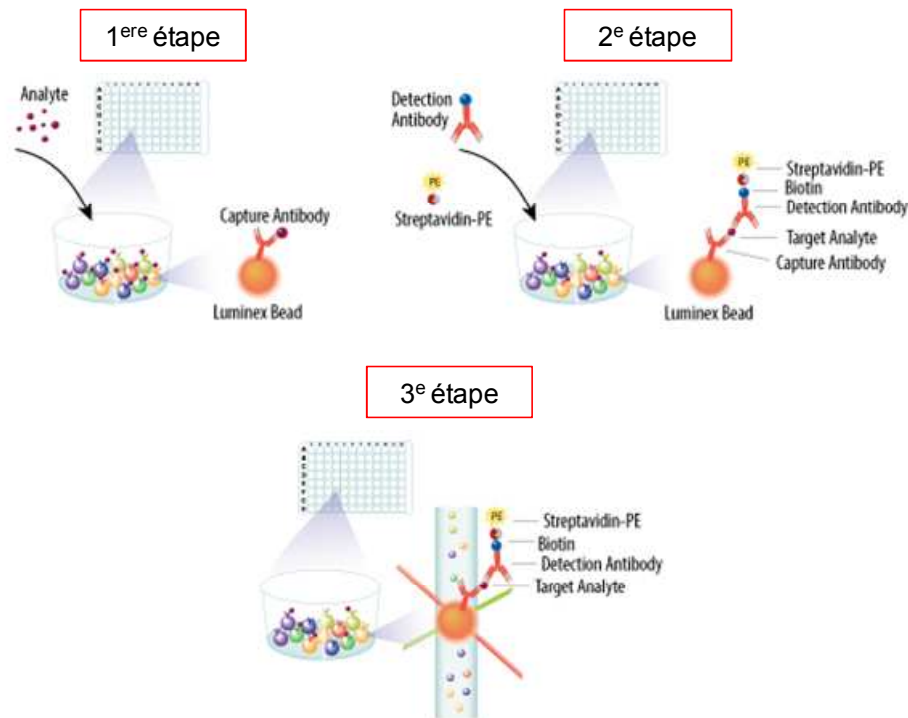


Figure 20 : Principe de la technologie du Luminex

2.2.1.3 Analyse protéomique par électrophorèse bidimensionnelle

Cette approche repose sur le fractionnement de l'échantillon par électrophorèse bidimensionnelle (2D) qui permet de séparer et de quantifier le niveau d'expression des protéines. Les protéines sont ensuite identifiées par spectrométrie de masse.

L'électrophorèse 2D sépare d'abord les protéines en fonction de leur charge électrique puis de leur poids moléculaire (Figure 21). Une étape de révélation des spots protéiques est ensuite réalisée, en général par coloration (les sels d'argent, le bleu colloïdal ou encore le Sypro®Ruby). Enfin, une analyse bioinformatique avec des logiciels dédiés est réalisée pour identifier les spots différemment abondants entre les différents échantillons analysés.

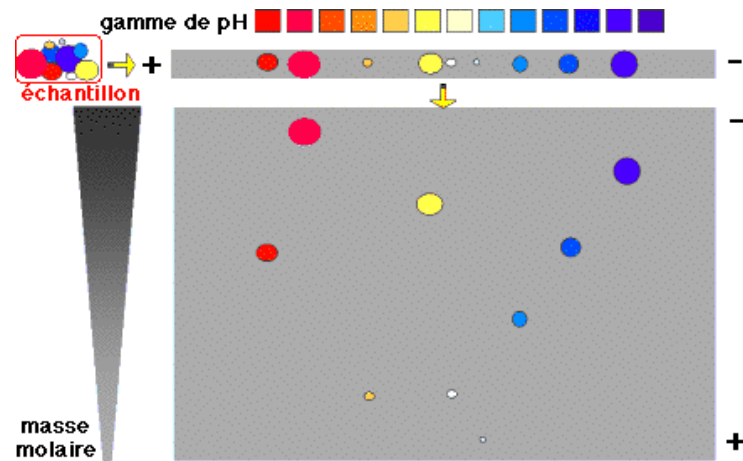


Figure 21 : Représentation schématique de l'électrophorèse 2D

Les spots sélectionnés sont découpés dans le gel 2D et digérés en peptides de petite taille qui sont ensuite identifiés en spectrométrie de masse. On obtient alors des spectres qui, après traitement informatique avec des logiciels dédiés, permettent d'identifier les protéines présentes dans l'échantillon.

L'analyse de protéomique différentielle par électrophorèse 2D et MALDI-TOF (Ionisation/Désorption par tir laser assisté par matrice et mesure de temps de vol) a été utilisée au laboratoire pour identifier de nouveaux biomarqueurs de l'IC. Les protéines ont été extraites du VG d'un modèle de rats IC à 2 mois post-IDM induit par ligature de l'artère coronaire gauche et de rats témoins. La figure 22 représente les gels 2D obtenus pour les rats témoins (A) et les rats IC (B).

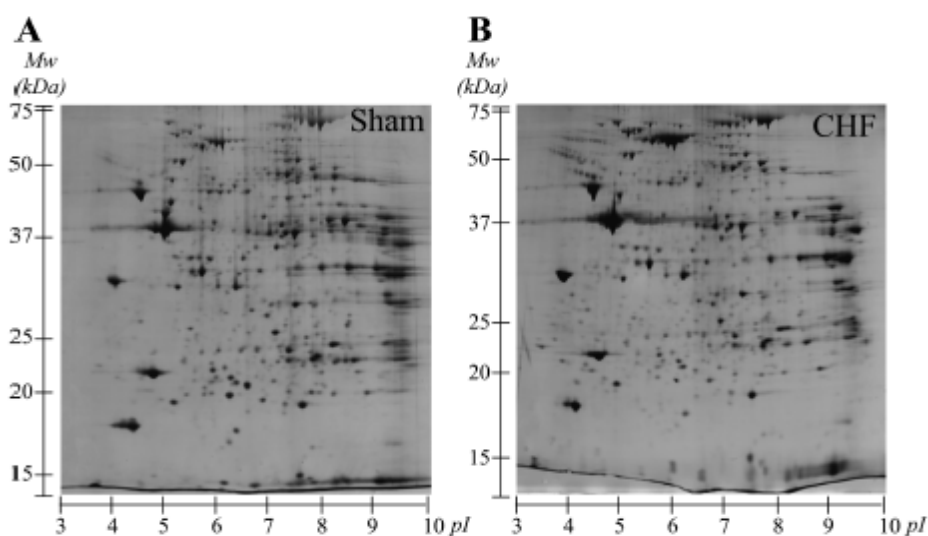


Figure 22 : Gel 2D des protéines du VG des rats témoins (A) et IC (B) (d'après Cieniewski-Bernard, et al., 2008)

Vingt-sept protéines étaient différentiellement exprimées dans les VG des rats IC comparés aux témoins (Cieniewski-Bernard, et al., 2008). Les protéines différentiellement exprimées, identifiées en spectrométrie de masse, appartiennent à différentes catégories dont les protéines de choc thermique (HSP), les protéines de stress du réticulum endoplasmique, les protéines du stress oxydant, les enzymes de la glycolyse, les enzymes du métabolisme des acides gras, les protéines du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire. Les modulations ont ensuite été validées en western blot.

De même, une analyse de phosphoprotéomique différentielle a permis l'identification de protéines différentiellement phosphorylées dans le VG des rats IC à 2 mois post-IDM comparés aux témoins, en particulier la TnT phosphorylée en Serine 208 (Dubois et al., 2011).

2.2.1.4 Spectrométrie de masse

Il existe d'autres méthodes d'identification des protéines par spectrométrie de masse, qui ne sont pas précédées d'une étape d'électrophorèse 2D. Dans ce cas, les protéines sont, dans un 1^{er} temps, digérées par une enzyme, souvent la trypsine, en petits peptides. Les peptides sont ensuite séparés en chromatographie en phase liquide, puis analysés en spectrométrie de masse. Des spectres sont obtenus et analysés avec des logiciels dédiés pour identifier les protéines (Figure 23).

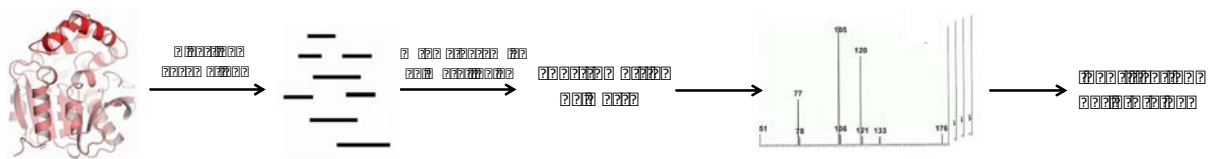


Figure 23 : Identification des protéines par spectrométrie de masse

2.2.1.5 Analyses protéomiques basées sur les aptamères

Récemment, de nouvelles techniques d'analyse protéomique ont été développées dans le but d'identifier de nouveaux biomarqueurs de différentes pathologies, incluant les maladies cardiovasculaires. C'est le cas des analyses protéomiques basées sur les aptamères, des oligonucléotides synthétiques capables de se fixer à un ligand (Brody et al., 2010; Gold et al., 2010). La société SOMALogic offre ainsi la possibilité de doser simultanément plusieurs milliers de protéines dans un même échantillon (plus de 5000 dans la dernière version).

Cette technique, appelée *SOMAscan assay*, repose sur l'utilisation de SOMAmers (*Slow-Off rate Modified Aptamers*), marqué avec un fluorophore, un site de photo-clivage et la biotine et immobilisés sur des billes. L'échantillon à analyser est incubé avec les billes de SOMAmers (Figure 24 a) et des complexes protéine-SOMAmer se forment sur les billes (Figure 24 b). Les protéines non liées sont alors éluées et les protéines liées sont marquées à la biotine (Figure 24 c). Les complexes protéine-SOMAmer sont libérés des billes par photo-clivage à la lumière ultra-violette (Figure 24 d). Les complexes sont ensuite incubés avec un tampon contenant un compétiteur polyanionique qui va permettre de rompre les complexes protéine-SOMAmer non spécifiques (Figure 24 e). Les protéines sont ensuite de nouveau capturées sur des billes de streptavidine et lavées (Figure 24 f). Enfin, les SOMAmers sont libérés dans un tampon dénaturant (Figure 24 g). Les SOMAmers s'hybrident ensuite sur leur séquence complémentaire sur une puce de microarray et sont quantifiés par fluorescence (Figure 24 h). L'intensité de fluorescence reflète l'abondance de la protéine dans l'échantillon analysé.

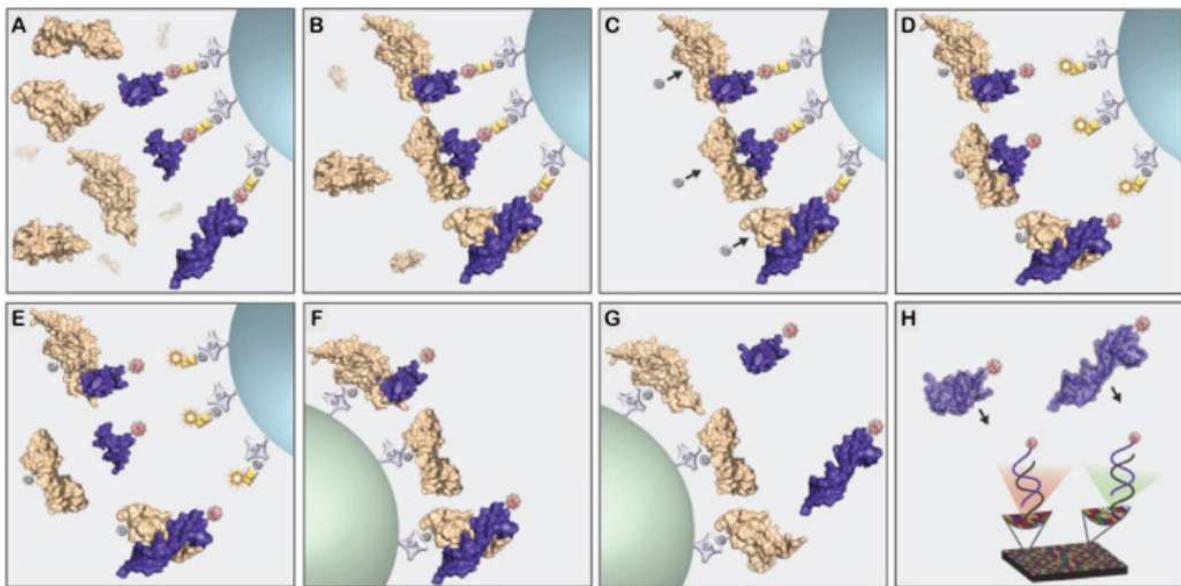


Figure 24 : Représentation schématique des différentes étapes (A-H) du *SOMAscan assay*. Les protéines sont représentées en beige, les SOMAmers en violet, la biotine en gris, le fluorophore en rouge et le site de photo-clivage en jaune.

Récemment, il a été montré que le *SOMAscan assay* a une excellente reproductibilité pour la majorité des protéines mesurées dans le plasma, qui restent stables sur une longue période (Kim et al., 2018). De plus, sa variabilité est très faible (Candia et al., 2017).

Le *SOMAscan assay* est de plus en plus utilisé dans la recherche de biomarqueurs des maladies cardiovasculaires (Ganz, et al., 2016; Ngo, et al., 2016; Jacob, et al., 2018).

Récemment, cette technique a été utilisée pour quantifier 1130 protéines dans le plasma de patients atteints de cardiopathie ischémique et développer un score de risque protéique d'évènements cardiaques. Un score déterminé à partir de la quantification de 9 protéines a ainsi été développé et validé par comparaison au score de Framingham, classiquement utilisé pour la prévision d'évènements coronariens (Ganz et al., 2016). Le *SOMAscan assay* a également été utilisé pour identifier des marqueurs permettant de prédire un risque d'IDM (Jacob et al., 2018). Le *SOMAscan assay* a aussi permis l'identification d'une signature protéomique de l'âge composée de 76 protéines dont la concentration est hautement corrélée à l'âge (Tanaka et al., 2018).

2.2.2 Avantages et inconvénients des différentes approches

Ces techniques présentent différents avantages et inconvénients (Table 3). Les techniques basiques, du type Western Blot ou ELISA, ont l'avantage de pouvoir être utilisées en routine au laboratoire. En effet, elles présentent un coût limité et sont applicables en un temps court (1 à 2 jours). Cependant, elles permettent d'étudier une seule protéine dans un petit nombre d'échantillons.

La technologie Multiplex permet, quant à elle, de doser une vingtaine de protéines dans un même échantillon. Cette technique est également réalisable en un temps court (1 jour) à un coût raisonnable. Elle nécessite cependant un équipement spécifique.

La protéomique 2D permet d'identifier une soixantaine de protéine dans un échantillon et a l'avantage de permettre l'identification des modifications post-traductionnelles de ces protéines. Son principal inconvénient est qu'elle nécessite une étape d'identification des protéines et de validation. Cette technique est applicable en environ une semaine, sans l'identification et la validation des protéines sélectionnées qui peuvent prendre de plusieurs semaines à plusieurs mois.

Les techniques de spectrométrie de masse permettent d'identifier un plus grand nombre de peptides dans un échantillon (environ 1000). Il s'agit de techniques automatisées qui permettent d'analyser un grand nombre d'échantillons. Une étape d'identification et de validation des protéines est également nécessaire. Ces techniques peuvent cependant nécessiter jusqu'à 2 ans de travail.

Enfin, les technologies les plus récentes de protéomique à haut débit, telles que le *SOMAscan assay*, permettent le dosage d'un très grand nombre de protéines (plus de 5000 protéines dans la dernière version du *SOMAscan assay*) dans un faible volume d'échantillon.

Cependant, ces techniques sont beaucoup plus coûteuses. De plus, ils nécessitent un matériel spécifique et ne peuvent donc pas être utilisées en routine.

Table 3 : Avantages et inconvénients des différentes approches de protéomique

Technique	Nombre de protéines étudiées	Avantages	Inconvénients	Nombre d'échantillons analysés	Temps
Western Blot	1	50 L d'échantillon	1 protéine quantifiée Semi-quantitatif	8	24-48 heures
ELISA	1	50 L d'échantillon	1 protéine quantifiée	Multiple de 24	5 heures
Multiplex	1-20	50 L d'échantillon	Equipement multiplex	Multiple de 24	5 heures
Protéomique 2D	1000 spots-60 protéines	Modifications post-traductionnelles	Identification des protéines	6	1 semaine (sans l'identification et la validation des protéines)
Protéomique MS	Environ 1000	Pré-purification sur colonne LC	Identification des protéines	Automatisation	2 ans
Olink	96 x 2	1 L d'échantillon	Puce dédiée Fluidigm Biomark Reader	90	4 semaines pour 500 échantillons
SOMAscan assay	Environ 5000	65 L d'échantillon	Scanner Agilent	Multiple de 24	2 semaines pour 164 échantillons

Les nouvelles techniques de protéomique à haut débit sont donc particulièrement adaptées pour réaliser un profil protéomique du plasma de patients dans des conditions physiologiques ou pathologiques et identifier des protéines à étudier. Cependant, les techniques plus classiques, telles que le Western Blot, l'ELISA ou le Multiplex restent indispensables pour étudier et valider en routine les protéines sélectionnées.

2.3 Les ARNs non codants

Il est bien connu que la majorité du génome humain est transcrite en ARNs. Cependant, il a été montré que seulement 2% de ces ARNs sont traduits en protéines. Les autres sont appelés ARNs non codants et sont principalement des microARNs et des ARNs longs non codants. Ces ARNs non codants sont connus pour leur rôle dans la régulation de la traduction des protéines.

Depuis plusieurs années, les ARNs sont considérés comme des biomarqueurs potentiels des maladies cardiovasculaires. En effet, les ARNs non codants sont sécrétés dans

le milieu extracellulaire, de façon dépendante du type cellulaire et des conditions physiopathologiques, et ont été détectés dans différents fluides humains, comme le plasma, les urines, ou encore le fluide péricardique (Mitchell et al., 2008; Creemers et al., 2012; Marques et al., 2016).

2.3.1 Les microARNs

Les microARNs (miARNs) sont des petits ARNs non codants composés de 19 à 23 nucléotides, impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle des protéines (Bartel, 2004; Van Rooij, 2011). Ils ont été décrits dans un 1^{er} temps dans *Caenorhabditis elegans* (Wightman et al., 1993). Ces microARNs sont hautement conservés et impliqués dans de nombreux processus biologiques.

2.3.1.1 Biosynthèse des microARNs

Les gènes codant pour les microARNs se situent, en général, dans les introns ou les régions intergéniques (Van Rooij, 2011). Le processus de biosynthèse des microARNs est décrit sur la figure 25. Les microARNs sont tout d'abord transcrits par l'ARN polymérase II sous la forme d'un pri-miARN (double brin d'ARN caractérisé par une structure en épingle à cheveux). Ce pri-miARN est ensuite clivé en pré-miARN par la RNase Drosha. Le pré-miARN est alors exporté du noyau vers le cytoplasme par l'Exportine 5, où il est pris en charge par la RNase Dicer et clivé en un duplex miARN-miARN. Ce duplex est composé d'un brin mature, dit « guide », et d'un brin « passager » (Bartel, 2004; Yates et al., 2013). Le microARN mature est ensuite pris en charge par les protéines Argonautes (Ago) du complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*). Le microARN « passager » est en général dégradé (Bartel, 2004; Yates et al., 2013).

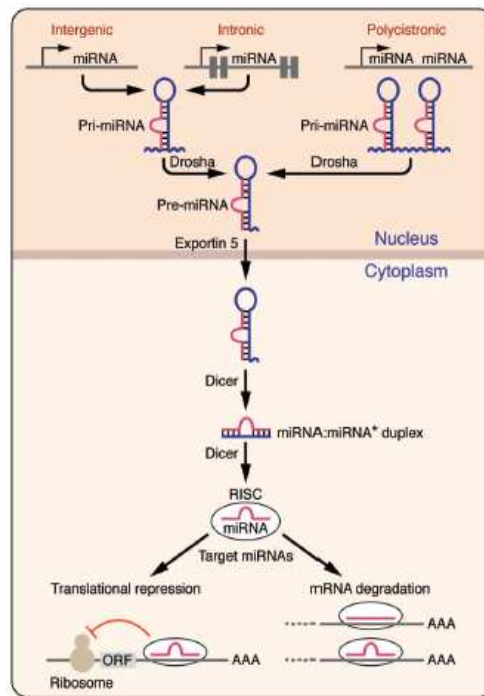


Figure 25 : Biosynthèse des microARNs. Le microARN est transcrit sous forme de pri-miARN qui est clivé en pré-miARN par Drosha et exporté dans le cytoplasme où il est clivé en duplex miARN-miARN par Dicer (d'après Van Rooij, 2011).

2.3.1.2 Modes d'action des microARNs

Après maturation, le microARN est donc pris en charge par le complexe RISC. Le complexe RISC est principalement composé de protéines Argonaute impliquées dans la liaison avec le microARN et l'ARNm, ainsi que d'une endonucléase, appelée Slicer (Bartel, 2004). Le complexe miARN-RISC est ensuite dirigé vers le 3'UTR (*Untranslated Transcribed Region*) de l'ARNm cible (Figure 25). L'interaction du miARN avec son ARNm cible se fait par complémentarité, parfaite ou partielle, avec une séquence appelée « *seed* » au niveau du 3'UTR. Si la complémentarité entre le microARN et la séquence *seed* est parfaite, alors l'ARNm sera dégradé. Au contraire, si la complémentarité est partielle, la traduction de l'ARNm sera simplement inhibée, sans dégradation (Figure 25) (Bartel, 2004).

De façon intéressante, un même microARN peut cibler un grand nombre d'ARNm différents. Il est donc impliqué dans de nombreux processus biologiques très variés. De même, un ARNm donné peut être la cible de plusieurs microARNs différents. La régulation post-transcriptionnelle des protéines par les microARNs est donc un processus très complexe.

2.3.1.3 Sécrétion des microARNs

Les microARNs ont été détectés dans divers fluides biologiques tels que le plasma, la salive, les urines, le liquide céphalo-rachidien (Mohr and Mott, 2015). Les microARNs, synthétisés dans les cellules, sont donc sécrétés dans le milieu extracellulaire. De plus, il a été montré que ces microARNs circulants sont particulièrement stables dans le plasma (Mitchell et al., 2008).

Il existe différents modes de sécrétion des microARNs dans la circulation sanguine, représentés sur la figure 26 (Creemers et al., 2012). Les microARNs peuvent être sécrétés par l'intermédiaire de vésicules extracellulaires de taille variable, telles que les exosomes, les microvésicules, les corps apoptotiques. Les microARNs peuvent également être sécrétés sous forme de complexes avec des protéines, principalement les protéines Ago et la nucléophosmine 1. Enfin, les microARNs peuvent également être relargués dans la circulation sous une forme associée aux HDL. Ainsi, les microARNs sont protégés de l'action des RNases très présentes dans la circulation sanguine.

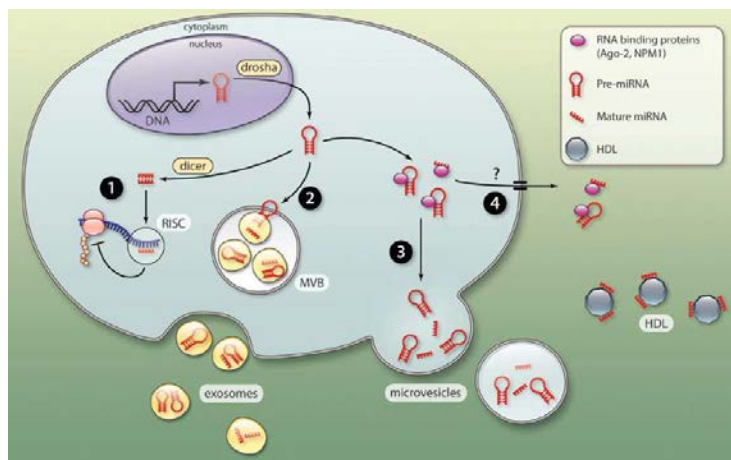


Figure 26 : Représentation schématique des différents modes de sécrétion des microARNs. Les microARNs peuvent être sécrétés sous la forme de complexes avec des protéines ou des HDL ou dans des vésicules extracellulaires (exosomes, microvésicules, corps apoptotiques) (d'après Creemers, et al., 2012).

La sécrétion des microARNs peut être active ou passive. En effet, il a été montré que 66% des microARNs sont sécrétés dans des quantités reflétant les taux intracellulaires, alors que 13% sont relargués dans des proportions plus faibles et 21% dans des proportions plus élevées que dans les cellules (Pigati et al., 2010).

Ces éléments suggèrent un rôle important des microARNs dans la communication intercellulaire. En effet, en 2014, Bang et al. ont montré que les fibroblastes cardiaques étaient

capables de sécréter des exosomes enrichis en miR-21-3p, qui pourraient être impliqués dans une communication paracrine pour induire l'hypertrophie des cardiomyocytes (Bang et al., 2014).

Les microARNs sont donc devenus des cibles particulièrement étudiées dans la recherche de biomarqueurs.

2.3.1.4 Les microARNs : biomarqueurs du RVG post-IDM et de l'IC

De nombreux microARNs ont été montrés comme étant modulés dans différentes pathologies, et en particulier dans les maladies cardiovasculaires. En effet, une étude a montré une augmentation des taux plasmatiques du miR-423-5p dans le plasma de patients IC comparés à des contrôles (Tijssen et al., 2010). De même, les taux plasmatiques des miR-133a et miR-133b ont été associés au diagnostic de l'IDM (Widera et al., 2011). Cependant, une analyse des taux plasmatiques des miR-423-5p et miR-133a chez des patients post-IDM n'a montré aucune association avec le RVG, ni avec les taux de BNP (Bauters et al., 2013).

Un profil des microARNs a également été réalisé dans le fluide péricardique de patients IC et a permis de détecter en moyenne 251 microARNs différents par échantillon. Cette étude a montré que les microARNs les plus abondants dans le fluide péricardique sont les miR-21-5p, miR-451a, miR-125-5p, let-7b-4p et miR-16-5p (Kuosmanen et al., 2015). Marques et al. ont aussi montré que les microARNs sont impliqués dans différentes voies de signalisation associées à la progression de l'IC, dont la fibrose, et pourraient être utilisés comme biomarqueurs de la progression de l'IC (Marques et al., 2016).

2.3.2 Les ARNs longs non codants

2.3.2.1 Généralités

Les ARNs longs non codants (lncARN) sont des transcrits de plus de 200 nucléotides ne codant pour aucune protéine. A ce jour, les lncARNs ont été moins étudiés que les microARNs et leurs synthèse et mécanismes d'action restent moins bien connus.

Les lncARNs sont transcrits par l'ARN polymérase II, de façon assez similaire aux ARNm, à partir de séquences contenues dans les régions intergéniques de l'ADN ou dans les introns et les exons de gènes codant pour des protéines. Les lncARNs sont le plus souvent

exprimés en plus faible quantité que les ARNm et ont une expression spécifique d'un type cellulaire ou d'un tissu.

2.3.2.2 Modes d'action des ARNs longs non codants

De par leur structure, les lncARNs sont capables de se fixer à d'autres acides nucléiques ou à des protéines. Les lncARNs seraient impliqués dans de nombreux processus cellulaires, comme la division cellulaire, la réponse au stress, la différenciation, la survie et la sénescence. Ils seraient donc impliqués dans un grand nombre de pathologies, telles que les maladies cardiovasculaires ou les cancers.

Les lncARNs ont des fonctions aussi bien nucléaires que cytoplasmiques. Du point de vue nucléaire, les lncARNs sont capables d'interagir directement avec la chromatine ou avec les protéines modulant la structure de la chromatine, en favorisant leur recrutement. Ils ont donc un rôle dans la régulation de l'activité transcriptionnelle. Ils peuvent également interagir avec certains facteurs impliqués dans les modifications épigénétiques de la chromatine, comme les HDAC ou les méthyl-transférases. Les lncARNs peuvent aussi jouer un rôle de compétiteur dans une interaction microARN-ARNm. Enfin, ils peuvent faciliter la transcription en favorisant la formation de la boucle de chromatine (Figure 27) (Ounzain et al., 2013; Sun et al., 2018).

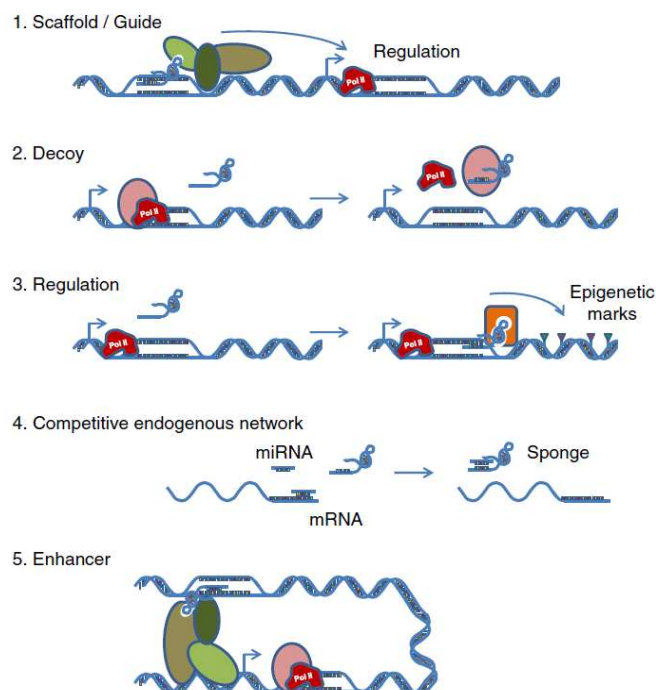


Figure 27 : Principaux modes d'action des lncARNs nucléaires (d'après Ounzain et al., 2013)

Au niveau cytosolique, ils sont impliqués dans le contrôle de la stabilité et de la traduction des ARNm en permettant le recrutement de protéines de liaison aux ARNs qui peuvent inhiber ou initier la traduction. Les lncARNs jouent également un rôle dans la régulation de la stabilité des protéines via la régulation du système ubiquitine-protéasome. Enfin, les lncARNs sont aussi impliqués dans la modulation des voies de signalisation (Noh et al., 2018) (Figure 28).

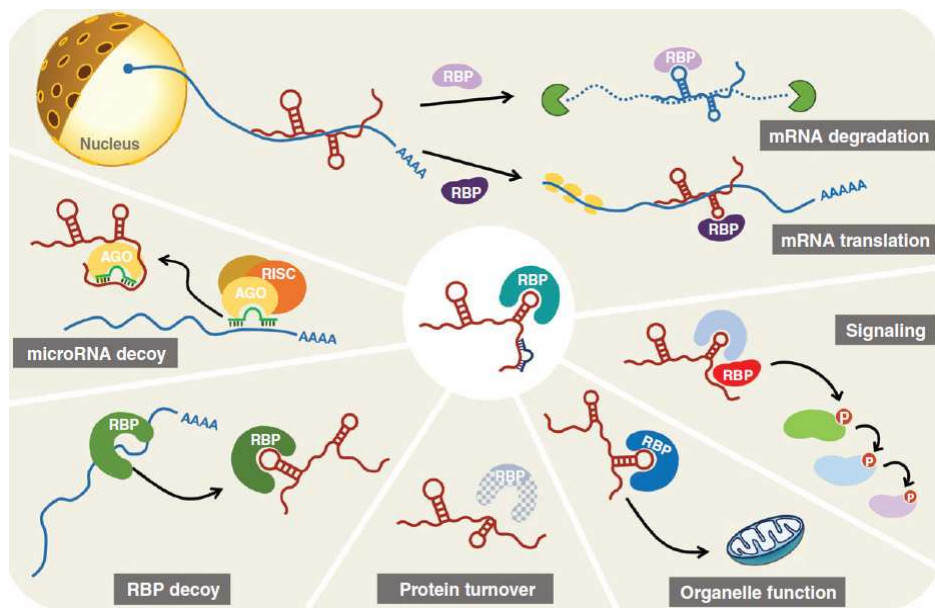


Figure 28 : Principaux modes d'action des lncARNs cytosoliques (d'après Noh et al., 2018)

Les lncARNs ont également été détectés dans la circulation sanguine et leur niveau d'expression peut être modulé en conditions pathologiques (Zhou et al., 2015). Cependant, les mécanismes de sécrétion des lncARNs ont été peu étudiés mais seraient proches de ceux des microARNs.

2.3.2.3 Les ARNs longs non codants dans les maladies cardiovasculaires

Certains lncARNs ont été décrits comme étant potentiellement impliqués dans les maladies cardiovasculaires (Hobuß et al., 2019). En effet, une des 1^{ères} études sur l'implication des lncARNs dans l'hypertrophie cardiaque a permis l'identification d'un *cluster* de lncARNs, appelé Mhrt (*Myosin Heavy-chain-associated RNA Transcripts*) qui recouvre partiellement le gène *Myh7* (*Myosin Heavy chain 7*). Il a été montré que Mhrt est

diminué après l'induction d'une hypertrophie par constriction de l'aorte transverse (TAC) (Han et al., 2014). Les lncARNs pourraient également être de potentiels biomarqueurs circulants des maladies cardiovasculaires. Un des principaux exemples est le lncARN LIPCAR (*Long intergenic non-coding RNA predicting cardiac remodeling*). Il a été montré que ses taux plasmatiques sont augmentés dans le plasma de patients post-MI aux stades tardifs du RVG post-IDM et chez des patients présentant une IC chronique. De plus, les taux de LIPCAR sont aussi associés au risque de mort cardiovasculaire (Kumarswamy et al., 2014).

2.4 Analyses bioinformatiques pour l'identification de biomarqueurs

2.4.1 Biologie des systèmes

La biologie des systèmes, aussi appelée biologie systémique ou biologie intégrative, permet de comprendre les interactions dynamiques entre les composants d'une cellule, d'un organe ou d'un organisme, en conditions physiologiques ou pathologiques. En effet, le phénotype d'un organisme vivant est le reflet d'une multitude d'interactions moléculaires à différents niveaux et ayant lieu à un même moment (Ayers and Day, 2015).

Cette discipline associe différents domaines de la biologie tels que la génomique, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique. Elle peut également prendre en compte des données cliniques et environnementales. La biologie des systèmes associe énormément de données, générées par des techniques de biologie avancées (spectrométrie de masse, qPCR, ELISA, *microarray*...) et des méthodes bioinformatiques permettant d'analyser les données expérimentales (Ayers and Day, 2015). Avec l'augmentation importante de la quantité de données « omiques », la biologie des systèmes est donc devenue un outil particulièrement intéressant pour l'étude des mécanismes biologiques impliqués dans une pathologie et la recherche de biomarqueurs.

Traditionnellement, la recherche de biomarqueurs repose sur l'étude de molécules individuelles reflétant un état clinique particulier. La limite de ce type d'approches, appelées réductionnistes, est qu'elles ne prennent pas en compte la complexité des mécanismes impliqués dans cet état clinique. En effet, les techniques traditionnelles reposent le plus souvent sur des données expérimentales issues d'une seule source, la protéomique par exemple. De plus, elles aboutissent en général à l'identification de molécules individuelles (Azuaje et al., 2012).

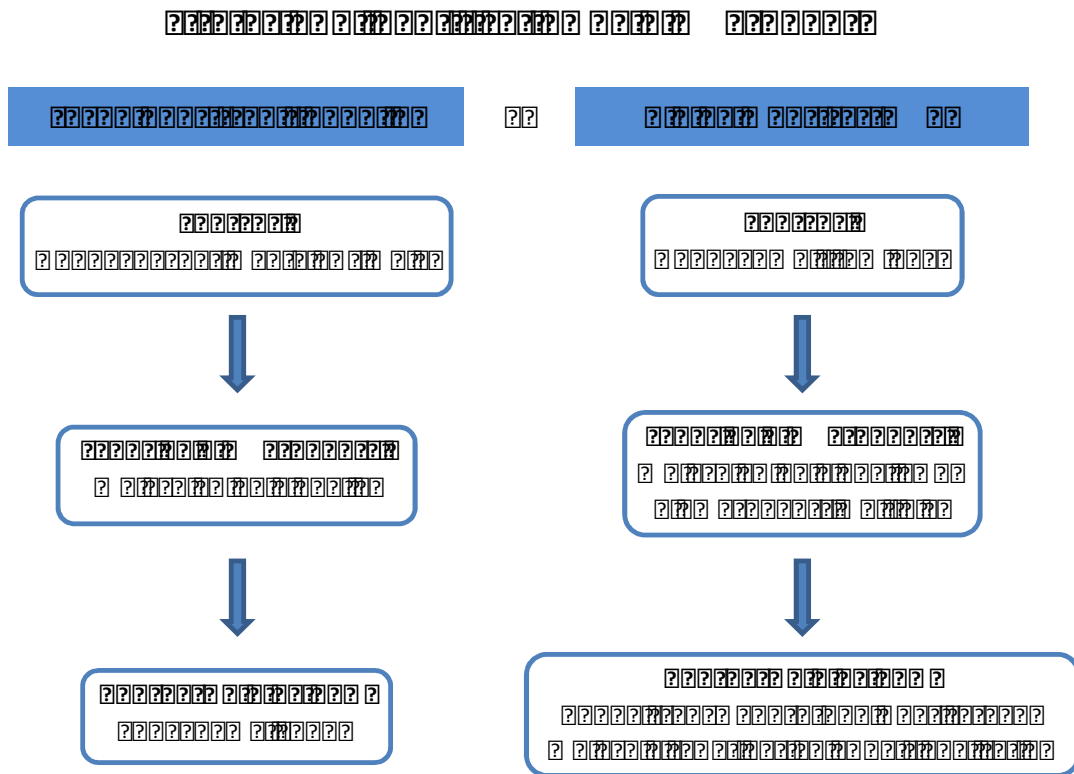


Figure 29 : Différences entre les techniques traditionnelles d’identification de biomarqueurs et l’utilisation de la biologie des systèmes

Ces dernières années, le développement de la biologie des systèmes a ouvert de nouvelles perspectives dans la recherche des biomarqueurs. En effet, grâce à l’utilisation de données multi-omiques, elle permet l’identification soit de biomarqueurs seuls basés sur une connaissance approfondie des mécanismes biologiques, soit de biomarqueurs multiples pouvant être associés (Azuaje et al., 2012). La figure 29 résume les principales différences dans l’identification de biomarqueurs par les techniques traditionnelles et la biologie des systèmes.

2.4.2 Réseaux d’interactions moléculaires

La biologie des systèmes repose le plus souvent sur la construction de réseaux d’interactions moléculaires qui permettent la prise en compte du volume important de données omiques (Figure 30).

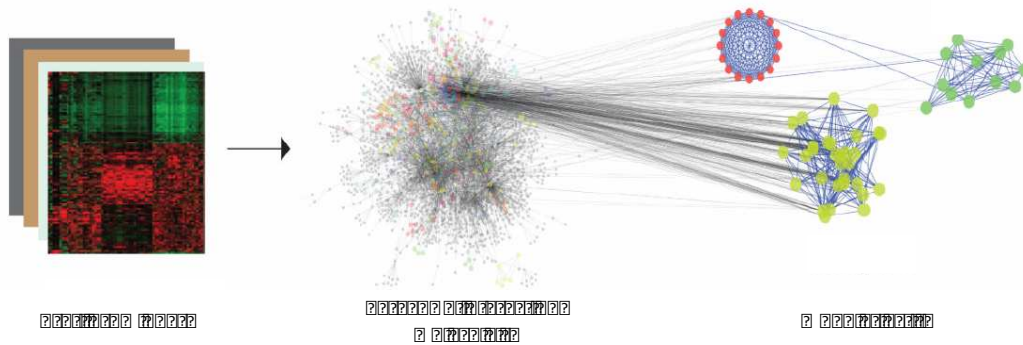


Figure 30 : Analyse en biologie des systèmes des données « omiques ». Les profils « omiques » obtenus expérimentalement sont utilisés pour la construction de réseaux d'interactions moléculaires. L'analyse de ces réseaux est facilitée par l'extraction de modules actifs (d'après Mitra et al., 2013)

Un réseau moléculaire se définit comme un groupe de molécules, appelées « nœuds », liées entre elles par différents types d'interactions (interactions protéine-protéine, activation, inhibition, transcription...), appelées « liens » (Azuaje et al., 2012; Barabasi and Albert, 1999; Ma'ayan, 2011). Les nœuds sont des facteurs biologiques tels que des gènes, des protéines, des ARN non codants ou encore des métabolites. Les liens représentent quant à eux des interactions physiques (protéine-protéine), l'activation de la transcription d'un gène, l'inhibition de la traduction d'une protéine par un microARN, l'activation d'une enzyme ou la conversion enzymatique d'un métabolite à un autre (Chan and Loscalzo, 2012). La figure 31 présente les différents types de nœuds et liens communément retrouvés dans les réseaux d'interactions moléculaires.

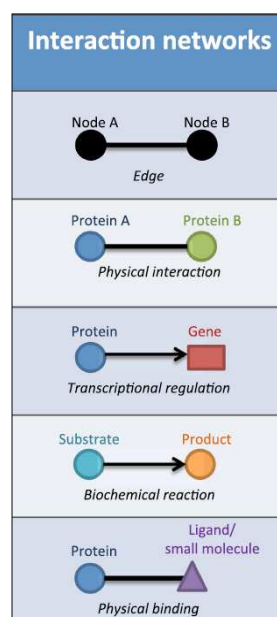


Figure 31 : Les différents types de nœuds et de liens (d'après Jinawath et al., 2016)

Les réseaux moléculaires sont souvent la combinaison de données expérimentales et de données issues de la littérature ou de bases de données publiques. En effet, la représentation de réseaux permet l'intégration de données issues de nombreuses études et sources dans une seule et même structure (Ma'ayan, 2011). L'utilisation d'algorithmes permet ainsi la prédiction d'interactions à partir d'une liste de « *seed nodes* ».

Dans un réseau moléculaire, chaque nœud est défini par un certain nombre de propriétés (Ma'ayan, 2011). Le degré de connectivité correspond au nombre d'interactions de chaque nœud. Un nœud présentant un degré élevé est appelé « *hub* ». La centralité d'intermédiarité d'un nœud est le nombre de chemins les plus courts passant par ce nœud entre toutes les paires de nœuds possibles. Enfin, les nœuds d'un réseau peuvent être annotés dans *Gene Ontology* (GO), afin de décrire leurs fonctions biologiques. Il existe d'autres types de centralités pour définir un nœud telles que la centralité de proximité et la centralité de vecteur propre. Les liens sont quant à eux décrits par le type d'interaction qu'ils représentent et peuvent être directionnels ou non (Ma'ayan, 2011). Ces propriétés permettent l'analyse du réseau moléculaire et l'étude des mécanismes qu'il met en évidence.

Une des méthodes importantes de l'étude des réseaux moléculaires est l'identification de modules actifs (figure 28). En effet, les analyses expérimentales et les bases de données fournissent des profils « omiques » corrélés à l'état de la cellule ou au stade d'une pathologie. L'intégration de ces profils aux réseaux moléculaires permet l'extraction de modules actifs, qui correspondent à une région du réseau montrant des changements importants dans l'expression ou l'activité de ses nœuds en fonction des conditions physiologiques ou pathologiques. Ces modules peuvent être identifiés en comparant les interactions du réseau dans diverses conditions expérimentales ou à différents stades d'une pathologie. Les modules actifs ainsi extraits facilitent l'interprétation des réseaux moléculaires en permettant l'identification de voies de signalisation impliquées dans la pathologie ou de biomarqueurs (Mitra et al., 2013).

Une des limites de ce type d'approches repose sur le fait que les méthodes « omiques » ne permettent pas de mettre en évidence l'ensemble des interactions protéine-protéine d'une cellule humaine, mais seulement environ 20%. De plus, l'étude d'une pathologie repose souvent sur une liste de gènes ou de protéines qui tendent à interagir entre eux dans un réseau moléculaire, et forment un ou plusieurs sous-modules, appelés « *disease module* », ce qui peut biaiser la découverte d'autres gènes ou voies impliqués dans la pathologie. Une carte de l'ensemble de l'interactome serait utile à la compréhension des mécanismes des pathologies

humaines, mais reste pour le moment très incomplète. Cependant, les données à notre disposition sont suffisantes à la construction de réseaux moléculaires des pathologies humaines (Menche et al., 2015).

2.4.3 *La biologie des systèmes dans l'étude et la recherche de biomarqueurs des maladies cardiovasculaires*

La biologie des systèmes est de plus en plus utilisée dans l'étude des maladies cardiovasculaires.

Par exemple, Nguyen et al. ont construit un réseau d'interactions protéine-protéine spécifique de l'IDM, appelé MIPIN (*MI-specific Protein-protein Interaction Network*), à partir de bases de données telles que PubMed et Uniprot et composé de 613 protéines liées par 4443 interactions. La majorité des protéines du MIPIN est localisée dans le milieu extracellulaire et la membrane plasmique. De plus, plusieurs complexes macromoléculaires, tels que le complexe du récepteur du TGF β (*Transforming Growth factor β*), le complexe du récepteur à l'IL-1, ou encore des complexes impliquant le fibrinogène et les intégrines, ont été identifiés et suggèrent une implication importante de la réponse inflammatoire lors de l'IDM. Les mesures plasmatiques et sériques de 22 protéines, publiées dans la littérature, ont ensuite été ajoutées au réseau MIPIN et ont permis la prédiction du niveau d'expression de 14 protéines du MIPIN (Nguyen et al., 2014). La construction d'un réseau de signalisation à grande échelle à partir de résultats expérimentaux a aussi permis l'étude des voies de signalisation impliquées dans l'apoptose et l'hypertrophie des cardiomyocytes et des interactions entre ces différentes voies (Kang et al., 2017).

Ryall et al. ont construit un modèle computationnel du réseau de signalisation impliqué dans l'hypertrophie des cardiomyocytes et ont identifié plusieurs nœuds ayant une influence positive ou négative sur la taille des cardiomyocytes. Les protéines ayant la plus grande influence dans ce réseau sont Ras, qui a un rôle pro-hypertrophique, et GSK3 (*Glycogen synthase kinase 3*), qui a un rôle anti-hypertrophique (Ryall et al., 2012).

La biologie des systèmes a également été utilisée pour étudier les microARNs et les longs ARNs non codants (lncARNs). En effet, la construction d'un réseau composé de gènes codant pour des protéines et de lncARNs a permis l'identification d'un module contenant 6 lncARNs co-exprimés avec 44 gènes enrichis pour des voies ou des processus associés à l'hypertrophie cardiaque (J. Zhang et al., 2017). Un réseau de régulation de l'IDM par les facteurs de transcription et les microARNs a aussi été construit et a mis en évidence

l'importance de 4 régulateurs dans les mécanismes de l'IDM, les facteurs de transcriptions SP1 (*Specificity protein 1*) et ESR1 (*Estrogen receptor 1*) et les microARNs miR-21-5p et miR-155-5p (Zhang et al., 2015).

Des analyses de biologie des systèmes sont aussi souvent mises en place pour étudier les résultats obtenus en *microarrays*. Des analyses en *microarrays* réalisées sur des échantillons de sang périphérique de patients hospitalisés pour un 1^{er} IDM et de contrôles sains ont permis l'identification de gènes différentiellement exprimés entre les 2 groupes de patients. Une analyse d'enrichissement fonctionnel et la construction d'un réseau d'interactions protéine-protéine et d'un réseau de régulation transcriptionnelle ont permis l'identification de gènes potentiellement associés à l'IDM aigu (Gao et al., 2016). Plus récemment, dans le but d'identifier des gènes impliqués dans le développement de l'IC chez des patients ayant subi un IDM avec élévation du fragment ST (STEMI), une analyse en *microarray* a été réalisée sur des patients présentant une IC post-IDM et des patients sans IC post-IDM. Les gènes différentiellement exprimés ont été identifiés et enrichis fonctionnellement et un réseau d'interactions protéine-protéine a été construit. Les principales voies identifiées dans le réseau sont associées à la réponse inflammatoire, l'organisation de la matrice extracellulaire, la réponse à l'AMPc, la réponse immunitaire et la régulation de la concentration cytosolique en calcium (Qian et al., 2019).

2.5 Intérêt des analyses statistiques pour la recherche de biomarqueurs

Les analyses statistiques interviennent à plusieurs échelles dans la recherche de biomarqueurs. En effet, les statistiques sont utilisées pour étudier les caractéristiques d'une cohorte de patients, pour le traitement des données « omiques », la sélection de biomarqueurs potentiels et pour la validation expérimentale des biomarqueurs. Des analyses statistiques sont aussi réalisées lors de la construction et l'analyse de réseaux d'interactions moléculaires.

Au regard des grandes quantités de données obtenues par les analyses de protéomique à haut débit, il est important d'avoir à disposition des outils statistiques puissants et adaptés. En effet, dans la recherche de biomarqueurs, il est nécessaire de pouvoir extraire un nombre limité de cibles à partir des données de protéomique. Un des problèmes les plus importants rencontrés dans l'analyse de ces données en statistiques est dû au très grand nombre de variables à étudier en comparaison au nombre limité d'individus à disposition dans les cohortes (Figure 32). Il est donc nécessaire d'utiliser des modèles de régression pénalisée, tels

que les régressions pénalisées Ridge ou LASSO (*Least Absolute Shrinkage and Selection Operator*) (Hoerl and Kennard, 1970; Tibshirani, 1996). Dans ce cas, une pénalité est appliquée aux coefficients de régression.

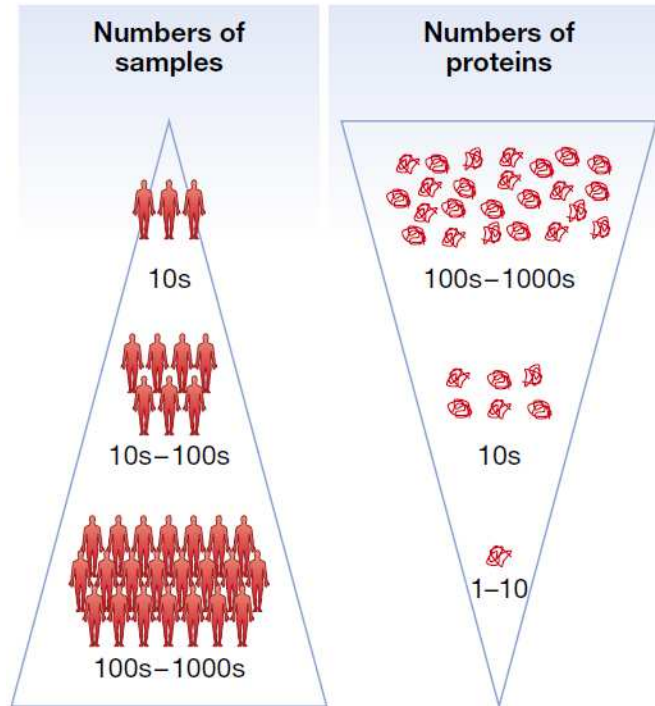


Figure 32 : Stratégie de recherche de biomarqueurs en fonction du nombre d'échantillons et du nombre de variables. (d'après Geyer et al., 2017)

On remarque cependant que peu de biomarqueurs potentiels identifiés et publiés dans la littérature sont réellement utilisés en clinique. Il est donc important de bien sélectionner les biomarqueurs potentiels à étudier pour qu'ils puissent être utilisés en pratique clinique.

Objectifs

De nos jours, les maladies cardiovasculaires dont l'IC sont un enjeu de santé publique majeur, accentué par le vieillissement de la population. Malgré l'amélioration des traitements, elles restent une cause de mortalité importante. Il a été montré que 30% des patients hospitalisés pour un IDM inaugural développent un RVG (Fertin et al., 2010), qui peut aboutir, à terme, à une IC (Bauters et al., 2017). A ce jour, il n'existe pourtant pas de biomarqueur permettant de prédire la survenue d'un RVG post-IDM et l'IC à un stade précoce. Les principaux biomarqueurs utilisés en pratique clinique pour diagnostiquer l'IC actuellement sont le BNP et le NT-proBNP. Cependant, ces marqueurs présentent des limites. En effet, ils ne sont pas spécifiques à l'IC, une augmentation des taux de BNP et de NT-proBNP pouvant également être associée à l'âge ou à une insuffisance rénale. De plus, ces biomarqueurs ne permettent pas de diagnostiquer l'IC à un stade précoce. Il est important d'identifier les patients IC ayant un risque élevé de décès précoce afin de les orienter vers des thérapies plus invasives, telles que la greffe cardiaque. Il est donc nécessaire d'identifier de nouveaux biomarqueurs permettant de détecter le RVG post-IDM à un stade précoce et de prédire le décès précoce des patients IC d'une part, et de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ces pathologies, d'autre part.

Le développement des analyses de protéomique à haut débit et de la biologie des systèmes ouvre de nouvelles perspectives dans le domaine de la recherche de biomarqueurs. En effet, les grandes quantités de données obtenues par les approches de protéomique peuvent être utilisées pour la construction de réseaux d'interactions moléculaires qui permettent d'étudier les mécanismes impliqués dans le RVG et l'IC. Ces approches permettent donc d'identifier des listes de nouveaux biomarqueurs potentiels de l'IC et du RVG avec une signification biologique.

Pour étudier le RVG post-IDM et le décès précoce des patients IC, nous avons à notre disposition au laboratoire 2 cohortes de patients. L'étude REVE-2, qui a inclus les patients hospitalisés pour un 1^{er} IDM antérieur dans 8 centres en France (Lille, Lens, Roubaix, Béthune, Dunkerque, Boulogne, Saint-Omer et Caen) entre 2006 et 2008, a permis l'étude du RVG post-IDM (Fertin et al., 2010). Les patients sont suivis pendant 1 an, à 4 temps : inclusion, 1 mois, 3 mois et 1 an. Enfin, l'étude INCA est une étude prospective ayant inclus tous les patients hospitalisés pour une IC systolique (à fraction d'éjection réduite) au CHRU de Lille entre 1998 et 2010 (de Groote et al., 2004; Lemesle et al., 2015). Le devenir des patients est déterminé après 3 ans de suivi. Cette étude permet l'étude du décès précoce des patients présentant une IC systolique.

L'objectif de ma thèse est d'utiliser les approches de protéomique à haut débit et la biologie des systèmes pour l'identification de biomarqueurs du RVG et du décès précoce des patients IC. Dans ce but, des réseaux moléculaires du RVG et de l'IC ont été construits à partir des données expérimentales obtenues sur les études REVE-2 et INCA respectivement.

Ma thèse se divise donc en 2 grands axes :

- 2 L'analyse du réseau moléculaire de REVE-2 pour identifier des biomarqueurs permettant de détecter le RVG à un stade précoce et étudier les mécanismes sous-jacents au RVG.
- 2 L'analyse du réseau moléculaire de INCA pour identifier des biomarqueurs permettant de prédire le décès précoce des patients présentant une IC systolique et étudier les mécanismes impliqués dans l'IC.

Matériel et méthodes

1 Modèles

1.1 Etude REVE-2

L'étude REVE-2 est une étude multicentrique qui inclut 246 patients hospitalisés pour un IDM antérieur inaugural dans 8 centres en France (Lille, Lens, Roubaix, Béthune, Dunkerque, Boulogne, Saint-Omer et Caen) entre Février 2006 et Septembre 2008 (Fertin et al., 2010). Les critères d'inclusion étaient l'hospitalisation dans les 24 heures suivant l'apparition des symptômes et la présence de 3 segments de la zone infarctée du VG akinétiques à l'échographie de sortie. Les critères d'exclusion étaient des images d'échographie de qualité insuffisante, une maladie chronique non cardiaque, une maladie valvulaire ou un IDM précédent. Le protocole de recherche a été approuvé par le comité d'éthique du Centre Hospitalier de Lille (CP 05/91 du 13 décembre 2005) et le consentement écrit a été recueilli pour chaque patient.

Un suivi échocardiographique a été réalisé à la sortie de l'hôpital (entre le 3^e et le 7^e jour post-IDM), 3 mois et 1 an. Des prélèvements sériés de plasma ont été réalisés à différents temps : sortie de l'hôpital (inclusion), 1 mois, 3 mois et 1 an. Le RVG est défini par une augmentation de 20% du volume télédiastolique entre l'inclusion et 1 an post-IDM.

Vingt-quatre variables moléculaires ont été quantifiées dans le plasma des patients de l'étude REVE-2 à un ou plusieurs temps. L'expression de chaque molécule a été comparée entre les patients avec et sans RVG, à chaque temps, par un t-test bilatéral ($P < 0,05$).

1.2 Population INCA

L'étude INCA est une étude prospective sur les indicateurs pronostiques de l'IC qui a inclus tous les patients hospitalisés pour une IC systolique (FEVG < 45%) au CHRU de Lille entre Novembre 1998 et Mai 2010. L'étude INCA a été approuvée par le comité d'éthique du Centre Hospitalier de Lille (CP 98/94 du 5 novembre 1998), et le consentement informé et écrit a été obtenu pour chaque patient. Tous les patients étaient cliniquement stables pendant au moins 2 mois après l'inclusion et ont reçu le traitement médical optimal. A l'inclusion, les patients ont subi une mesure du taux de BNP, une échocardiographie et un test cardiopulmonaire. Une coronarographie a également été réalisée pour déterminer l'étiologie de la dysfonction systolique ventriculaire gauche (ischémique ou non ischémique). Un suivi des patients a été réalisé 3 ans après l'inclusion pour déterminer l'issue clinique des patients.

2 Construction des réseaux d'interactions moléculaire de REVE-2 et INCA

Un réseau d'interactions moléculaires a été construit à partir des 24 variables moléculaires dosées dans le plasma des patients de l'étude REVE-2, en collaboration avec la société EdgeLeap. La plateforme EdgeBox, propriété d'EdgeLeap, a été utilisée pour construire le réseau. Elle contient 12 bases de données publiques permettant d'extraire des nœuds ou des interactions (Table 4).

Table 4 : Bases de données contenues dans la plateforme EdgeBox pour la construction du réseau REVE-2

Ressource	Version	URL	Type (N=nœud, I=interaction)
ENCODE	2012-09-06	http://encodenets.gersteinlab.org	I
EnsemblGenes	Release 79	http://www.ensembl.org	N
HMDB	v3.6	http://www.hmdb.ca	N, I
Microcosm	v5	http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm	I
miRBase	v21	http://www.mirbase.org	N
miRecords	v4	http://c1.accurascience.com/miRecords	I
miRTarBase	v4.5	http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw	I
Reactome	v52	http://www.reactome.org	I
STRING	v9.1	http://string-db.org	I
TargetScan	v6.2	http://www.targetscan.org	I
Tfe	2015-04-12	http://www.cisreg.ca/cgi-bi/tfe/home.pl	I
WikiPathways	2015-04-12	http://wikipathways.org	I

Pour construire le réseau moléculaire de REVE-2, un set de nœuds a tout d'abord été extrait à partir de la plateforme EdgeBox et inclut :

1. Toutes les molécules correspondant à une variable REVE-2.
2. Toutes les molécules qui sont des voisins directs des nœuds précédents (1).
3. Toutes les molécules appartenant aux chemins les plus courts jusqu'à 3 interactions entre tous les nœuds définis par l'étape 1.

Ensuite, toutes les interactions entre ces nœuds ont été recherchées. S'il existe plusieurs interactions entre 2 nœuds, elles sont regroupées en un seul lien. Trois critères ont été utilisés pour éliminer les interactions peu spécifiques :

1. Pour les interactions microARN-cible, les interactions ont été incluses uniquement si la cible a été validée expérimentalement (données disponibles sur miRTarBase), ou si la cible a été prédite par au moins 3 bases de données différentes (Microcosm, miRecords et TargetScan).
2. Pour les interactions extraites de la base de données STRING, seules celles avec un score supérieur à 800 ont été incluses.
3. Pour les interactions obtenues par WikiPathways, les interactions de la catégorie « *in group* » sont exclues car elles n'ont pas de signification biologique.

Le réseau d'interaction moléculaire INCA a été construit à partir des 203 protéines significativement modulées entre les patients décédés et les patients vivants après 3 ans, et l'utilisation de la plateforme EdgeBox, contenant 13 bases de données publiques. (Table 5).

Table 5 : Bases de données contenues dans la plateforme EdgeBox pour la construction du réseau INCA

Ressource	Version	URL	Type (N=nœud, I=interaction)
ChEBI	v140	https://www.ebi.ac.uk/chebi	N
CheEMBL	v21	https://www.ebi.ac.uk/chembl	I
ENCODE	2012-09-06	http://encodenets.gersteinlab.org	I
EnsemblGenes	Release 84	http://www.ensembl.org	N
Microcosm	v5	http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm	I
miRBase	v21	http://www.mirbase.org	N
miRecords	v4	http://c1.accurascience.com/miRecords	I
miRTarBase	v6.1	http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw	I
Reactome	v56	http://www.reactome.org	I
STRING	v10.0	http://string-db.org	I
STITCH	V4.0	http://stitch.embl.de	I
Tfe	2016-06-09	http://www.cisreg.ca/cgi-bi/tfe/home.pl	I
WikiPathways	2016-06-09	http://wikipathways.org	I

Le réseau INCA contient :

1. Les 203 protéines significativement modulées entre les patients décédés et les patients vivants après 3 ans de suivi et ayant au moins un lien avec un autre nœud du réseau, appelées «protéines INCA ».
2. Les nœuds qui sont les voisins directs d'au moins 2 protéines INCA.
3. Les liens connectant 2 protéines INCA ou une protéine INCA et un nœud correspondant au critère 2.

3 Quantification des ARNs par RT-Q-PCR

3.1 Extraction des ARNs du tissu

Les ARNs ont été extraits des VG par la méthode d'extraction au Tri Reagent (T9424 Sigma Aldrich).

Les VG sont lysés dans 1 mL de Tri Reagent et conservés à -80°C. Dans chaque tube, on ajoute 200 µL de chloroforme, avant centrifugation pendant 12 minutes à 4°C à 10 000 g. On obtient alors 3 phases, une phase inférieure contenant les composés organiques, une interphase composée des protéines et une phase supérieure contenant les acides nucléiques. La phase supérieure est récupérée et on y ajoute le même volume d'isopropanol (environ 400 µL). Les tubes sont incubés 2h à -20°C, puis centrifugés 30 minutes à 4°C à 10 000 g. Le surnageant est jeté et le culot composé d'un précipité d'ARNs est lavé avec 800 µL d'éthanol à 70%. On jette le surnageant et on centrifuge pendant 10 minutes à 4°C à 10 000 g. L'éthanol restant est éliminé par pipetage. Le culot d'ARN est séché à 4°C, puis repris dans 40 µL d'eau sans RNase. Enfin, les échantillons sont chauffés quelques secondes à 85°C pour améliorer la solubilisation des ARNs, qui sont ensuite conservés à -80°C.

La concentration des échantillons est déterminée au « Nanovue » à partir d'1 µL d'échantillon. La qualité des échantillons est ensuite déterminée grâce à des puces Pico6000 RNA (Agilent) et le Bioanalyzer 2100 (Agilent). On obtient alors la concentration et l'intégrité de l'ARN donnée par le *RNA integrity number* (RIN). Pour la quantification des ARNs par Q-PCR, il est nécessaire d'avoir un RIN supérieur ou égal à 3 pour les microARNs et 6 pour les ARNm.

3.2 Rétro-transcription des ARNs

Le kit miScript II RT (Qiagen n°218160) est utilisé pour la rétro-transcription (RT) des microARNs et des ARNm en ADN complémentaire, en fonction du tampon utilisé. Quatre microlitres de tampon HiSpec pour les microARNs, ou HiFlex pour les ARNm, sont mélangés à 2 µL de Nucleics Mix, 2 µL de rétro-transcriptase, 2 µL d'ARNs et 10 µL d'eau sans RNases. Le mélange est incubé 60 minutes à 37°C, puis 5 minutes à 95°C, et enfin refroidi à 4°C. Les tubes contenant l'ADNc sont conservés à -80°C.

3.3 PCR quantitative

La dilution de l'ADNc à utiliser pour chaque amorce est déterminée en réalisant des dilutions sériées. On obtient alors une courbe de dissociation, représentant l'évolution des Ct en fonction du log de la concentration initiale en ADNc, qui permet de calculer l'efficacité de la réaction. Cette efficacité doit être la plus proche de 100% pour pouvoir comparer de manière fiable les échantillons par la méthode du 2^{-Ct} (Livak and Schmittgen, 2001).

Pour quantifier les microARNs et les ARNm, le kit miScript SYBR Green PCR (Qiagen n°218073) a été utilisé. Le mélange réactionnel est composé de 12,5 µL de tampon Quantitect SYBR Green PCR Master, 2,5 µL d'amorces, 7,5 µL d'eau sans RNase et 2,5 µL d'ADNc dilué. Les échantillons sont déposés en duplicat sur une même plaque, ainsi qu'un témoin négatif ne contenant pas d'ADNc. Les normalisateurs utilisés pour la quantification des ARNm et des microARNs du VG sont respectivement l'HPRT (*Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*) et le miR-423-3p. Le normalisateur est déposé en duplicat sur la même plaque que l'ARN d'intérêt. La liste des amorces utilisées est présentée dans la table 6.

Table 6 : Liste des amorces utilisées

ARN	Amorces
miR-26b-5p	Rn_miR-26b_1 (MS00000140, Qiagen)
miR-17-5p	Rn_miR-17-5p_1 (MS00013118, Qiagen)
miR-335-5p	Rn_miR-335_2 (MS00043414, Qiagen)
miR-375-3p	Rn_miR-375_2 (MS00033516, Qiagen)
miR-423-3p	Rn_miR-423_1 (MS00013615, Qiagen)
ESR1	Forward :CGACACTTTGATCCCACTTGATGG Reverse : CAGGTCATAGAGAGGCACGACA
HPRT	Forward :ATGGGAGGCCATCACATTGT Reverse : ATGTAATCCAGCAGGTCAGCAA

4 Quantification des protéines par *SOMAscan assay*

Une analyse protéomique a été réalisée sur le plasma des 168 patients de l'étude INCA. Le *SOMAscan assay* a été utilisé pour mesurer simultanément 1310 protéines. La technique du *SOMAscan assay* a été décrite en introduction.

Un test non paramétrique de Mann-Whitney-Wilcoxon a été réalisé sur les 1310 protéines et a permis l'identification de 203 protéines significativement modulées entre les patients décédés pendant les 3 ans et les patients vivants.

5 Quantification de la cathepsine S par ELISA

La cathepsine S a été quantifiée en utilisant le kit Human Cathepsin S ELISA kit (Abcam ab155427), selon les instructions du fabricant. Les échantillons de plasma ont été dilués au 1/1000 et la concentration de cathepsine S a été déterminée en calculant l'absorbance moyenne pour chaque standard et échantillon.

6 Quantification de C3, MMP-1 et MMP-7 par la technologie Luminex

Les taux plasmatiques de MMP-1, MMP-7 et C3 sont mesurés en utilisant la technologie Luminex (R&D systems FCSTM07-02 pour MMP-1 and MMP-7 and Merck-Millipore HCMP2MAG-19K-07 pour C3), selon les instructions des fabricants. Pour MMP-1 et MMP-7, les échantillons de plasma ont été dilués au 1/4 et pour C3 au 1/40000.

7 Analyse statistique des données de protéomique à haut débit

Dans le but de sélectionner un petit nombre de protéines permettant de prédire le décès précoce des patients IC, des régressions logistiques pénalisées ont été réalisées. Les pénalités Ridge (Hoerl and Kennard, 1970) et Lasso (Tibshirani, 1996) ont été choisies pour prendre en compte le grand nombre de variables comparé au petit nombre d'individus disponibles, et les potentiels problèmes de corrélation entre les quantifications des protéines. Tout d'abord, une régression Ridge a été appliquée aux 203 protéines significativement modulées dans le plasma des patients de l'étude INCA, puis une régression de Lasso adaptatif (Zou, 2006). Tous les

paramètres de régularisation ont été fixés par cross validation « *leave-one-out* ». Pour limiter l'influence d'individus extrêmes, 168 Lasso adaptatifs ont été réalisés avec les paramètres définis précédemment, en retirant à chaque fois un individu parmi les 168. Nous avons gardé uniquement les protéines avec une fréquence de sélection supérieure à 0,9, dans le but de limiter l'influence d'individus extrêmes. Toute la procédure a été réalisée grâce au package glmnet (version 2.0.16) de R (Friedman et al., 2010), avec l'aide de la plateforme Bilille.

Résultats

1 Partie 1 : Analyse du réseau moléculaire de RVG post-IDM : Etude REVE-2

1.1 Objectifs de l'étude

Afin d'étudier les mécanismes impliqués dans le RVG post-IDM et d'identifier de nouveaux biomarqueurs permettant de le détecter à un stade précoce, des analyses de protéomique et phosphoprotéomique différentielles sans *a priori* ont été réalisées dans l'équipe, dans un modèle de rats IC post-IDM. Le protéome et le phosphoprotéome des VG des rats témoins ont été comparés à ceux des VG des rats IC à 2 mois post-IDM. Ces analyses ont permis l'identification de 45 protéines différentiellement exprimées et/ou phosphorylées dans le VG des rats IC à 2 mois post-IDM comparés aux rats témoins (Cieniewski-Bernard et al., 2008; Dubois et al., 2011).

Ensuite, une analyse bioinformatique a été réalisée à partir de ces 45 protéines en utilisant le logiciel *Inguinity Pathway Analysis* (IPA) dans le but d'identifier des microARNs impliqués dans la régulation de ces protéines. Cette analyse a permis l'identification de 13 microARNs liés à 8 protéines. Ces 13 microARNs ont ensuite été dosés par RT-Q-PCR dans le VG et le plasma des rats IC et témoins à 7 jours et 2 mois post-IDM. Trois de ces 3 microARNs sont significativement modulés dans le VG et le plasma des rats IC, les miR-21-5p, miR-222-3p et miR-23a-3p, et sont liés à la protéine anti-oxydante SOD2 (Superoxyde dismutase 2). Certains de ces protéines et microARNs ont ensuite été quantifiés dans le plasma des patients post-IDM de l'étude REVE-2.

Les objectifs de cette partie sont d'étudier les mécanismes sous-jacents au RVG post-IDM et d'identifier de nouveaux biomarqueurs permettant de le détecter à un stade précoce. Pour cela, nous avons à notre disposition une cohorte de patients post-IDM suivis pendant un an, l'étude REVE-2. L'intérêt de l'étude REVE-2 repose sur le suivi des patients à 4 temps (inclusion, 1 mois, 3 mois et 1 an), ce qui permet d'étudier les mécanismes impliqués dans le RVG au cours du temps.

Les données obtenues par l'approche de protéomique différentielle chez le rat et validées dans le plasma des patients de l'étude REVE-2 ont été utilisées pour réaliser une analyse en biologie des systèmes, par la construction et l'analyse d'un réseau moléculaire du RVG. Le but est de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le RVG post-IDM par l'étude des modules actifs du réseau REVE-2, et d'identifier un nombre de molécules d'intérêt (protéines et microARNs) limité par l'analyse de la centralité des molécules du réseau.

1.2 Résultats

1.2.1 Caractéristiques de la population REVE-2

La table 7 présente les caractéristiques basales des patients inclus dans l'étude REVE-2.

Table 7 : Caractéristiques basales des patients de l'étude REVE-2

n	246
Age (années)	57 ± 14
Femmes	46 (19%)
Indice de masse corporelle, kg/m²	27,1 ± 4,6
Hypercholestérolémie : cholestérol > 250mg/dl	82 (33%)
Hypertension : pression artérielle > 160/90 mmHg	89 (36%)
Fumeurs	116 (47%)
Diabète	51 (21%)
Stratégie de reperfusion initial	
Angioplastie primaire	128 (52%)
Thrombolyse seule	28 (11%)
Thrombolyse et Angioplastie	59 (24%)
Pas de reperfusion	31 (13%)
IC pendant l'hospitalisation (Classe Killip ≥ 2)	79 (32%)
Pic de créatine kinase, UA	3018 ± 2376
FEVG, %	49 ± 8
Traitements	
Thérapie antiplaquettaire	246 (100%)
β-bloquants	238 (97%)
IEC	238 (97%)
Statines	231 (94%)
Suivi échocardiographique à 1 an	
Nombre de patients	226 (92%)
RVG	87 (38,5%)

Les variables continues sont exprimées en moyenne ± écart-type et les variables catégorielles sont présentées en valeur absolue et/ou pourcentages.

IEC : Inhibiteurs de l'enzyme de conversion

Les patients inclus étaient âgés en moyenne de 57 ans et étaient majoritairement des hommes (200 sur 246). Les patients ont, en très grande majorité, reçu les traitements recommandés (β-bloquants, IEC, statines). Sur les 246 patients inclus au début de l'étude, 226 ont été suivis aux 4 temps (inclusion, 1 mois, 3 mois et 1 an), et 87 d'entre eux présentaient un RVG un an après l'IDM, soit 38,5%.

Les patients présentant un RVG post-IDM avaient des taux de BNP plasmatiques significativement plus élevés que les patients sans RVG à tous les temps. Cependant, une diminution progressive des taux de BNP est observée pour tous les patients entre l'inclusion et 1 an (Fertin et al., 2010).

Vingt-quatre variables moléculaires ont été précédemment dosées dans le plasma des patients de l'étude REVE-2 dont 18 protéines et 6 ARNs non codants, à un ou plusieurs temps (table 8).

Table 8 : Liste des 24 variables dosées dans le plasma des patients de l'étude REVE-2

Variables REVE-2	Inclusion (P valeur; Statistique T)	1 mois (P valeur; Statistique T)	3 mois (P valeur; Statistique T)	1 an (P valeur; Statistique T)
BNP	0,0413 2,0562	0,0004 3,5945	0,0001 3,9203	0,0098 2,6143
CRP	0,0058 2,7926	0,2546 1,1433	0,1525 1,43795	0,4517 -0,75427
Fas L	ND	0,2526 -1,1485	ND	ND
Galectine-3	ND	0,1020 -1,6450	ND	ND
HGF	0,8583 0,1788	0,3875 0,8659	0,1148 1,5845	0,6467 0,4592
ICTP	ND	0,0620 1,8776	ND	ND
PINP	ND	0,9140 -0,1082	ND	ND
PIINP	ND	0,3085 -1,0218	ND	ND
LIPCAR	0,0153 -2,4483	0,0191 2,3671	0,0106 2,5805	0,1220 1,5548
MMP1	0,8944 -0,1330	0,8273 -0,2184	0,7682 -0,6689	0,5044 -0,6689
MMP2	0,9195 0,1011	0,7332 0,3414	0,0365 2,1101	0,1180 1,5719
MMP3	0,4373 -0,7785	0,6301 -0,4825	0,5647 -0,5769	0,3160 -1,0056
MMP8	0,0237 2,2800	0,0244 2,2701	0,0211 2,3251	0,0934 1,6856
MMP9	0,047 1,9994	0,2292 1,2063	0,4442 0,7667	0,3441 0,9483
TIMP2	0,8220 -0,2253	0,9388 -0,0769	0,3583 0,9221	0,3385 0,9594
TIMP4	0,9234 -0,0963	0,4388 0,7760	0,3518 0,9335	0,2153 1,2433
Peak CK	0,0007 3,4545	ND	ND	ND
TIMP1	0,2546 1,1430	0,4687 0,7264	0,5001 0,6761	0,8469 0,1934
ST2	ND	0,7706 -0,2922	ND	ND
Troponine positive	ND	0,0374 2,1021	0,0035 2,9796	0,2357 1,1911
Troponine	0,0998 1,6559	ND	ND	ND
miR-133a-3p	0,0336 -2,1412	0,2783 1,0875	0,3202 0,9967	0,5862 -0,5453

miR-21-5p	0,0087	0,7918	0,2067	0,6262
	-2,6502	0,2644	1,2673	0,4879
miR-222-3p	0,0247	0,3042	0,0431	0,2586
	-2,2735	1,0303	2,0366	1,1329
miR-23a-3p	0,0357	0,0567	0,2341	0,5301
	-2,11897	1,9222	1,1940	0,6291
miR-423-5p	0,06937	0,0780	0,3900	0,2256
	-1,8269	-1,7734	-0,8618	-0,2579

Pour la statistique T, une valeur positive indique une moyenne plus élevée chez les patients avec un RVG, alors qu’une valeur négative indique une moyenne plus faible.

ND : non quantifié

1.2.2 Analyse du réseau d’interactions moléculaires de REVE-2

Ces résultats ont fait l’objet d’une opublication en **Annexe I** : Pinet et al., 2017

Le réseau moléculaire construit à partir des données expérimentales de l’étude REVE-2 est composé de 1310 nœuds liés par 8639 interactions. La table 9 détaille le nombre de nœuds par type et la table 10 le nombre d’interactions par type.

Table 9 : Liste des nœuds par type

Type de Nœud	Nombre de nœuds dans le réseau REVE-2
Protéine	1263
microARN	24
Métabolites	22
ARN long non codant	1

Table 10 : Liste des interactions par type

Type d’interactions	Nombre d’interactions dans le réseau REVE-2
Dans la même réaction	2923
Interagit avec	2439
Régule la transcription	2008
Cibles des miARNs	1798
Dans une réaction voisine	1725
Dans le même compartiment	1431
Catalyse	501
Dans les mêmes groupes	294
Inhibe	48
Corrèle positivement	25
Active la transcription	10
Corrèle négativement	3
Transporte	3
Co-contrôle une interaction	1
Modifie une protéine	1

1.2.2.1 Analyse de la topologie du réseau REVE-2

Dans le but d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le développement du RVG post-IDM et associés avec les variables mesurées dans le plasma des patients de l'étude REVE-2, les molécules du réseau REVE-2 ont été assignées à des *clusters* annotés pour les processus biologiques. Le *clustering* du réseau REVE-2 a été réalisé en utilisant l'algorithme InfoMap du package igraph de R (version 0.7.1). L'algorithme InfoMap assigne chaque nœud du réseau REVE-2 à un *cluster*. Les *clusters* contenant moins de 5 nœuds, et les *clusters* avec seulement une interaction ou moins par nœud à l'intérieur du *cluster* sont exclus.

Cette analyse permet donc l'identification de groupes de nœuds qui sont plus fortement connectés entre eux qu'avec les autres nœuds du réseau, qui représentent des processus biologiques ou des complexes protéiques. Pour chaque *cluster*, une analyse de surreprésentation a été réalisée pour identifier des termes « *Biological process* » dans *Gene Ontology* (GO) qui sont enrichis avec des gènes du réseau, en utilisant un test exact de Fisher. Les termes GO significativement enrichis ($p < 0,05$) ont été ajoutés aux propriétés du réseau, et permettent de déterminer les voies biologiques dans lesquelles les molécules du réseau sont impliquées.

Au total, 34 *clusters* ont été identifiés dans le réseau REVE-2. Tous les *clusters* ont pu être assignés à au moins un terme GO. Vingt-et-une des 24 variables mesurées dans le plasma des patients de l'étude REVE-2 appartiennent à un *cluster* et 12 *clusters* contiennent au moins une de ces variables. La liste des *clusters* est présentée dans la table 11.

De façon intéressante, les *clusters* les plus représentés dans le réseau REVE-2 sont associés à l'inflammation, la régulation de la transcription et de la traduction, l'apoptose, les voies de signalisation et l'organisation de la matrice extracellulaire.

Table 11 : Liste des *clusters* du réseau REVE-2

<i>Cluster</i>	Nœuds	Liens	Variables REVE-2	Catégorie GO la plus significative ¹	Catégories GO ²
1	191	1013	ST2	sequence-specific DNA binding [43]	RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding [31]; RNA polymerase II regulatory region DNA binding [31]; transcription regulatory region sequence-specific DNA binding [31]; nucleic acid binding transcription factor activity [44]; sequence-specific DNA binding transcription factor activity [44]; DNA binding [68]; sequence-specific DNA binding RNA polymerase II transcription factor activity [32]; structure-specific DNA binding [24]; regulatory region DNA binding [36]
2	203	302	miR-21-5p	intrinsic component of membrane [54]	integral component of membrane [53]
3	57	978	ICTP, P1NP, P3NP	Endoplasmic reticulum lumen [45]	collagen trimer [39]; extracellular matrix organization [54]; extracellular structure organization [54]; collagen metabolic process [39]; multicellular organismal metabolic process [39]; multicellular organismal macromolecule metabolic process [39]; proteinaceous extracellular matrix [43]; collagen catabolic process [35]; extracellular matrix [44]
4	65	403	HGF	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway [53]	enzyme linked receptor protein signaling pathway [55]; cell surface receptor signaling pathway [57]; peptidyl-tyrosine phosphorylation [32]; immune response-regulating cell surface receptor signaling pathway [31]; protein tyrosine kinase activity [24]; locomotion [49]; protein autophosphorylation [28]; phosphatidylinositol-mediated signaling [26]; Fc receptor signaling pathway [28]
5	98	123	miR-222-3p	RNA binding [29]	poly(A) RNA binding [24]
6	37	495	TIMP1	platelet alpha granule lumen [31]	secretory granule lumen [31]; platelet alpha granule [31]; cytoplasmic membrane-bounded vesicle lumen [31]; platelet degranulation [31]; secretory granule [31]; exocytosis [32]; platelet activation [31]; secretion by cell [33]; secretion [33]
7	35	392	troponine	muscle filament sliding [28]	actin-myosin filament sliding [28]; actin-mediated cell contraction [28]; actin filament-based movement [28]; muscle contraction [30]; muscle system process

8	30	271		nuclear-transcribed mRNA catabolic process [22]	[30]; myofibril [28]; contractile fiber [28]; sarcomere [26]; cytoskeletal protein binding [29] mRNA catabolic process [22]; RNA catabolic process [22]; translation [25]; aromatic compound catabolic process [22]; translational initiation [19]; nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay [17]; SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane [16]; protein targeting to ER [16]; establishment of protein localization to endoplasmic reticulum [16]
9	47	154	MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, TIMP2, TIMP4	extracellular matrix (ECM) disassembly [32]	ECM organization [36]; extracellular structure organization [36]; ECM [27]; endopeptidase activity [20]; proteinaceous ECM [23]; peptidase activity [20]; extracellular region [38]; extracellular space [24]; Golgi lumen [10]
10	38	75		ATP binding [34]	adenyl nucleotide binding [34]; purine nucleoside binding [34]; purine ribonucleoside triphosphate binding [34]; ribonucleoside binding [34]; nucleoside binding [34]; purine nucleotide binding [34]; nucleotide binding [34]; small molecule binding [34]; phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor [23]
12	30	75		mitotic cell cycle phase transition [16]	cell cycle phase transition [16]; G1/S transition of mitotic cell cycle [13]; mitotic cell cycle [20]; mitotic cell cycle process [19]; cell cycle [22]; cell cycle process [20]; regulation of cell cycle [17]; cellular response to DNA damage stimulus [14]; anaphase-promoting complex-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process [6]
13	32	33		O-glycan processing [3]	protein O-linked glycosylation [3]; Golgi membrane [5]
14	22	111	FasL	activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process [13]	activation of cysteine-type endopeptidase activity [13]; positive regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process [13]; positive regulation of cysteine-type endopeptidase activity [13]; positive regulation of endopeptidase activity [13]; positive regulation of apoptotic process [17]; positive regulation of programmed cell death [17]; positive regulation of cell death [17]; positive regulation of peptidase

				activity [13]; zymogen activation [13]
15	17	67	G2/M transition of mitotic cell cycle [10]	Centrosome [11]; microtubule organizing center [11]; mitotic cell cycle process [13]; microtubule cytoskeleton [12]; mitotic cell cycle [13]; mitotic cell cycle phase transition [10]; cell cycle phase transition [10]; cell cycle process [13]; organelle organization [16]
16	23	33	G-protein coupled receptor signaling pathway [5]	activation of phospholipase C activity [3]; inositol phosphate metabolic process [3]; calcium ion binding [6]; alcohol metabolic process [4]; protein kinase C activity [2]; positive regulation of phospholipase C activity [3]; organophosphate metabolic process [6]
18	14	61	RNA splicing, via transesterification reactions [13]	mRNA splicing, via spliceosome [13]; RNA splicing [14]; mRNA processing [14]; RNA processing [14]; mRNA metabolic process [14]; RNA binding [13]; ribonucleoprotein complex [10]; poly(A) RNA binding [12]; catalytic step 2 spliceosome [5]
19	16	29	positive regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway [6]	intrinsic apoptotic signaling pathway [9]; intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage [7]; regulation of mitochondrial membrane permeability [6]; regulation of membrane permeability [6]; mitochondrial outer membrane [6]; apoptotic mitochondrial changes [7]; release of cytochrome c from mitochondria [6]; mitochondrial membrane organization [6]; outer membrane [6]
20	22	23	phosphatase activity [13]	phosphoric ester hydrolase activity [13]; phosphoprotein phosphatase activity [11]; hydrolase activity, acting on ester bonds [14]; dephosphorylation [13]; protein dephosphorylation [10]; peptidyl-tyrosine dephosphorylation [8]; protein tyrosine phosphatase activity [8]; hydrolase activity [17]; catalytic activity [21]
21	14	32	toll-like receptor 2 signaling pathway [10]	MyD88-dependent toll-like receptor signaling pathway [9]; toll-like receptor TLR1:TLR2 signaling pathway [9]; toll-like receptor TLR6:TLR2 signaling pathway [9]; toll-like receptor 4 signaling pathway [10]; pattern recognition receptor signaling pathway [10]; toll-like receptor signaling pathway [10]; activation of innate immune response [10]; innate immune response-activating signal transduction [10];

				positive regulation of innate immune response [10]
22	15	17	steroid hormone receptor activity [4]	steroid hormone mediated signaling pathway [4]; hormone-mediated signaling pathway [4]; ligand-activated sequence-specific DNA binding RNA polymerase II transcription factor activity [3]; direct ligand regulated sequence-specific DNA binding transcription factor activity [3]; fatty acid beta-oxidation [3]; cellular response to steroid hormone stimulus [4]; fatty acid oxidation [3]; lipid oxidation [3]; transcription initiation from RNA polymerase II promoter [4]
24	11	19	regulation of cell differentiation [9]	endodermal cell fate commitment [3]; endodermal cell fate specification [3]; negative regulation of cell differentiation [7]; somatic stem cell maintenance [4]; developmental induction [3]; cell fate commitment involved in formation of primary germ layer [3]; transcription factor complex [5]; embryonic morphogenesis [6]; sex differentiation [5]
25	10	18	cell surface [7]	cell adhesion molecule binding [5]; cell adhesion [8]; extracellular vesicular exosome [9]; integrin complex [3]; membrane-bounded vesicle [9]; vesicle [9]; external side of plasma membrane [4]; integrin binding [4]; cellular extravasation [3]
26	11	16	cellular component disassembly involved in execution phase of apoptosis [5]	execution phase of apoptosis [5]; apoptosome [2]; gamma-catenin binding [2]; apoptotic process [8]; programmed cell death [8]; cell death [8]; death [8]; activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process by cytochrome c [2]; catenin complex [2]
28	9	14	negative regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway [5]	transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway [7]; negative regulation of cellular response to growth factor stimulus [5]; regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway [5]; negative regulation of transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway [5]; pathway-restricted SMAD protein phosphorylation [4]; regulation of cellular response to growth factor stimulus [5]; transforming growth factor beta receptor signaling pathway [5]; response to transforming growth factor

29	8	15	Small GTPase mediated signal transduction [7]	beta [5]; cellular response to transforming growth factor beta stimulus [5] regulation of small GTPase mediated signal transduction [7]; GDP-dissociation inhibitor activity [3]; positive regulation of GTPase activity [5]; regulation of Rab protein signal transduction [5]; regulation of Ral protein signal transduction [5]; regulation of Cdc42 protein signal transduction [5]; regulation of Rac protein signal transduction; [5] regulation of GTPase activity [5]; regulation of Rap protein signal transduction [5]
30	11	12	BNP protein targeting to mitochondrion [3]	protein localization to mitochondrion [3]; mitochondrial transport [3]; mitochondrial inner membrane [3]; organelle inner membrane [3]
32	9	12	DNA repair [7]	DNA metabolic process [8]; translesion synthesis [3]; cellular response to DNA damage stimulus [7]; DNA biosynthetic process [4]; DNA-directed DNA polymerase activity [3]; postreplication repair [3]; nucleotidyltransferase activity [3]; cellular response to stress [7]; error-prone translesion synthesis [2]
33	9	10	nuclear pore [4]	pore complex [4]; nuclear membrane [5]; nuclear envelope [5]; ribosomal protein import into nucleus [2]; RNA localization [3]; mitotic nuclear envelope disassembly [2]; nuclear envelope disassembly [2]; nuclear import [4]; NLS-bearing protein import into nucleus [2]
35	7	11	Mitochondrial inner membrane [4]	organelle inner membrane [4]; mitochondrial membrane [4]; mitochondrial envelope [4]; cellular respiration [3]; oxidation-reduction process [4]; ATP synthesis coupled proton transport [2]; mitochondrial ATP synthesis coupled proton transport [2]; proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1) [2]; proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism [2]
37	7	8	DNA-directed RNA polymerase II, holoenzyme [4]	RNA polymerase II transcription factor complex [4]; SAGA-type complex [3]; nuclear transcription factor complex [4]; transcription elongation from RNA polymerase II promoter [3]; transferase complex [5]; DNA-templated transcription, elongation [3]; histone acetyltransferase complex [3]; transcription factor

39	6	11		Post transcriptional gene silencing [5]	TFTC complex [2]; TBP-class protein binding [2] gene silencing by RNA [5]; micro-ribonucleoprotein complex [4]; gene silencing [5]; gene silencing by miRNA [4]; regulation of gene expression, epigenetic [5]; pre-miRNA processing [3]; negative regulation of translation involved in gene silencing by miRNA [3]; miRNA loading onto RISC involved in gene silencing by miRNA [3]; RISC complex [3]
40	7	12	CRP	complement activation [5]	protein activation cascade [5]; humoral immune response [5]; humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin [4]; complement activation, classical pathway [4]; immunoglobulin mediated immune response [4]; B cell mediated immunity [4]; positive regulation of immune response [5]; adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains [4]; adaptive immune response [4]
41	6	11	Creatine kinase	Creatine metabolic process [4]	cellular modified amino acid metabolic process [4]; alpha-amino acid metabolic process [4]; cellular amino acid metabolic process [4]; creatine kinase activity [2]; carboxylic acid metabolic process [4]; organic acid metabolic process [4]; small molecule metabolic process [4]

¹ indique le terme GO le plus significatif dans le *cluster* ; ² indique tous les termes GO du *cluster* (dans l'ordre de significativité). Les nombres entre crochets le nombre de gènes du *cluster* enrichis en ce terme GO

Le réseau REVE-2 est visualisé en utilisant le logiciel Cytoscape (version 3.2.1). La figure 34 est une représentation de la totalité du réseau REVE-2.

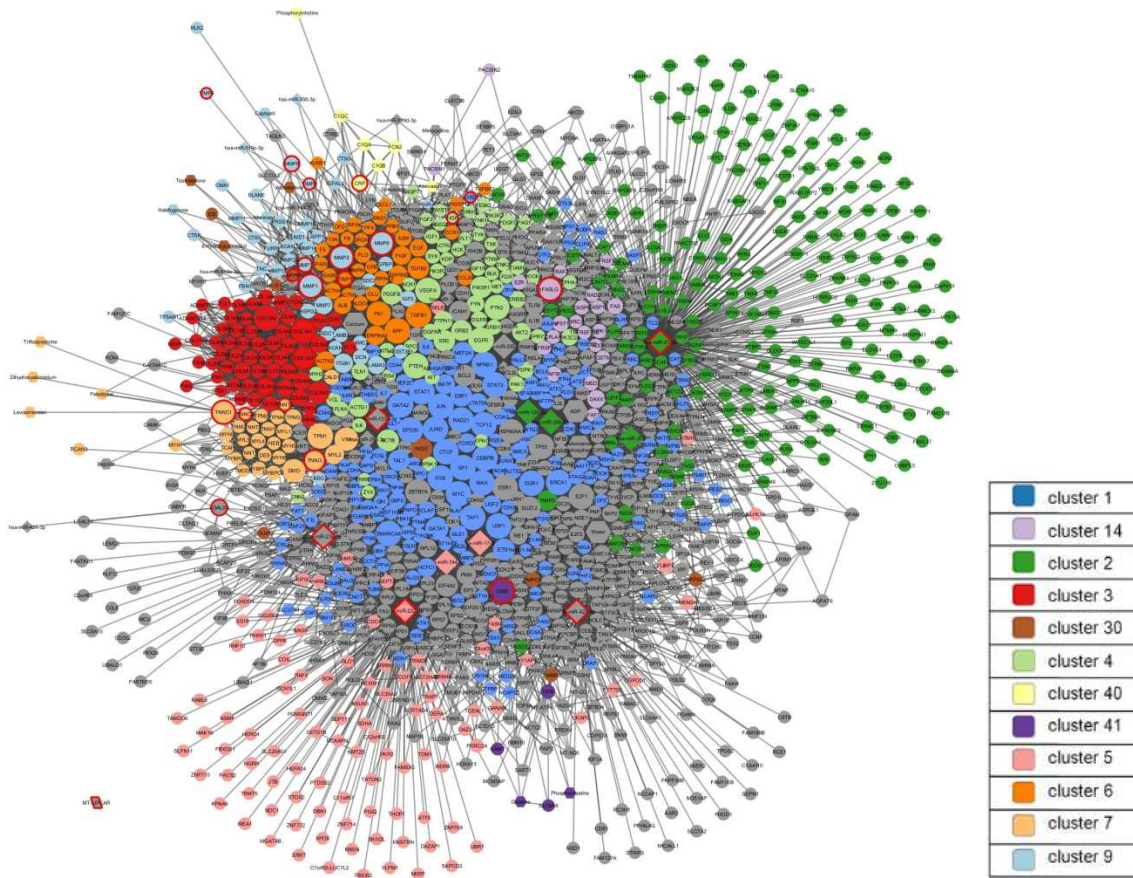


Figure 34 : Visualisation du réseau d’interactions moléculaires de REVE-2. Les nœuds représentés en couleurs appartiennent aux 12 *clusters* contenant une variable quantifiée dans le plasma des patients de l’étude REVE-2, et les nœuds entourés en rouge correspondent aux variables REVE-2. La taille des nœuds reflète leur centralité dans le réseau.

1.2.2.2 Analyse des modules actifs du réseau REVE-2 en fonction du temps

Les modules actifs ont été extraits à chaque temps en utilisant toutes les variables mesurées dans le plasma des patients de l’étude REVE-2 significativement modulées à un temps donné. Chaque module actif contient donc les variables REVE-2 modulées, leurs voisins directs et les nœuds appartenant aux chemins les plus courts entre 2 variables REVE-2 jusqu’à 3 interactions. Les modules actifs à chaque temps sont représentés sur la figure 35.

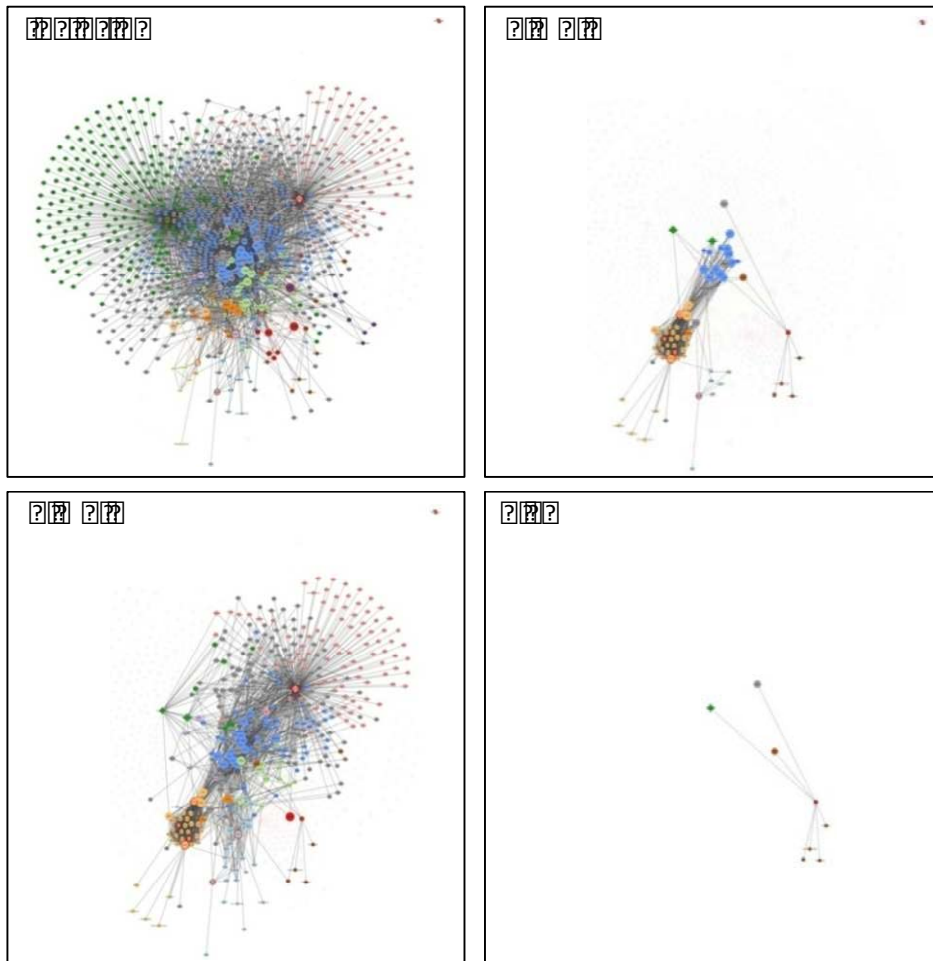


Figure 35 : Visualisation des modules actifs extraits à chaque temps

On observe que la majorité des changements d’expression des molécules du réseau a lieu à l’inclusion, correspondant à la phase post-IDM. En effet, 936 des 1310 nœuds du réseau REVE-2 sont actifs, ce qui représente 71% du réseau. De plus, les 34 *clusters* identifiés sont actifs à l’inclusion, en particulier les *clusters* associés à l’inflammation, au stress oxydant, à la lésion des myocytes et au remodelage de la matrice extracellulaire.

A un mois post-IDM, on constate une diminution importante du nombre de molécules actives dans le réseau REVE-2. En effet, seules 69 molécules, soit 5% des nœuds du réseau, sont actives. Ces molécules appartiennent à 9 *clusters*, dont les principaux sont associés à la fibre musculaire et au stress oxydant.

A 3 mois post-IDM, correspondant à la phase de développement du RVG, on observe une réactivation de certaines molécules du réseau avec 388 nœuds actifs représentant 30% du réseau. On constate également une augmentation du nombre de *clusters* actifs (30), dont plusieurs, tels que les clusters associés à la fibre musculaire et au remodelage de la matrice extracellulaire, sont impliqués dans le RVG. De façon intéressante, ces *clusters* également

identifiés à l'inclusion et à 1 mois post-IDM, sont plus fortement activés à 3 mois qu'aux autres temps. En effet, pour le *cluster 7* qui contient des protéines du myofilament comme les troponines, la myosine et la tropomyosine, 33 nœuds sont actifs à 1 mois et 3 mois post-IDM, contre seulement 4 à l'inclusion. De même, pour le *cluster 9* qui contient des molécules associées au remodelage de la matrice extracellulaire, comme les MMPs et les TIMPs, 28 nœuds sont actifs à 3 mois, contre 17 à l'inclusion et 7 à 1 mois post-IDM.

Enfin, à 1 an post-IDM, on assiste à une extinction de la presque totalité des molécules et *clusters* du réseau REVE-2. Seulement 3 *clusters* et 8 molécules sont toujours actifs, suggérant une inactivation des mécanismes impliqués dans le RVG post-IDM.

1.2.2.3 Analyse de la centralité d'intermédiarité des nœuds du réseau REVE-2

Pour mesurer l'importance des nœuds du réseau REVE-2, une analyse de la centralité d'intermédiarité a été réalisée. Une centralité élevée suggère un rôle central du nœud dans le réseau REVE-2 et les mécanismes pathophysiologiques impliqués dans le RVG, alors qu'une centralité faible reflète un rôle plus périphérique. De plus, il a été montré que les molécules à haute centralité peuvent être de potentiels biomarqueurs du RVG (Azuaje et al., 2012). La table 12 présente les 20 nœuds ayant les centralités les plus élevées dans le réseau REVE-2. Ces 20 nœuds appartiennent à 8 *clusters*, dont les principaux sont le *cluster 1* (*Sequence-specific DNA binding*) et *cluster 2* (*Intrinsic component of membrane*). Les nœuds les plus centraux du réseau sont des variables dosées dans le plasma des patients de l'étude REVE-2 (miR-21-5p, miR-222-3p et miR-423-5p).

Parmi ces 20 nœuds, on trouve 8 microARNs (miR-21-5p, miR-222-3p, miR-423-5p, miR-23a-3p, miR-335-5p, miR-26b-5p, miR-124-3p et miR-744-5p). Ceci suggère donc un rôle important des microARNs dans le développement du RVG. En effet, ces microARNs ont de nombreuses cibles qui peuvent être impliquées dans les mécanismes du RVG. De plus, les microARNs sont connus pour être de potentiels biomarqueurs intéressants dans les maladies cardiovasculaires.

Table 12 : Liste des 20 nœuds ayant les centralités les plus élevées dans le réseau REVE-2

Nœud	Centralité	Variables REVE-2 les plus proches	Cluster	Terme GO le plus significatif
hsa-miR-21-5p	0,3418	miR-21-5p	2	Intrinsic component of membrane
hsa-miR-222-3p	0,1596	miR-222-3p	5	RNA binding
hsa-mi-423-5p	0,0670	miR-423-5p	-	
EP300	0,0661	P1NP; ICTP, P3NP, peak CK, troponine; troponine positive	1	Sequence-specific DNA binding
hsa-miR-335-5p	0,0522	MMP2, P3NP, troponine; troponine positive	13	O-glycan processing
hsa-miR-26b-5p	0,0448	FasL, MMP8, ST2, TIMP1	2	Intrinsic component of membrane
MYC	0,0375	miR-21-5p, miR-423-5p	1	Sequence-specific DNA binding
CTCF	0,0309	P1NP; ICTP, P3NP, peak CK, troponine; troponine positive	1	Sequence-specific DNA binding
hsa-miR-23a-3p	0,0290	miR-23a-3p	-	
hsa-miR-124-3p	0,0254	P1NP; ICTP	2	Intrinsic component of membrane
SP1	0,0233	miR-133a, miR-21, P1NP; ICTP	1	Sequence-specific DNA binding
RAD21	0,0193	P1NP; ICTP, peak CK	1	Sequence-specific DNA binding
Calcium	0,0168	CRP, MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, P1NP; ICTP, troponine; troponine positive	16	G-protein coupled receptor signaling pathway
TAF1	0,0158	miR-21-5p, P1NP; ICTP, peak CK	1	Sequence-specific DNA binding
COL5A2	0,0144	miR-21-5p, P1NP; ICTP, peak CK	3	Endoplasmic reticulum lumen
E2F1	0,0130	miR-21-5p	12	
FOS	0,0130	miR-222-3p, MMP1, P1NP; ICTP, ST2	1	Sequence-specific DNA binding
hsa-miR-744-5p	0,0120	Galectin-3	5	RNA binding
ATP	0,0119	peak CK	10	ATP binding
CEBPB	0,0105	miR-423-5p, troponine; troponine positive	1	Sequence-specific DNA binding

- non assigné à un *cluster*

1.2.2.4 Identification de cibles potentiellement impliquées dans le RVG post-IDM

Dans le but d'identifier des cibles potentiellement impliquées dans le RVG post-IDM ou de nouveaux biomarqueurs, une analyse a été réalisée en prenant en compte à la fois les différents temps auxquels sont actifs les nœuds du réseau REVE-2 et leur centralité. Nous avons choisi d'analyser les 50 nœuds ayant les centralités les plus élevées. Les nœuds actifs uniquement à l'inclusion ont été exclus. En effet, on peut supposer qu'ils sont principalement liés à l'inflammation post-IDM et ne reflètent pas les mécanismes impliqués dans le RVG. Une revue bibliographique a également été réalisée pour sélectionner les cibles d'intérêt.

Nous avons ainsi sélectionné 6 cibles potentielles, dont 2 facteurs de transcription, EP300 et ESR1, et 4 microARNs, les miR-335-5p, miR-26b-5p, miR-375 et miR-17-5p (Table 13).

Table 13 : Liste des nœuds sélectionnés dans le réseau REVE-2

Rang	Nom	Type	Centralité	Temps	Cluster	Terme GO le plus significatif	Sécrétion ¹
5	EP300	Facteur de transcription	0,0661	Inclusion, 3 mois	cluster 1	sequence-specific DNA binding	Non décrit
6	miR-335-5p	miARN	0,0522	1 mois, 3 mois	cluster 13	O-glycan processing	oui
7	miR-26b-5p	miARN	0,0448	Inclusion, 1 mois, 3 mois	cluster 2	intrinsic component of membrane	oui
24	ESR1	Facteur de transcription	0,0096	Inclusion, 3 mois	cluster 22	steroid hormone receptor activity	oui
36	miR-375	miARN	0,0084	Inclusion, 1 mois, 3 mois, 1 an	cluster 2	intrinsic component of membrane	oui
43	miR-17-5p	miARN	0,0072	3 mois	cluster 5	RNA binding	oui

¹ La sécrétion a été déterminée par étude bibliographique

Ces nœuds appartiennent à 5 clusters différents : le *cluster 1* associé aux séquences spécifiques de liaison à l'ADN, le *cluster 2* associé aux composants intrinsèques de la membrane plasmique, le *cluster 5* impliqué dans la liaison des ARNs, le *cluster 13* associé à la maturation des O-glycanes et le *cluster 22* associé à l'activité des récepteurs aux hormones stéroïdes. Cinq de ces nœuds (miR-335-5p, miR-26b-5p, miR-375, miR-17-5p et ESR1) sont connus comme pouvant être sécrétés dans la circulation sanguine, ce qui en fait de potentiels biomarqueurs intéressants. A ce jour, EP300 n'a pas été décrit comme étant sécrété.

1.2.3 Analyse bibliographique des cibles identifiées dans le réseau REVE-2

1.2.3.1 EP300

EP300 (*EIA binding protein EP300*) est le facteur de transcription ayant la centralité la plus élevée dans le réseau REVE-2. EP300 est actif à l'inclusion, 1 mois et 3 mois et appartient au *cluster 1* (*Sequence-specific DNA binding*). La figure 36 présente les modules actifs centrés sur EP300, extraits aux 3 temps. EP300 est liée principalement à des nœuds appartenant au même *cluster*, et au *cluster 7* contenant les troponines.

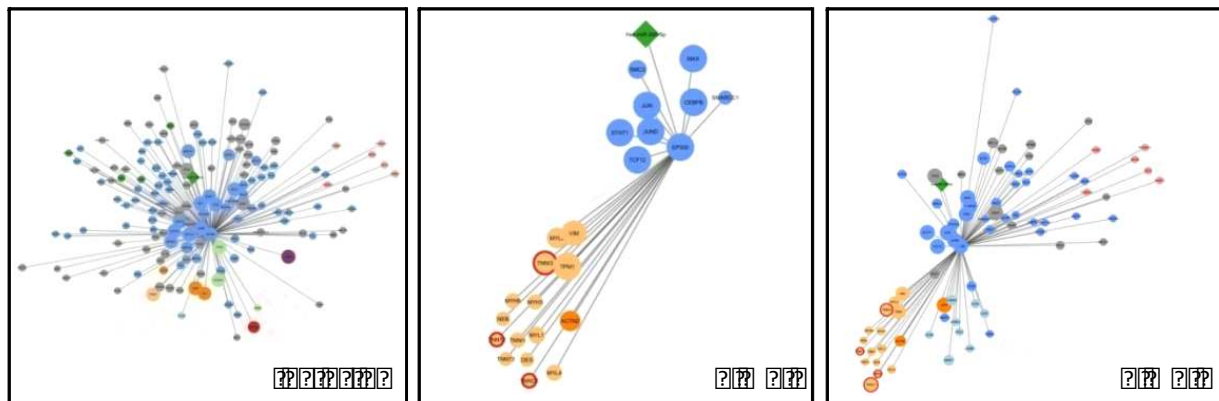


Figure 36 : Modules actifs centrés sur EP300, extraits à l’inclusion, 1 mois et 3 mois. Chaque module représente EP300 et ses voisins directs dans le réseau.

Il s’agit d’une histone acétyl-transférase (HAT), généralement associée à la *CREB-binding protein* (CBP) (Gusterson et al., 2003). Les histones sont les principaux régulateurs de l’expression des gènes en modulant la compaction de la chromatine. L’acétylation des histones par les HATs favorise l’expression des gènes par décompaction de la chromatine. Au contraire, la déacétylation des histones par les histone déacétylases (HDAC) conduit à une compaction de la chromatine et à une répression de la transcription des gènes. EP300 est une des HATs les plus étudiées dans les tissus musculaires et est connue pour être impliquée dans la croissance physiologique et pathologique des cardiomyocytes (Shikama et al., 2003; Backs and Olson, 2006). Cependant, EP300 est capable d’acétyler d’autres protéines que les histones et est impliquée dans l’hyperacétylation des protéines nucléaires au cours de l’hypertrophie cardiaque. EP300 est activée dans les cardiomyocytes traités à la phényléphrine et favorise l’activité de facteurs de transcription impliqués dans l’hypertrophie, tels que GATA-4, SRF (*Serum response factor*) et MEF-2 (*Myocyte enhancer factor-2*), par acétylation (Yanazume et al., 2003; Wei et al., 2008). De plus, la surexpression de EP300 dans le cœur de souris dans le conduit à une IC décompensée (Yanazume et al., 2003).

EP300 peut aussi être régulé par l’HDAC Sirtuine 1 (Sirt1). En effet, chez des souris déficientes pour la dystrophine traitées au resveratrol, un activateur de Sirt1, la fonction cardiaque était restaurée. Or, l’action du resveratrol passe, entre autres, par la déacétylation de EP300 par Sirt1. EP300 déacétylée est dégradée via le système ubiquitine-protéasome (Kuno et al., 2013). De plus, Sirt1 et EP300 pourraient être impliqués dans la régulation de l’activité de SOD2 par acétylation/déacétylation (Kuno et al., 2015).

1.2.3.2 ESR1

Un second facteur de transcription a été sélectionné dans le réseau REVE-2. Il s'agit de ESR1 qui code pour le récepteur aux œstrogènes (ER). Il est actif à l'inclusion et 3 mois et appartient au *cluster 22 (Steroid hormone receptor activity)*. La figure 37 présente les modules actifs centrés sur ESR1, extraits aux 2 temps. ESR1 est lié principalement à des nœuds appartenant au *cluster 1 (Sequence-specific DNA binding)*. De façon intéressante, ESR1 est également lié au miR-222-3p, modulé au cours du RVG et impliqué dans la régulation de l'expression de SOD2.

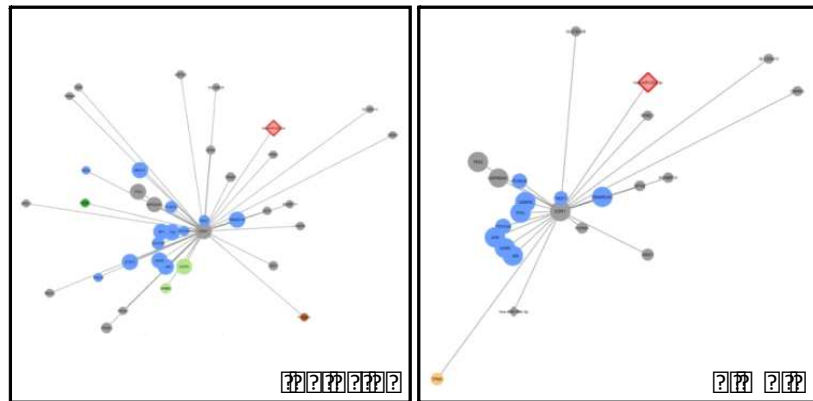


Figure 37 : Modules actifs centrés sur ESR1, extraits à l'inclusion et 3 mois. Chaque module représente ESR1 et ses voisins directs dans le réseau.

Il est maintenant bien connu qu'il existe des différences importantes entre les hommes et les femmes dans de nombreuses pathologies. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces différences entre sexes, à la fois sociaux et environnementaux, mais aussi génétiques et biologiques, tels que les œstrogènes, dont le 17 -œstradiol (E2), qui pourraient être impliqués dans la santé et la longévité des femmes, et particulièrement dans la cardioprotection (Puzianowska-Kuznicka, 2012; Dedkov et al., 2016). De plus, nous avons récemment montré que SOD2, ayant un rôle cardioprotecteur, était augmentée dans le plasma des femmes avec un RVG mais pas chez les hommes, alors que les microARNs impliqués dans sa régulation était augmentés uniquement chez les hommes avec un RVG (Dubois-Deruy et al., 2017), ce qui suggère un rôle potentiel des œstrogènes dans la régulation des mécanismes impliqués dans le développement du RVG.

Bien que E2 soit en grande majorité sécrété par les ovaires chez les femmes pré-ménopausées, il est également produit en faible quantité chez les hommes par d'autres

organes comme le tissu adipeux, les os et la prostate (Simpson, 2003). Les récepteurs aux œstrogènes appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires et ont pour principal rôle de réguler l'activité de gènes cibles. En présence d'E2, les ERs transloquent dans le noyau et se lient à des éléments de réponse aux œstrogènes (EREs) sur le promoteur de certains gènes cibles de E2 (Puzianowska-Kuznicka, 2012; Arnal et al., 2017). E2 a aussi des effets non génomiques, en se fixant sur des ERs situés à la membrane plasmique et en activant ainsi différentes voies telles que JAK/STAT, p38/MAPK et PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*)/Akt (Kumar et al., 2007). E2 est également impliqué dans la régulation de l'expression de certains gènes mitochondriaux (Chen et al., 2004; Stirone et al., 2005).

Les œstrogènes sont connus pour avoir des effets cardioprotecteurs chez les animaux et les hommes à travers l'activation des récepteurs aux œstrogènes. Dans un modèle d'IDM chez des souris femelles ovariectomisées et traitées à l'E2, les IDM étaient plus petits que ceux des animaux sans traitement à l'E2 (van Eickels et al., 2003). De plus, chez des souris males post-IDM traitées à l'E2, la fraction d'éjection était augmentée et les dimensions de VG réduites (Cavasin et al., 2003). ER est connu pour être exprimé dans les cardiomyocytes et les fibroblastes qui sont les principaux types cellulaires constituant le myocarde (Grohé et al., 1997; Pugach et al., 2016).

E2, en se liant à ER, est connu pour inhiber la synthèse de ROS par la mitochondrie et favoriser la transcription et l'activité des superoxydes dismutases, et en particulier SOD2. En effet, il a été montré que les souris femelles ont une expression de SOD2 plus élevée que les males dans le cœur et l'aorte (Liu et al., 2014). De plus, l'expression de SOD2 chez les souris femelles ayant subi une ovariectomie est similaire à celle des males. Cependant, quand elles sont traitées à l'E2, l'expression de SOD2 est restaurée au niveau des souris *wild type*.

Bien que les œstrogènes semblent avoir un effet cardioprotecteur chez les femmes pré-ménopausées, les thérapies de substitution des œstrogènes ont donné des résultats controversés chez l'homme. De ce fait, le rôle des œstrogènes et de leurs récepteurs doit encore être exploré afin de développer des traitements plus efficaces contre les maladies cardiovasculaires.

1.2.3.3 Les microARNs

1.2.3.3.1 miR-335-5p

Le miR-335-5p a été sélectionné dans le réseau REVE-2 comme étant potentiellement impliqué dans le RVG post-IDM. Il est actif à 1 mois et 3 mois et appartient au *cluster* 13 (*O-glycan processing*). La figure 38 présente les modules actifs centrés sur le miR-335-5p, extraits aux 2 temps. A l'inclusion et à 3 mois, le miR-335-5p est lié aux nœuds correspondant aux troponines.

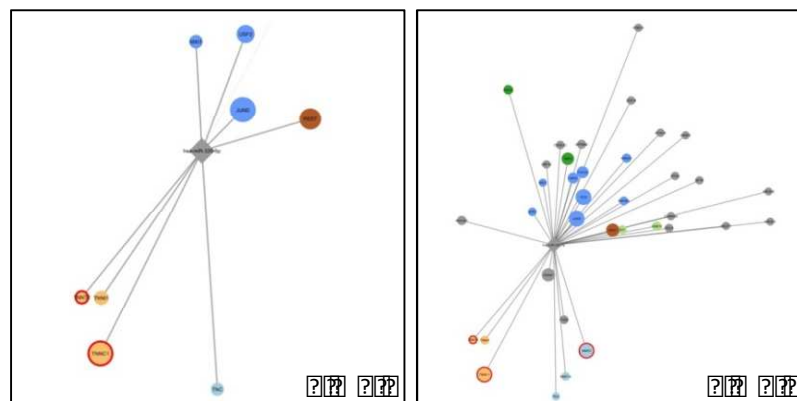


Figure 38 : Modules actifs centrés sur miR-335-5p, extraits à 1 mois et 3 mois. Chaque module représente miR-335-5p et ses voisins directs dans le réseau.

Le miR-335-5p n'a jamais été décrit dans le cœur ou les maladies cardiovasculaires. Il est connu comme étant impliqué dans d'autres pathologies comme les cancers, l'ostéoporose et la dégénérescence maculaire liée à l'âge. En effet, le miR-335 est décrit comme un microARN suppresseur de tumeur dans plusieurs cancers. Il a été montré que le miR-335 est diminué dans les tissus et cultures cellulaires issues d'ostéosarcomes, et serait impliqué dans l'inhibition de la migration et l'invasion cellulaire en ciblant le gène ROCK1 (*Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase 1*) (Wang et al., 2013). De plus, il a été décrit comme potentiel biomarqueur d'ostéosarcome chez l'enfant. En effet, le miR-335-5p était augmenté dans le plasma de souris présentant un ostéosarcome, et dans le plasma d'enfant avec ostéosarcome, en comparaison à des enfants sains (Allen-Rhoades et al., 2015). Le miR-335-5p serait également impliqué dans la différenciation ostéogénique en inhibant DKK1 (*Dickkopf 1*), un inhibiteur de la voie Wnt/ -caténine, nécessaire à l'homéostasie squelettique (Zhang et al., 2011). De façon intéressante, la voie Wnt/ -caténine est connue comme étant impliquée dans l'hypertrophie et l'apoptose des cardiomyocytes, ainsi que dans la fibrose cardiaque (Malekar et al., 2010; Pahnke et al., 2016; Tao et al., 2016). Le miR-335-

5p pourrait donc être impliqué dans ces mécanismes. Cependant, son rôle dans les maladies cardiovasculaires doit encore être étudié.

Récemment, il a été montré un potentiel rôle du miR-335-5p en tant que biomarqueur de l'ostéoporose. En effet, le miR-335-5p est augmenté dans le plasma de patients présentant des fractures, comparés à des patients contrôles (Kocijan et al., 2016). Le miR-335-5p est également impliqué dans la différenciation des myoblastes en myocytes squelettiques (Meyer et al., 2015), et dans plusieurs types de dystrophies (Greco et al., 2009; Perbellini et al., 2011). Enfin, le miR-335-5p est diminué dans le plasma des patients atteints de dégénérescence maculaire liée à l'âge, alors que les miR-17-5p et miR-26b-5p sont augmentés dans le plasma de ces patients (Ertekin et al., 2014).

1.2.3.3.2 miR-26b-5p

Le miR-26b-5p est actif à l'inclusion, 1 mois et 3 mois (Figure 39) et appartient au *cluster 2 (Intrinsic component of membrane)*. A l'inclusion, le miR-26b-5p est majoritairement lié à des nœuds du *cluster 2 (Intrinsic component of membrane)*. A 3 mois, il est principalement lié à des nœuds du *cluster 5 (RNA binding)*. Au 3 temps, le miR-26b-5p est lié à la MMP8 qui appartient au *cluster 9 (Extracellular matrix disassembly)*.

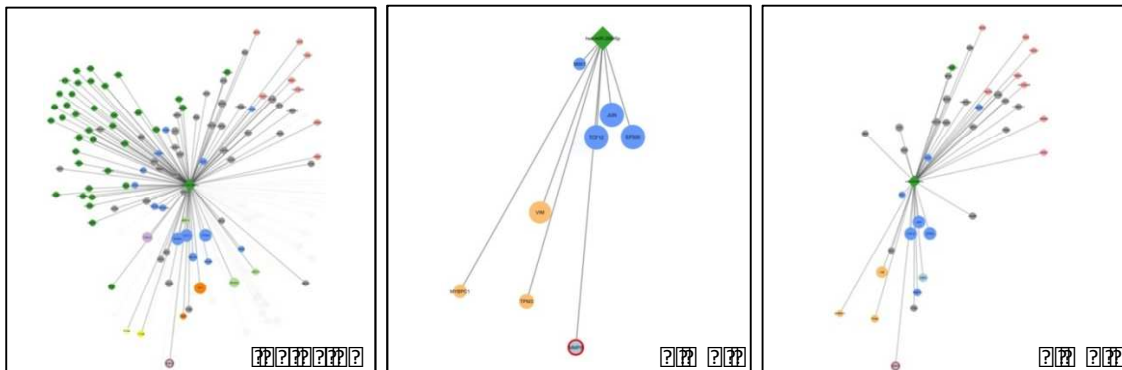


Figure 39 : Modules actifs centrés sur miR-26b-5p, extraits à l'inclusion, 1 mois et 3 mois. Chaque module représente miR-26b-5p et ses voisins directs dans le réseau.

Les membres de la famille du miR-26 (miR-26a et miR-26b) sont bien connus comme étant impliqués dans la fonction cardiaque et les maladies cardiovasculaires, particulièrement dans l'angiogénèse et la fibrose (Icli et al., 2014). Il a été décrit comme étant un régulateur anti-hypertrophique dans les pathologies cardiaques (Da Costa Martins and De Windt, 2012). Une autre étude a montré que 18 familles de microARNs représentent 90% des microARNs

exprimés dans le cœur et que la famille du miR-26 est l'une des plus abondantes. Ces données suggèrent que la majorité des processus biologiques du cœur sont régulés par un petit nombre de famille de microARNs (Rao et al., 2009; Kumarswamy and Thum, 2013). Il a également été montré que l'expression du miR-26b diminue dans les cellules mononucléaires du sang périphérique de patients hypertendus comparés à des patients contrôles. De plus, l'expression du miR-26b est significativement corrélée à la masse du VG, ce qui suggère son implication dans l'hypertrophie du VG (Kontaraki et al., 2015). Luo et al. ont montré que les membres de la famille du miR-26 sont diminués dans un modèle de fibrillation atriale chez les chiens et chez des patients présentant une fibrillation atriale. En utilisant des méthodes computationnelles, ils ont identifié la protéine KCNJ2 (*Inward rectifier potassium channel 2*), un canal potassique, comme cible potentielle de la famille du miR-26 (Luo et al., 2013). Le miR-26b serait aussi impliqué dans l'hypertrophie physiologique du VG. En effet, il a été montré que des souris soumises à un entraînement physique développent une hypertrophie du VG. Une diminution de l'expression du miR-26b a été observée chez les souris après 7 jours d'entraînement physique en comparaison à des animaux sédentaires (Martinelli et al., 2014). Han et al. ont montré que les taux protéiques de GATA-4 sont augmentés pendant l'hypertrophie cardiaque dans un modèle de rats ayant subi une constriction de l'aorte transverse (TAC). De façon intéressante, l'expression du miR-26b est inversement corrélée aux taux de GATA-4. De plus, des souris transgéniques surexprimant le miR-26b et soumises à une TAC ne développent pas d'hypertrophie cardiaque (Han et al., 2012).

En 2016, un profil des microARNs a été réalisé dans le plasma de patients présentant une IC aigüe, une IC chronique ou des contrôles sains, sélectionnés dans différentes cohortes. Les auteurs ont identifié 15 microARNs circulants, incluant le miR-26b-5p, associés à l'IC et diminués chez les patients présentant une IC aigüe ou chronique comparés aux contrôles sains (Ovchinnikova et al., 2016). Une étude chez de patients atteints d'une IC avancée nécessitant une thérapie de resynchronisation cardiaque (CRT) montre que l'expression du miR-26b-5p est significativement diminuée à baseline dans le plasma des patients IC comparés à des contrôles sains. Après un an de thérapie, l'expression du miR-26b-5p est augmentée, suggérant son implication dans la récupération cardiaque (Marfella et al., 2013). Jacob et al. ont réalisé un profil des microARNs dans le plasma de patients suite à un IDM avec élévation du fragment ST (STEMI) et suivi pendant 1 an. Les patients ayant subi un événement cardiovasculaire majeur (décès, IDM récurrent...) présentaient une augmentation significative des taux plasmatiques du miR-26b-5p (Jacob et al., 2018).

1.2.3.3.3 miR-375

Le miR-375 est actif à tous les temps (inclusion, 1 mois, 3 mois et 1 an) dans le réseau REVE-2, et appartient au *cluster 2 (Intrinsic component of membrane)*. La figure 40 présente les modules actifs centrés sur le miR-375 aux 4 temps. A l'inclusion, il est lié à des molécules appartenant au *cluster 2 (Intrinsic component of membrane)*. A un mois, il n'est lié qu'à 3 nœuds, dont la troponine I et le BNP. A 3 mois, il est aussi lié à des molécules appartenant au *cluster 5 (RNA binding)*. Enfin, à un an, le miR-375 n'est plus lié qu'au BNP.

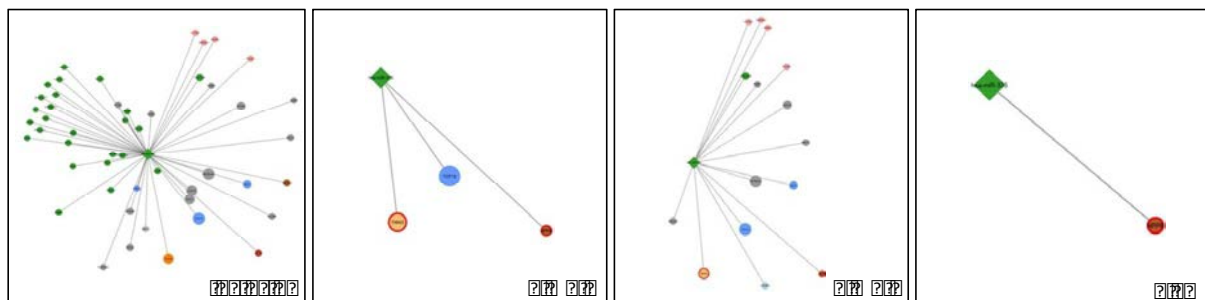


Figure 40 : Modules actifs centrés sur miR-375, extraits à l'inclusion, 1 mois, 3 mois et 1 an. Chaque module représente miR-375 et ses voisins directs dans le réseau.

Le miR-375 est exprimé dans le cœur, mais son rôle dans les maladies cardiovasculaires reste mal connu. Cao et al. ont montré que le miR-375 est fortement exprimé dans le cœur en développement, mais en plus faible quantité dans le cœur adulte (Cao et al., 2012). Une autre étude a montré que le miR-375 était surexprimé dans le VG après un IDM. Il serait un inhibiteur de la voie PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*)-Akt et inhibe la survie des cellules progénitrices issues de la moelle osseuse, qui sont nécessaires à la régénération du myocarde après un IDM (Garikipati et al., 2015). De plus, le miR-375 pourrait être un potentiel biomarqueur pour la prédiction prénatale de malformations cardiaques congénitales. En effet, le miR-375 était significativement augmenté dans le plasma de femmes enceintes avec des malformations cardiaques fœtales congénitales (Zhu et al., 2013). Le miR-375 aurait également un rôle dans les AVC. En effet, il est augmenté dans un modèle de rats sujets à une occlusion de l'artère cérébrale. Il a également été montré qu'un traitement au 17- β -œstradiol augmente l'expression du miR-375, suggérant des différences dans l'expression de ce microARN et de ses cibles en fonction du sexe (Herzog et al., 2017). Cependant, le rôle du miR-375 dans les maladies cardiovasculaires doit être approfondi.

Le miR-375 est aussi impliqué dans d'autres pathologies, comme les cancers (Yan et al., 2017a; Yan et al., 2017b). Le miR-375 est également connu pour son rôle dans le développement du diabète. En effet, il s'agit du microARN le plus fortement exprimé dans les cellules pancréatiques, suggérant un rôle important dans le diabète de type 2 (Eliasson, 2017; Piran et al., 2017; van de Bunt et al., 2013). Poy et al. ont montré que des souris *knock out* (KO) pour le miR-375 présentent une hyperglycémie, alors que des souris obèses ont une augmentation de l'expression du miR-375, suggérant que le miR-375 est essentiel pour l'homéostasie du glucose (Poy et al., 2009). De plus, le miR-375 serait un biomarqueur du diabète et des lésions pancréatiques (Calvano et al., 2016).

1.2.3.3.4 miR-17-5p

Le miR-17-5p est, quant à lui, actif uniquement à 3 mois et appartient au *cluster 5* (*RNA binding*). Il est principalement lié à des nœuds appartenant au même *cluster*, mais également à la MMP-2, qui appartient au *cluster 9* (*Extracellular matrix desassembly*) (Figure 41).

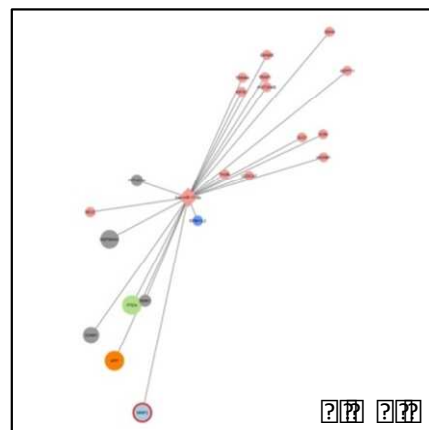


Figure 41 : Module actif centré sur miR-17-5p, extrait à 3 mois. Le module représente miR-17-5p et ses voisins directs dans le réseau.

Le miR-17-5p appartient à la famille du miR-17-92, qui contient également les miR-18a, miR-19a/b, miR-20a et miR-92a. La famille du miR-17-92 est augmentée dans un grand nombre de cancers, incluant les lymphomes, cancers du poumon, du colon et du sein, via la régulation du suppresseur de tumeur PTEN (*Phosphatase and tenson homolog*) (Lu et al., 2007; Olive et al., 2009; Takakura et al., 2008; Tsuchida et al., 2011). Cette famille, et particulièrement le miR-17-5p est connue comme ayant un rôle crucial dans le système

cardiovasculaire (Gu et al., 2017). En effet, les membres de la famille du miR-17-92 sont tous exprimés dans le cœur (Boggs et al., 2007; Zhou et al., 2013). Ils sont particulièrement impliqués dans la prolifération des cardiomyocytes et leur différenciation dans les cœurs embryonnaires et adultes. Chez des souris KO pour les microARNs de la famille du miR-17-92, la délétion conduit à une létalité embryonnaire partielle. Chez les souris KO pour le miR-17-92 post-natales, le cœur était plus petit que chez les souris contrôles, et la prolifération des cardiomyocytes diminuée. Chez les souris adultes KO, une hypertrophie des cardiomyocytes et une diminution de la fonction cardiaque étaient observées. Inversement, une surexpression du *cluster* du miR-17-92 conduit à une augmentation de la prolifération des cardiomyocytes et une amélioration de la fonction cardiaque, après un IDM induit par occlusion de l'artère coronaire (Chen et al., 2013). Ces différences dans la prolifération des cardiomyocytes seraient induites par l'inhibition de PTEN par les microARNs du *cluster* du miR-17-92.

Le miR-17-5p serait également impliqué dans l'apoptose. Mais son rôle reste controversé. Certaines études soutiennent l'idée d'un rôle anti-apoptotique du miR-17-5p. En effet, le miR-17 a été décrit comme inhibant l'apoptose dans les tumeurs et cancers comme les lymphomes, en ciblant PHLPP2 (*PH domain leucine-rich protein phosphatase 2*) (Rao et al., 2012) et Bim (*Bcl2 like protein 11*) (Molitoris et al., 2011), et de ce fait induisant les voies PI3K/Akt et MAPK (Zhou et al., 2013). En 2009, Yan et al. ont montré que le *cluster* 17-92 était réprimé par la voie p53, conduisant à une augmentation de l'apoptose dans des conditions d'hypoxie (Yan et al., 2009). Cependant, d'autres études ont décrit un rôle pro-apoptotique du miR-17-5p. En effet, l'expression du miR-17-5p est augmentée dans le myocarde de souris après ischémie/reperfusion, alors que STAT3, un important régulateur anti-apoptotique dans des conditions de stress oxydant, est diminué. Ces modulations sont associées à une augmentation de l'apoptose des cardiomyocytes. Des tests luciférase avec transfection d'un agomiR-17-5p ou d'un antagomiR-17-5p ont montré que le miR-17-5p est responsable de la diminution de STAT3 dans ce modèle (Du et al., 2014).

La sécrétion du miR-17-5p a été décrite dans plusieurs études. Fang et al. ont montré que le miR-17-5p est augmenté dans le plasma de patients présentant une cardiomyopathie hypertrophique et une fibrose myocardique diffuse comparés à des contrôles sains (Fang et al., 2015). De plus, un profil des microARNs a montré que le miR-17-5p est enrichi dans des exosomes purifiés du fluide péricardique de patients IC (Kuosmanen et al., 2015).

1.2.1 Validation expérimentale des cibles identifiées dans le réseau REVE-2 dans un modèle d'IC post-IDM chez le rat

1.2.1.1 Quantification de ER

L'ARNm de ER a été quantifié dans le VG d'un modèle de rats IC post-IDM à 7 jours et 2 mois post-IDM par RT-q-PCR.

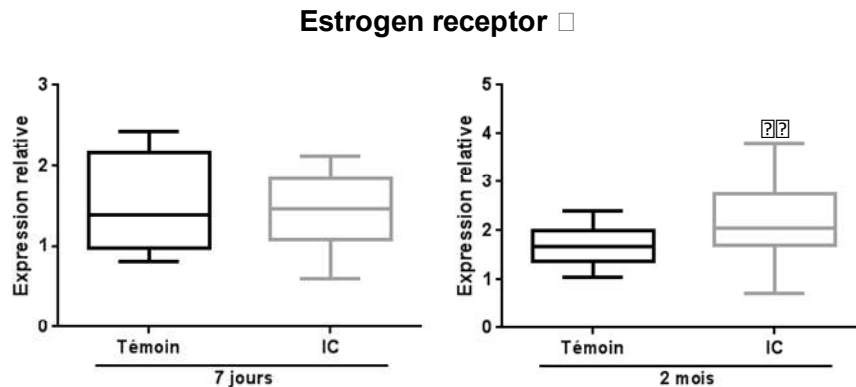


Figure 42 : Quantification de l'ARNm de ER dans le VG des rats IC et témoins à 7 jours et 2 mois post-IDM. Les rats témoins sont représentés en noir (n=8 à 7 jours et 2 mois) et les rats IC en gris (n=8 à 7 jours et 2 mois). Les données sont exprimées en expression relative (ER /HPRT) et représentées en boîtes à moustaches, montrant la médiane et les minimum et maximum. La significativité statistique est déterminée par le test Mann-Whitney-Wilcoxon. ** $P < 0,01$

Comme le montre la figure 42, l'expression de ER n'est pas modulée à 7 jours post-IDM dans le VG des rats IC comparés aux témoins. On observe une augmentation significative ($P=0,01$) de l'ARNm de ER dans le VG des rats IC comparés aux témoins à 2 mois post-IDM.

A ce jour, nous n'avons pas pu quantifier la quantité protéique de ER dans le VG des rats par Western Blot ou Immuno-fluorescence, la quantité de ER étant trop faible. En effet, notre modèle de rats IC ne contient que des animaux mâles qui n'expriment donc ER qu'à des niveaux très faibles.

Ces résultats suggèrent un rôle potentiel des œstrogènes dans la régulation des mécanismes impliqués dans le RVG.

1.2.1.2 Quantification des microARNs

Les microARNs sélectionnés dans le réseau REVE-2 ont également été quantifiés dans le VG des rats IC et témoins à 7 jours et 2 mois post-IDM, par RT-q-PCR.

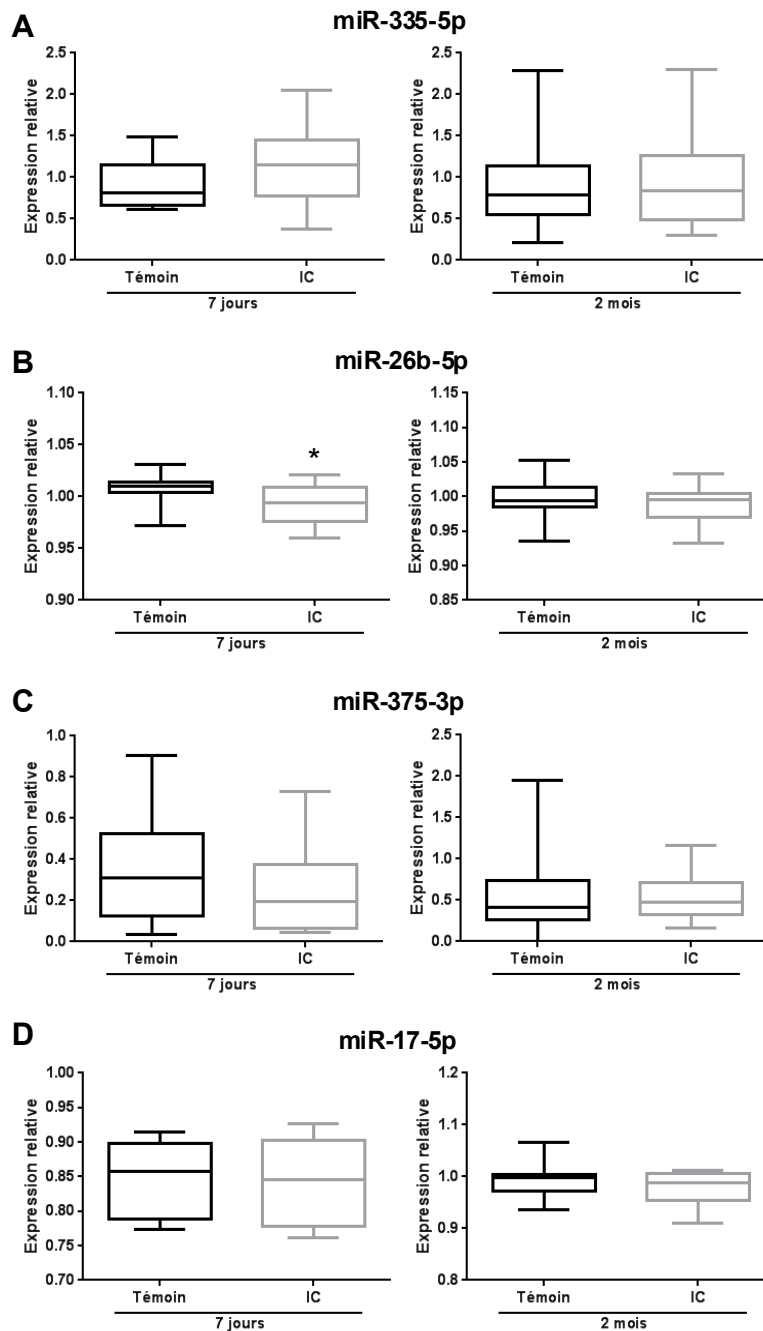


Figure 43 : Quantification par RT Q-PCR des miR-335-5p (A), miR-26b-5p (B), miR-375-3p (C) et miR-17-5p (D) dans le VG des rats témoins (noir) et IC (gris) à 7 jours (n=8 pour les témoins et les IC) et 2 mois post-IDM (n=16 pour les témoins et les IC). Les données sont exprimées en expression relative (miR/miR-423-3p) et représentées en boîtes à moustaches, montrant la médiane et les minimums et maximum. La significativité statistique est déterminée par le test Mann-Witney-Wilcoxon. * $P < 0,05$

Comme le montre la figure 43, on constate une tendance à l'augmentation du miR-335-5p (A) chez les rats IC à 7 jours post-IDM comparés aux témoins ($P=0,102$), mais aucune modulation à 2 mois ($P=0,863$). Le miR-26b-5p est significativement augmenté dans le VG

des rats IC à 7 jours post-IDM comparés aux témoins ($P=0,044$), mais pas à 2 mois ($P=0,378$) (B). Enfin, aucune modulation n'a été observée pour les miR-375 (C) et miR-17-5p (D), ni à 7 jours ($P=0,446$ et $P=0,934$, respectivement), ni à 2 mois, ($P=0,743$ et $P=0,203$, respectivement).

1.2.2 Comparaison de 2 approches de biologie des systèmes pour l'identification de microARNs comme potentiels biomarqueurs du RVG par biologie des systèmes

Ces résultats ont fait l'objet d'une opublication en **Annexe II** : Dubois-Deruy et al., 2017 et en **Annexe III** : Charrier*, Cuvelliez* et al., 2019

Au cours de ce projet, nous avons comparé 2 approches de biologie des systèmes pour l'identification d'une signature en microARNs permettant de détecter le RVG post-IDM.

1.2.2.1 Analyse d'un réseau protéine-microARNs dérivé d'un modèle de rats post-IDM

L'analyse protéomique du VG d'un modèle de rats post-IDM a permis l'identification de 45 protéines différentiellement exprimées et/ou phosphorylées entre les rats IC et les rats témoins à 2 mois post-IDM (Cieniewski-Bernard et al., 2008; Dubois et al., 2011). En utilisant la base de données *Inginuity Pathway Analysis (IPA)*, un réseau d'interactions protéine-microARN a été construit et a permis l'indentification de 13 microARNs associés à 8 des 45 protéines, ayant un rôle potentiel dans les mécanismes du RVG post-IDM (Dubois-Deruy et al., 2017). Neuf de ces microARNs ont été décrits comme biomarqueurs de l'IC : les miR-21-3p, miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-29b-3p, miR-122, miR-133a, miR-145-5p, miR-222-3p et miR-320a (Kuosmanen et al., 2015; Cortez-Dias et al., 2016; Liu et al., 2016; Marques et al., 2016; Dubois-Deruy et al., 2017; Zhang et al., 2017; van Boven et al., 2018).

Pour sélectionner les microARNs associés au RVG, les 13 microARNs ont été quantifiés *in vivo* dans le modèle de rats IC à 7 jours et 2 mois post-IDM. Six microARNs étaient surexprimés dans le VG des rats IC à 7 jours comparés aux témoins (miR-23a-3p, miR-222-3p et miR-320a) et/ou 2 mois post-IDM (miR-21-3p, miR-21-5p, miR-222-3p et miR-377-5p) (Dubois-Deruy et al., 2017). Nous avons exclus 7 microARNs qui n'ont pas été détectés (miR-122 et miR-210) ou qui ne sont pas modulés entre les rats témoins et IC (miR-29b-3p, miR-133a, miR-145-5p, miR-338-3p et miR-483-3p) (Figure 43).

Dans le plasma des rats post-IDM, 3 microARNs sont diminués à 7 jours post-IDM chez les rats IC comparés aux témoins et augmentés à 2 mois : les miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p (Dubois-Deruy et al., 2017). Les 3 autres microARNs qui n'étaient pas détectés (miR-21-3p et miR-377-5p) ou mesurables (miR-320a) ont été exclus (Figure 43).

Dans le plasma des patients post-IDM de l'étude REVE-2, les 3 microARNs sélectionnés (miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p) sont significativement diminués à l'inclusion et augmentés à 3 mois chez les patients présentant un RVG comparés aux patients sans RVG, et particulièrement chez les hommes, ce qui valide leur rôle potentiel de biomarqueurs du RVG post-IDM (Dubois-Deruy et al., 2017) (Figure 44).

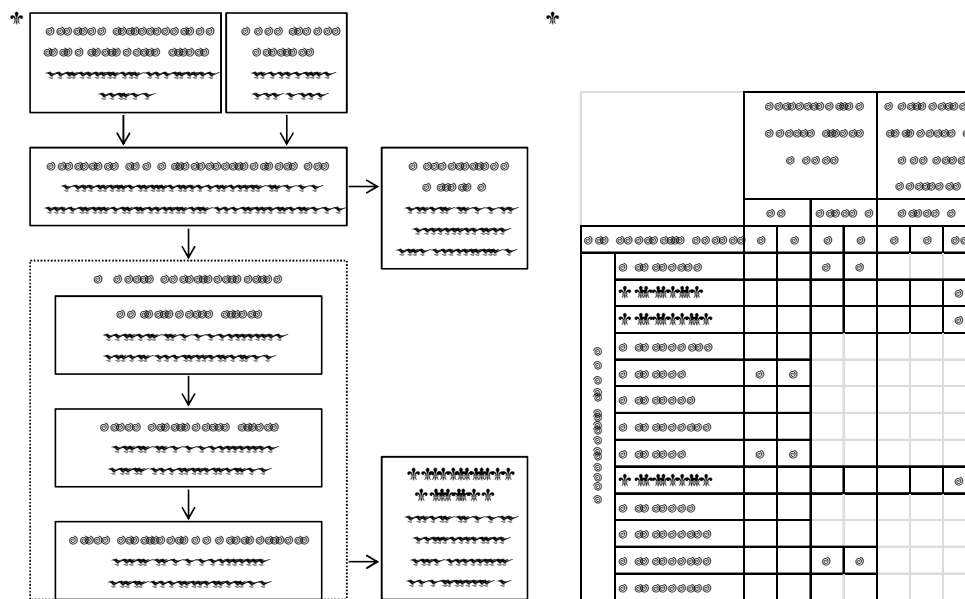


Figure 44 : Identification des miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p pour détecter le RVG post-IDM et pour prédire l'IC. (A) Design de l'étude et (B) validation expérimentale des 13 microARNs sélectionnés par analyse IPA des données protéomiques obtenues dans le VG des rats post-IDM. La quantification des microARNs candidats dans le VG et le plasma des rats à 7 jours (timepoint 0) et 2 mois (timepoint 2), et dans le plasma des patients de l'étude REVE-2 à l'inclusion (timepoint 0), 3 mois (timepoint 3) et un an (timepoint 12) a été publiée précédemment (Dubois-Deruy et al., 2017). * et X indiquent respectivement une augmentation et une diminution significative ($P < 0,05$) entre les animaux témoins et IC, ou les patients avec et sans RVG. ∅ indique une absence de modulation. X indique une absence de détection. Les microARNs sélectionnés après validation sont indiqués en gras.

1.2.2.2 Analyse des microARNs sélectionnés dans le réseau REVE-2

La seconde approche repose sur l'analyse du réseau REVE-2, qui a permis l'identification de 24 microARNs potentiellement impliqués dans le RVG post-IDM. Quatorze de ces 24 microARNs ont déjà été décrits comme étant associés à l'IC : les miR-21-

5p, miR-222-3p, miR-423-5p, miR-26b-5p, miR-23a-3p, miR-744-5p, miR-133a-3p, miR-17-5p, miR-29c-3p, miR-145-5p, miR-29b-3p, let-7g-5p, miR-143-3p et miR-451a (Fang et al., 2015; Kuosmanen et al., 2015; Liu et al., 2016; Marques et al., 2016; Dubois-Deruy et al., 2017; Jakob et al., 2017; Jiao et al., 2018; Wang et al., 2018).

Les microARNs ont été sélectionnés *in silico* selon 2 critères. Les 15 microARNs actifs uniquement à l'inclusion ont été exclus pour éviter la sélection de microARNs associés aux mécanismes de l'inflammation et non spécifiques du RVG post-IDM. Dans un second temps, les 13 microARNs n'appartenant pas aux 50 molécules ayant les centralités les plus élevées dans le réseau REVE-2 ont également été exclus, dans le but d'éviter la sélection de microARNs ayant une faible importance dans le RVG post-IDM. En combinant ces 2 critères, seuls 6 microARNs sont sélectionnés : les miR-21-5p, miR-222-3p, miR-335-5p, miR-26b-5p, miR-375 et miR-17-5p. De façon intéressante, les 6 microARNs sélectionnés sont actifs au moins à 3 mois post-IDM, où seuls les mécanismes spécifiques du RVG semblent être actifs (Pinet et al., 2017) (Figure 45).

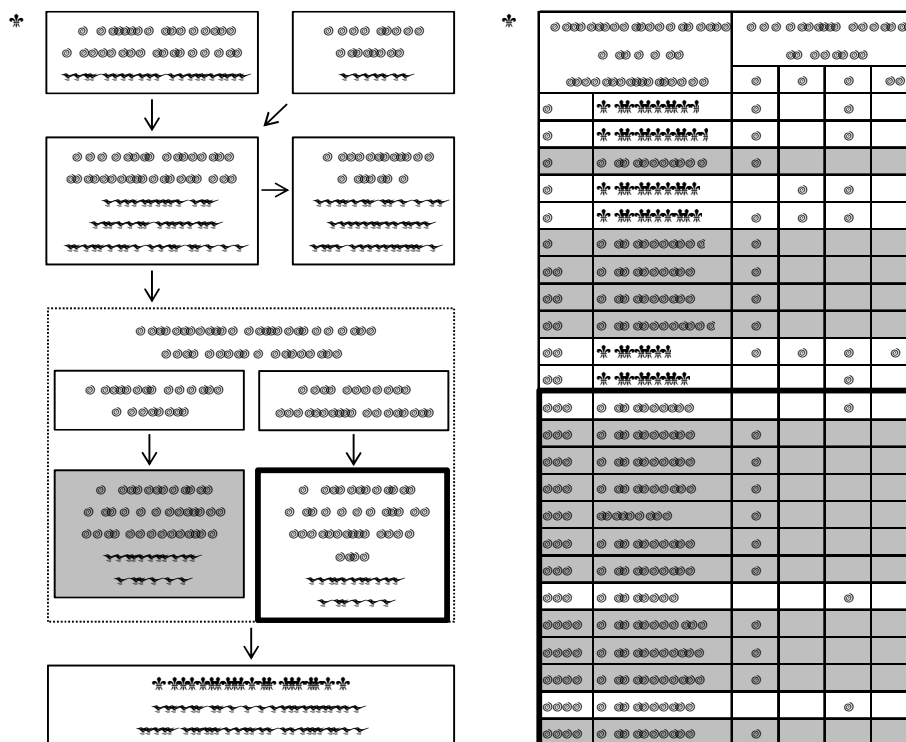


Figure 45 : Identification des miR-21-5p, miR-222-3p, miR-335-5p, miR-26b-5p, miR-375 et miR-17-5p pour prédire le RVG post-IDM et l'IC. (A) Processus de sélection et (B) priorisation des 24 microARNs prédits par l'analyse du réseau REVE-2. * indique que le microARN est actif au temps correspondant : inclusion (0), 1 mois (1), 3 mois (3) et un an (12). Les microARNs actifs uniquement à l'inclusion (gris) et avec un rang de centralité supérieur à 50 (encadrés en gras) ont été exclus.* indique les variables REVE-2. Les microARNs sélectionnés sont indiqués en gras.

1.2.2.3 Analyse Gene Ontology des 7 microARNs sélectionnés

Une analyse des 7 microARNs, sélectionnés par les 2 approches, a été réalisée grâce aux applications ClueGo (version 2.5.2) (Bindea et al., 2009) et CluePedia (version 1.5.2) (Bindea et al., 2013) de Cytoscape (version 3.4.0). Seules les cibles des microARNs validées dans la base de données miRecords ont été sélectionnées. Une analyse d'enrichissement en termes *Gene Ontology* a été réalisée pour toutes les cibles des microARNs identifiées, grâce à ClueGO.

Au total, 31 cibles ont été prédites et sont associées à 5 des 7 microARNs (miR-21-5p, miR-222-3p, miR-23a-3p, miR-375 et miR-17-5p). Les 2 microARNs, les miR-335-5p et miR-26b-5p, restant n'ont pas de cibles validées dans miRecords. On remarque que les cibles identifiées sont impliquées dans des voies associées au développement du RVG, comme la prolifération des fibroblastes, la régulation du métabolisme des ROS et les voies de signalisation intrinsèques de l'apoptose. Elles sont aussi associées au développement embryonnaire du cœur. Ces résultats suggèrent une implication de ces 7 microARNs dans le développement cardiaque et dans les mécanismes sous-jacents au RVG post-IDM (Figure 46).

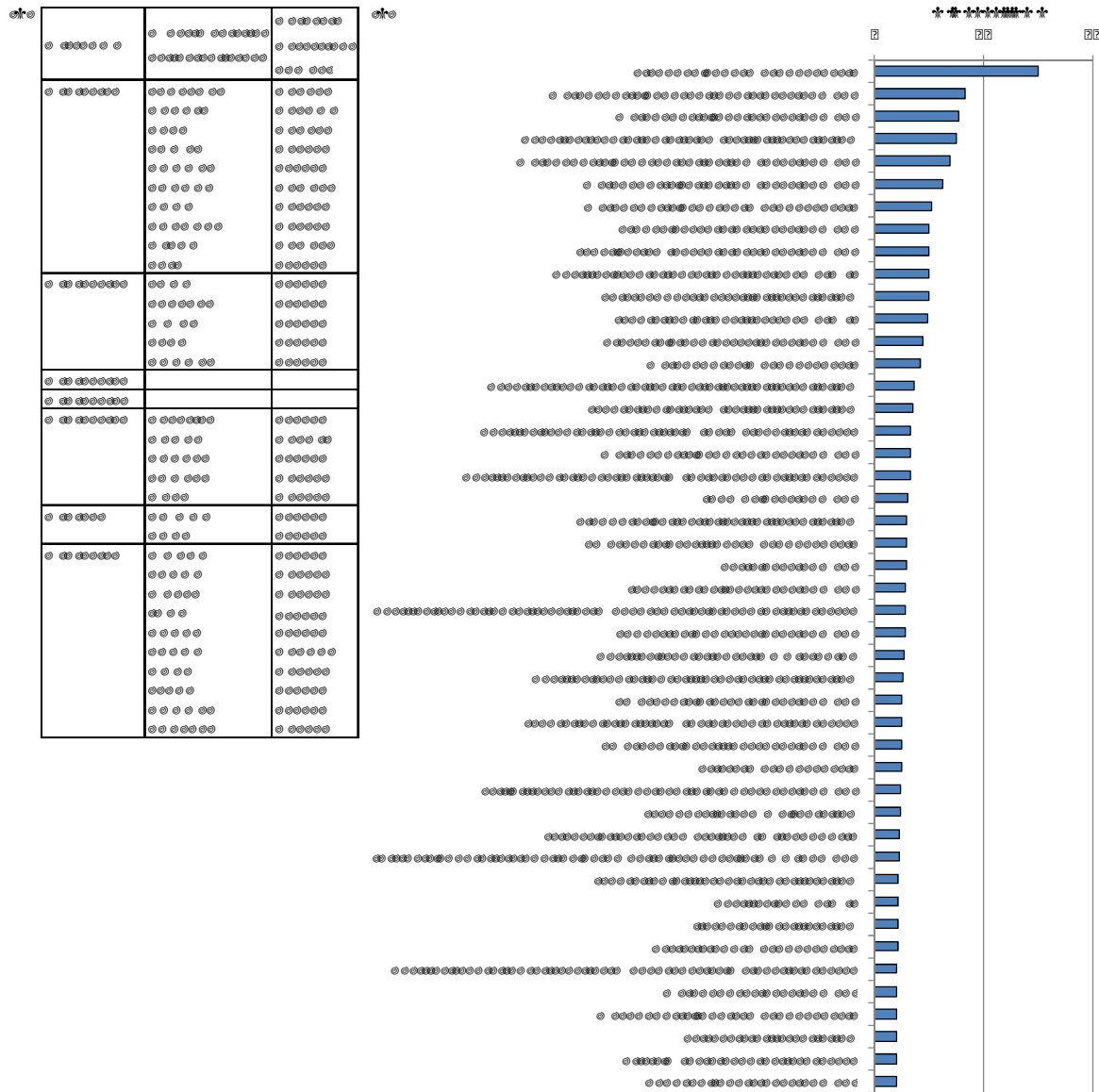


Figure 46 : Analyse d'enrichissement fonctionnel des cibles des 7 microARNs. (A) Les cibles des microARNs ont été prédites par la base de données miRecords. Aucune cible n'a été décrite pour les miR-335-5p et miR-26b-5p. (B) Les processus biologiques des cibles des microARNs ont été prédites grâce aux applications ClueGo et CluePedia de Cytoscape ($P < 0,05$).

1.3 Conclusion-Discussion

Le but de cette étude était d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes du RVG et d'identifier de potentiels biomarqueurs précoces du RVG post-IDM.

L'étude REVE-2, ayant inclus des patients post-IDM hospitalisés dans plusieurs centres du nord de la France, a été utilisée pour étudier les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le RVG post-IDM. L'intérêt de cette étude repose sur le fait que les patients ont été suivis à 4 temps (inclusion, 1 mois, 3 mois et 1 an) dans l'année suivant l'IDM, ce qui permet l'étude des mécanismes du RVG au cours du temps.

A partir des variables moléculaires dosées dans le plasma des patients de l'étude REVE-2 et de bases de données publiques, nous avons construit un réseau d'interactions moléculaires en collaboration avec l'entreprise EdgeLeap. L'analyse des modules actifs, extraits du réseau à partir des variables modulées à chaque temps entre les patients présentant un RVG et les patients sans RVG, a montré que la majorité des changements dans l'expression des molécules du réseau a lieu à l'inclusion et à 3 mois, correspondant respectivement à la phase post-IDM et à la phase de développement du RVG. Les mécanismes impliqués à l'inclusion sont principalement associés à l'inflammation, alors qu'à 3 mois, les molécules actives sont impliquées dans des mécanismes associés au RVG, tels que le remodelage de la matrice extracellulaire et la fibre musculaire.

Une analyse de la centralité d'intermédiarité a également été réalisée afin de déterminer l'importance de chaque molécule dans le réseau REVE-2 et donc dans les mécanismes physiopathologiques du RVG post-IDM (Pinet et al., 2017). Grâce à cette analyse et une étude bibliographique, nous avons sélectionné 6 molécules du réseau potentiellement impliquées dans le RVG post-IDM : 2 facteurs de transcription (EP300 et ESR1) et 4 microARNs (miR-335-5p, miR-26b-5p, miR-375 et miR-17-5p).

Nous avons observé une augmentation significative de l'ARNm de ESR1 dans le VG de rats IC comparés aux témoins à 2 mois post-IDM. Cependant, il serait nécessaire d'étudier les mécanismes d'action de ER dans le même modèle expérimental mais chez des femelles. L'analyse des résultats obtenus pour SOD2 et les microARNs régulant son expression dans le plasma des patients de l'étude REVE-2 a montré que l'expression de SOD2 était augmentée chez les femmes présentant un RVG comparées aux femmes sans RVG mais pas chez les hommes. Au contraire, les miR-222-3p, miR-21-5p et miR-23a-3p sont significativement

augmentés dans le plasma des hommes présentant un RVG comparés aux hommes sans RVG, mais pas chez les femmes (Dubois-Deruy et al., 2017).

La quantification des microARNs sélectionnés dans le réseau REVE-2 dans le VG des rats a montré une augmentation du miR-26b-5p chez les rats IC à 7 jours post-IDM comparés aux témoins et une tendance à l'augmentation du miR-335-5p également à 7 jours post-IDM. Aucune modulation des miR-375 et miR-17-5p n'a été constatée chez les rats IC comparés aux témoins. Cependant, le réseau REVE-2 ayant permis l'identification de ces 4 microARNs a été construit à partir de données biologiques obtenues dans le plasma humain. Or, il a été montré que les niveaux d'expression des microARNs peuvent être différents entre le VG et le plasma. De même, il peut exister des différences importantes entre les profils d'expression des microARNs (ainsi que leurs cibles) chez le rat et chez l'homme (Vegter et al., 2017). Il sera donc nécessaire de quantifier ces microARNs à la fois dans le plasma des rats IC et des patients de l'étude REVE-2.

Enfin, à ce jour, il n'a pas été possible de quantifier EP300 par Western Blot ou par RT-Q-PCR dans notre modèle de rats IC. Le rôle d'EP300 dans l'hypertrophie des cardiomyocytes sera étudié par surexpression grâce à la transfection d'un plasmide contenant l'ADNc du gène codant pour EP300 dans des cardiomyocytes de rats nouveaux nés (NCM) traités ou non à l'isoprénaline, induisant l'hypertrophie des cardiomyocytes.

Nous avons utilisé 2 approches de biologie des systèmes dans le but d'identifier des microARNs comme potentiels biomarqueurs du RVG post-IDM (Dubois-Deruy et al., 2017; Charrier et al., 2019). La 1^{ère} reposait sur l'utilisation des données obtenues par l'analyse protéomique des VG de rats IC. A partir des protéines identifiées, une analyse a été réalisée grâce au logiciel IPA et a permis l'identification de 13 microARNs liés à 8 protéines différemment exprimées et/ou phosphorylées dans le VG des rats IC à 2 mois post-IDM. Au total, 3 de ces microARNs sont significativement modulés dans le VG et le plasma des rats IC comparés aux témoins à 7 jours et/ou 2 mois post-IDM. La seconde approche reposait sur l'analyse du réseau moléculaire de REVE-2 et a permis l'identification de 6 microARNs (miR-21-5p, miR-222-3p, miR-335-5p, miR-26b-5p, miR-375 et miR-17-5p) dont 2 sont communs à la 1^{ère} approche (miR-21-5p et miR-222-5p). De façon intéressante, l'enrichissement des cibles de ces microARNs en terme *Gene Ontology* a montré qu'ils étaient associés à des mécanismes impliqués dans le développement cardiaque et le RVG post-IDM (Charrier et al., 2019). Il serait cependant intéressant de déterminer l'origine cellulaire et le mode de sécrétion de ces microARNs.

A plus long terme, il sera intéressant de faire évoluer le réseau REVE-2 en ajoutant les variables moléculaires dosées dans le plasma des patients de l'étude REVE-2 après la construction du réseau, comme SOD2. Les données cliniques issues du suivi à long terme des patients (Bauters et al., 2017) pourraient également être utilisées pour l'interprétation du réseau.

2 Partie 2 : Analyse du réseau moléculaire de l'IC : Etude INCA

2.1 Objectifs de l'étude

L'étude INCA, ayant inclus tous les patients hospitalisés au CHRU de Lille pour une IC systolique (à fraction d'éjection réduite) entre 1998 et 2010 et suivis pendant 3 ans, a été utilisée pour la découverte de biomarqueurs permettant de prédire le décès précoce des patients IC (de Groote et al., 2004).

Récemment, une analyse protéomique a été réalisée par SELDI-TOF (*Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*) sur le plasma de 198 patients de l'étude INCA, 99 décédés de cause cardiovasculaire pendant les 3 ans de suivi appariés à 99 vivants après 3 ans. Des scores protéomiques de prédiction de mortalité cardiovasculaire ont été développés à partir des protéines identifiées et ont été validés dans la population de validation, composée de 344 patients IC consécutifs. Ces scores permettent donc d'améliorer la discrimination des patients IC et aident à la prédiction du risque de décès des patients IC (Lemesle et al., 2015).

Les objectifs de cette partie sont donc d'étudier les mécanismes impliqués dans l'IC par une approche de biologie des systèmes et d'identifier de nouveaux biomarqueurs potentiels permettant de prédire le décès précoce des patients IC. Le but est d'améliorer la stratification des patients IC en fonction de leur risque de décès précoce, afin d'améliorer leur prise en charge et de pouvoir les orienter vers des thérapies plus invasives.

Pour cela, une approche de protéomique à haut débit, le *SOMAscan assay* a été utilisée et a permis le dosage simultané de 1310 protéines dans le plasma des patients de l'étude INCA. Les protéines significativement modulées entre les patients décédés et vivants après 3 ans de suivi ont ensuite été utilisées pour construire un réseau d'interactions moléculaires. L'analyse de la topologie et de la centralité des molécules du réseau permet donc l'étude des mécanismes impliqués dans le développement de l'IC. En parallèle, une analyse statistique de régression pénalisée a été réalisée à partir des 1310 protéines dosées dans le plasma des patients de l'étude INCA dans le but d'identifier un petit nombre de protéines permettant de prédire le décès précoce des patients IC, dans les 3 ans suivant l'hospitalisation.

2.2 Résultats

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication (soumise) en **Annexe IV** : Cuvelliez et al., 2019

2.2.1 Caractéristiques de la population INCA

La table 14 présente les caractéristiques de base des patients inclus dans l'étude INCA au moment de leur bilan pour IC au CHRU de Lille.

Table 14 : Caractéristiques de base de la population INCA

	Mort cardiovasculaire (n=84)	Pas de mort cardiovasculaire (n=84)	P value
Age (années)	58,73 ± 10,67	59 ± 10	1
Hommes	78	78	1
Etiologie de l'IC			1
Ischémique	51	51	
Non ischémique	33	33	
Diabète	53	51	0,874
Classe NYHA			0,003
1	1	8	
2	52	61	
3	31	15	
Fraction d'éjection VG (%)	28,11 ± 9,95	29,30 ± 9,20	0,440
Pic de VO₂ (mL/min/kg)	10,5 ± 1,73	21 ± 5,19	1,933E-07
BNP*			4,550E-04
Faible	14	36	
Intermédiaire	38	25	
Elevé	29	20	
Créatinine (mg/L)	12,55 ± 3,55	11,12 ± 2,63	0,003
Traitement à l'inclusion			
IEC	77	77	1
β-bloquants	76	78	0,577
Diurétiques	75	65	0,038

*Les taux de BNP ont été catégorisés en faible (déciles 1, 2 et 3), intermédiaire (déciles 4, 5, 6 et 7) et élevé (déciles 8, 9, 10).

Les variables continues sont exprimées en moyenne ± écart-type et les moyennes des 2 groupes ont été comparées par un test de Student. Les variables catégorielles sont présentées en valeur absolue et/ou pourcentages, et la distribution entre les 2 groupes a été comparée par un test du χ^2 ou un test de Fisher.

Les patients sont âgés en moyenne de 59 ans et sont majoritairement des hommes (78 sur 84 dans chaque groupe). Les 2 groupes de patients ont une fraction d'éjection VG similaire d'environ 30%. Cependant, les patients décédés de cause cardiovasculaire dans les 3 ans appartiennent à une classe NYHA plus élevée, ont des taux de BNP et de créatinine plus élevés et un pic de VO₂ plus faible que les patients vivants.

2.2.2 Clustering des patients de l'étude INCA

Un *clustering* des patients a été réalisé à partir des protéines dosées par *SOMAscan assay* dans le but d'identifier des groupes de patients en fonction de leurs profils protéiques. Les données ont été centrées et réduites et la fonction *Mclust* a été utilisée pour réaliser le *clustering*. Cette méthode utilise le Critère d'Information Bayésien (BIC) pour déterminer le nombre optimal de *clusters*. Ainsi, le critère de 5 *clusters* a été choisi.

La figure 47 montre la classification (*heatmap*) des 5 groupes de patients identifiés en fonction de leurs profils protéiques. Cependant, ces groupes ne sont pas corrélés avec les principales variables cliniques, telles que le Décès/Survie, les taux de BNP et de créatinine, le stade NYHA, la FEVG ou encore le pic de VO_2 .

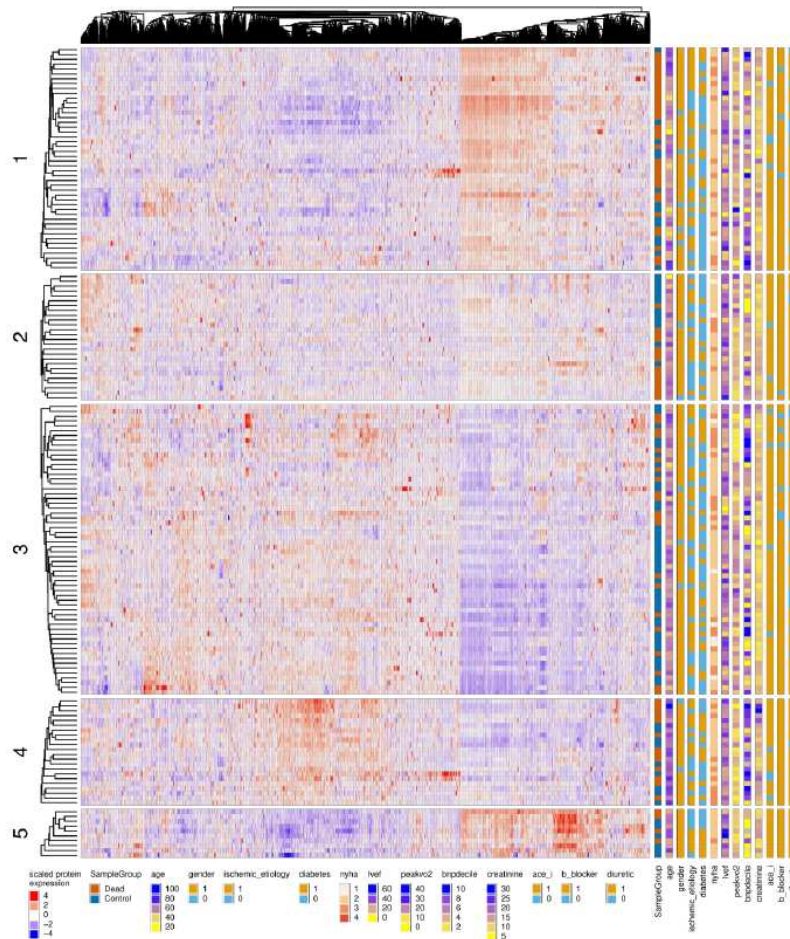


Figure 47 : Visualisation du *clustering* des patients INCA en fonction des données du *SOMAscan assay*. Les colonnes représentent les différentes protéines et les lignes les patients. Les cellules sont colorées en fonction de l'abondance des protéines dans le plasma des patients, le rouge indiquant une abondance élevée alors que le bleu correspond à une faible

abondance. Les variables cliniques (décès/survie, âge, sexe, étiologie de l'IC, diabète, stade NYHA, FEVG, pic de VO₂, décile du BNP, créatinine, traitements par inhibiteurs de l'ACE, -bloquants et diurétiques) sont présentées à droite.

2.2.3 Stratégies d'analyse des données issues du SOMAscan assay

Dans le plasma des patients de l'étude INCA, 1310 protéines ont été dosées par *SOMAscan assay*. Au total, 203 protéines sont significativement modulées entre les patients décédés et les patients vivants après 3 ans de suivi, avec un log₂ ratio absolu supérieur à 0,25. A partir de ces 203 protéines, 2 stratégies ont été utilisées pour analyser les données issues du profil protéomique obtenu par le *SOMAscan assay* (Figure 48). Dans un premier temps, un réseau moléculaire a été construit pour étudier les mécanismes impliqués dans l'IC. Dans un second temps, une analyse en régression logistique pénalisée a été réalisée pour identifier des protéines permettant de prédire le décès précoce des patients IC

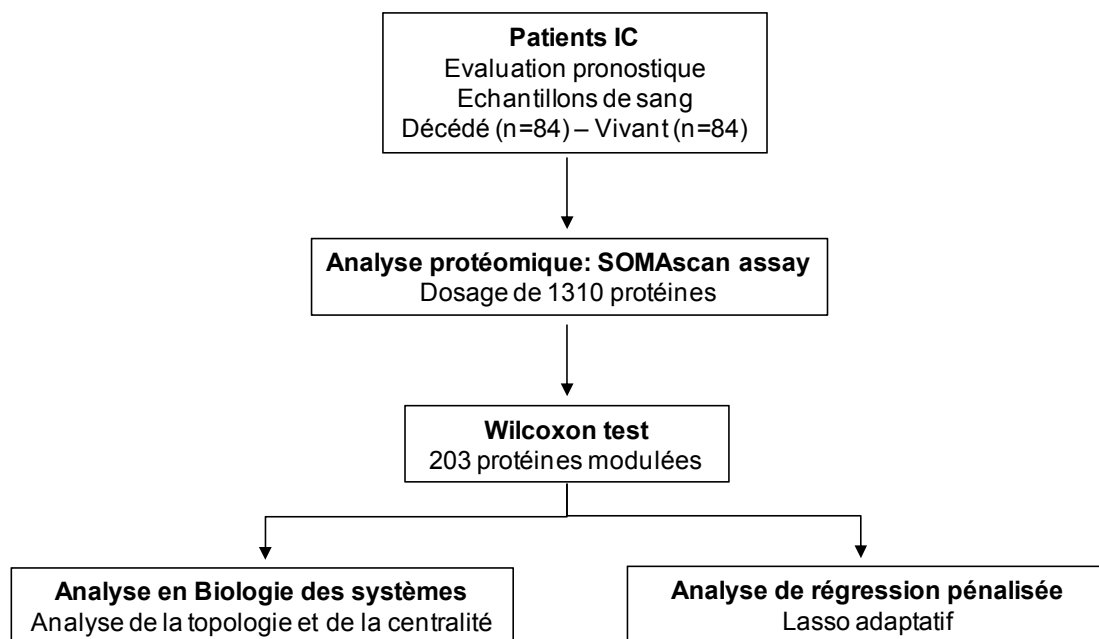


Figure 48 : Design de l'étude INCA. Cent soixante-huit patients ont été sélectionnés dans l'étude INCA (84 morts et 84 vivants) pour le dosage de 1310 protéines plasmatiques par *SOMAscan assay*. Nous avons identifié 203 protéines significativement modulées entre les patients vivants et décédés après 3 ans de suivi, par un test Wilcoxon. Une analyse en biologie des systèmes et une analyse statistique de régression pénalisée ont été réalisées en parallèle.

2.2.4 Analyse du réseau moléculaire de INCA

Le réseau moléculaire construit à partir des 203 protéines modulées entre les patients décédés et vivants est composé de 2881 nœuds, liés par 15 061 interactions. La table 15 indique le nombre de nœuds par type et la table 16 le nombre d'interactions par type.

Table 15 : Nombre de nœuds par type

Type de nœud	Nombre de nœuds dans le réseau INCA
Protéines	1639
microARNs	1072
Métabolites	170

Table 16 : Liste des interactions par type

Type d'interaction	Nombre d'interactions dans le réseau INCA
Dans une réaction voisine	4956
Interagit avec	4507
Cibles des miARNs	4306
Dans la même réaction	3388
Dans le même compartiment	1749
Catalyseur	1051
Régule la transcription	1043
Liaison	1003
Réaction de catalyse	363
Réaction	250
Dans le même groupe	232
Inhibition	88
Inhibe	87
Activation	51
Corrèle positivement	46
Expression	13
Favorise une interaction	13
Modifie une protéine	10
Active la transcription	2
Cibles de drogues	1

2.2.4.1 Analyse de la topologie du réseau

Le *clustering* des nœuds du réseau INCA a été réalisée grâce à l'algorithme InfoMap du package igraph implémenté dans R (version 1.0.1). Les *clusters* contenant moins de 5 nœuds et les *clusters* contenant uniquement un lien par nœud dans le *cluster* ont été exclus. Pour chaque *cluster*, une analyse de surreprésentation sur les termes « *Biological process* » de *Gene Ontology* a été effectuée en utilisant un test exact de Fisher ($P < 0,05$). Les voies contenant moins de 10 protéines ou plus de 500 protéines ont été exclues. L'analyse de ces *clusters* permet une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de l'IC.

Au total, 40 *clusters* ont été identifiés dans le réseau INCA, et 34 ont pu être annotés pour au moins une voie biologique. Sur les 203 protéines significativement modulées entre les patients décédés et les patients vivants, 176 appartiennent à un *cluster*.

Les *clusters* les plus représentés dans le réseau INCA sont associés au système immunitaire (*clusters* 1 et 6, contenant respectivement 203 et 109 nœuds), la régulation de la transcription et de la traduction (*clusters* 5 et 7, contenant respectivement 141 et 116 nœuds) et plusieurs voies de signalisation (*clusters* 3, 4, 10 et 11, contenant respectivement 140, 128, 102 et 82 nœuds). La table 17 détaille les 40 *clusters* identifiés dans le réseau INCA.

Table 17 : Liste des *clusters* du réseau INCA

Cluster	Nœuds	Liens	Protéines significativement modulées	Voies GO les plus significatives
1	203	787	BTK, CAPN1, CAPNS1, CAST, CRK, CSK, FN1, GRAP2, LYN, PAK6, PRKCA, PRKCB, PRKCI, PRKCZ, RAC1, SRC, YES1	immune response activating cell surface receptor signaling pathway; Fc receptor mediated stimulatory signaling pathway; Fc gamma receptor signaling pathway involved in phagocytosis
2	190	625	BAD, GSK3A, GSK3B, HSP90AA1, PRKACA, SFN, YWHAE, YWHAG, YWHAH, YWHAQ, YWHAZ	Anchoring of the basal body to the plasma membrane; AURKA Activation by TPX2; Regulation of PLK1 Activity at G2/M Transition
3	140	1020	ADRBK1, APP, C3, CCL5, CXCL1, CXCL11, CXCL2, CXCL3, CXCL6, CXCL8, F2, PF4, PPBP	Class A/1 (Rhodopsin-like receptors); G alpha (i) signalling events; GPCR ligand binding
4	128	981	CDC37, EREG, FGF16, FGF6, FGF7, FGF8, IL2RG, IL3RA, PDGFA, PDGFB, THPO, YWHAB	activation of MAPKK activity; insulin receptor signaling pathway; fibroblast growth factor receptor signaling pathway
5	141	344	CHEK2, MAPK14, MAPK8, MAPKAPK2, RAN, UBE2N	PRC2 methylates histones and DNA; DNA methylation; Meiotic recombination
6	109	209	AKR7A2, HMGB1, HSPD1, MAPKAPK5, SORCS2	MyD88 deficiency (TLR2/4); IRAK4 deficiency (TLR2/4); Diseases of Immune System
7	116	334	EEF1B2, EIF4H, N6AMT1, RPS3A, RPS7	Translation; Eukaryotic Translation Initiation; Cap-dependent Translation Initiation
8	71	177	APOM, CLIC1, CTSA, GP6, HAMP, KLK7, KPNB1, MB, RBM39, SBDS, SERPINE2, SGTA, UBE2L3	positive regulation of DNA-templated transcription, initiation; regulation of DNA-templated transcription, initiation
9	92	214	CTSS, PSMA6, PSMD7, RPS27A	APC/C-mediated degradation of cell cycle proteins; Regulation of mitotic cell cycle; anaphase-promoting complex-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process
10	102	199	GDI2, RAC3, VAV1	Rho GTPase cycle; Signaling by Rho GTPases; regulation of small GTPase mediated signal transduction
11	82	115	IL17RC, STAT1, STAT3	regulation of tyrosine phosphorylation of Stat1 protein;

				positive regulation of JAK-STAT cascade; JAKSTAT cascade
12	64	107	SMAD2, SMAD3	transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway; response to transforming growth factor beta; Signaling by TGF-beta Receptor Complex
13	51	95	CMA1, DHH, JAM3, MMP1, MMP7, PLG, SELP, TNFRSF11B	Extracellular matrix organization; extracellular matrix organization; extracellular structure organization
14	61	96	RPS6KA3, RPS6KA5	stress-activated protein kinase signaling cascade; stress-activated MAPK cascade; Recycling pathway of L1
15	52	111	CAMKK1, PRKAA2, PRKAB2, PRKAG1	PKB-mediated events; mTOR signalling; Energy dependent regulation of mTOR by LKB1-AMPK
16	67	101	ISG15, PPIE, SSRP1	Dual incision in TC-NER; Gap-filling DNA repair synthesis and ligation in TCNER; Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair (TC-NER)
17	61	74	ING1, RAD51	double-strand break repair via homologous recombination; recombinational repair; Homology Directed Repair
18	49	86	CSNK2A1, CSNK2A2, CSNK2B, SPHK1	Chaperonin-mediated protein folding; Protein folding; Association of TriC/CCT with target proteins during biosynthesis
19	53	70	NME1-NME2, PTK6, THBS1	-
20	55	93	ADIPOQ, LEP	Transcriptional regulation of white adipocyte differentiation; PPARA activates gene expression; Regulation of lipid metabolism by Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)
21	49	72	EFNA3, HNRNPAB, PKM	-
22	46	56	CASP3, EIF4G2	Apoptosis; Programmed Cell Death; Apoptotic execution phase
23	40	52	BCL2, BCL2L1, NMT1	Intrinsic Pathway for Apoptosis; Apoptosis; Programmed Cell Death

24	49	57	DDX19B, IDE	-
25	41	75	AREG, FTH1, FTL, NAPA	Golgi vesicle transport; trans-Golgi Network Vesicle Budding; Clathrin derived vesicle budding
26	41	49	TPM2, TPM4	Striated Muscle Contraction; muscle filament sliding; actin-myosin filament sliding
27	33	65	ADAMTS13, C6, C8A, C8B, C8G	Complement cascade; complement activation; Regulation of Complement cascade
28	26	45	HSD17B10, IMPDH1, LDHB, MDH1, PPA1	-
29	39	45	NUDCD3, UFM1	-
30	28	33	HSP90AB1, STUB1	response to unfolded protein; Cellular response to heat stress; Regulation of HSF1-mediated heat shock response
31	23	26	PDE11A, PDE5A	Nitric oxide stimulates guanylate cyclase; cGMP metabolic process; Platelet homeostasis
33	26	28	EDAR, TPI1	-
37	21	23	PA2G4, PDIA3	Antigen Presentation: Folding, assembly and peptide loading of class I MHC; ER-Phagosome pathway; antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, TAP-dependent
40	16	29	DKK1, KREMEN2, SOST	regulation of canonical Wnt signaling pathway; canonical Wnt signaling pathway; regulation of Wnt signaling pathway
42	11	15	OLFM4, RNF43, RSPO4, SMPDL3A, WFIKKN1	Regulation of FZD by ubiquitination; Budding and maturation of HIV virion; Membrane binding and targetting of GAG proteins
44	17	29	CA13, CA4	Pyruvate metabolism and Citric Acid (TCA) cycle; The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport; tricarboxylic acid cycle
48	17	20	METAP1, METAP2	-
50	13	15	PRDX1, PRDX6	Detoxification of Reactive Oxygen Species
51	14	18	NPPA, SNCA	Amyloid fiber formation

56	13	17	ENO1, ENO2	Gluconeogenesis; gluconeogenesis	Glucose	metabolism;
Non assignés à un cluster	431	503	ACP1, ADGRE5, AK1, ARID3A, ASAH2, CPNE1, CTSV, CYP3A4, DKK4, EIF5A, EPB41, ESD, FAM107B, FER, FLT3, HIST1H1C, IL22RA2, LTBR, MDK, NACA, NSFL1C, NXPH1, PDXP, PEBP1, PPID, PPIF, SEZ6L2, SFRP1, SFTPD, SNX4, STIP1, TKT, TPT1, VTA1, XPNPEP1			

- aucune voie biologique n'a été assignée à ce *cluster*

Le réseau INCA est visualisé en utilisant le logiciel Cytoscape (version 3.4.0). La figure 49 est une représentation du sous-réseau composé des protéines INCA et de leurs interactions.

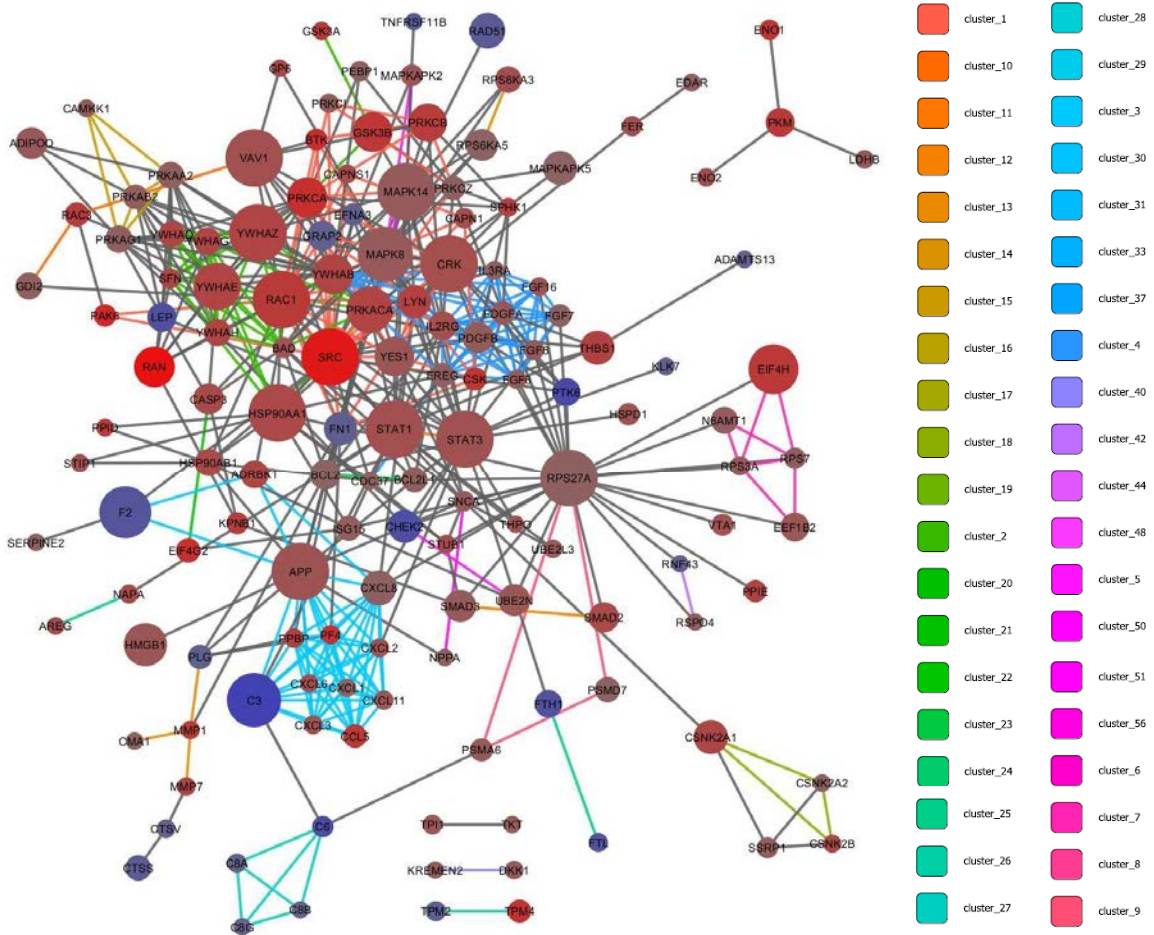


Figure 49 : Sous-réseau du réseau INCA contenant les protéines INCA interagissant directement entre elles. La taille des nœuds reflète leur centralité. La couleur des nœuds représente le log₂ ratio entre les patients décédés et vivants. Le bleu indique une diminution de l’expression chez les patients décédés, et le rouge une augmentation chez les patients décédés. Les liens sont colorés en fonction du *cluster* auquel ils sont assignés.

2.2.4.2 Analyse de la centralité d’intermédiarité des nœuds du réseau INCA

Une analyse de la centralité a été réalisée pour déterminer l’importance de chaque molécule dans le réseau et donc dans les mécanismes impliqués dans l’IC. Pour rappel, une centralité élevée suggère un rôle important de la molécule dans le réseau, alors qu’une centralité faible suggère un rôle plus périphérique.

Les molécules les plus centrales du réseau INCA sont principalement des protéines modulées dans le plasma des patients décédés comparés aux patients vivants. Les 10 nœuds les plus centraux sont des protéines INCA et sont associées à 6 *clusters* : le *cluster* 1 associé à la réponse immunitaire, le *cluster* 2 associé à la membrane plasmique, le *cluster* 5 associé à la méthylation de l'ADN, le *cluster* 9 associé au cycle cellulaire, le *cluster* 10 associé aux voies de signalisation des petites protéines G et le *cluster* 11 associé à la cascade JAK/STAT (Table 18).

Table 18 : Liste des 10 nœuds ayant les centralités les plus élevées dans le réseau INCA

Nom / UniProt ID	Nom complet	Centralité	Cluster	Voie GO la plus significative
RPS27A / P62979	Ribosomal protein S27a	0.097	9	Cell cycle
STAT3 / P40763	Signal transducer and activator of transcription 3	0.071	11	JAK-STAT cascade
MAPK14 / Q16539	Mitogen-activated protein kinase 14	0.062	5	DNA methylation
RAC1 / P63000	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	0.060	1	Immune response
HSP90AA1 / P07900	Heat shock protein 90kDa alpha family class A member 1	0.050	2	Plasma membrane
STAT1 / P42224	Signal transducer and activator of transcription 1	0.049	11	JAK-STAT cascade
SRC / P12931	SRC proto-oncogene	0.047	1	Immune response
VAV1 / P15498	Vav guanine nucleotide exchange factor 1	0.045	10	G protein signaling
YWHAZ / P63104	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophane 5-monooxygenase activation protein, zeta	0.044	2	Plasma membrane
CRK / P46108	V-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog	0.042	1	Immune response

UniProt ID : numéro d'identification dans la base de données UniProt

Certaines de ces protéines, telles que STAT1 et STAT3 pourraient jouer un rôle dans les maladies cardiovasculaires. En effet, STAT3 est connue comme ayant un rôle crucial dans la cardioprotection et serait impliquée dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque. STAT3 est augmentée dans les cœurs hypertrophiés ou insuffisants. STAT3 est activée par phosphorylation par les tyrosine-kinases JAKs, puis est transloquée dans le noyau où elle active des gènes cardioprotecteurs, dont SOD2 (Zouein et al., 2015). STAT3 peut aussi être

localisée dans la mitochondrie où elle participe à la diminution de la production de ROS en augmentant l'activité des complexes I et II. STAT3 a également un rôle dans l'apoptose. En effet, l'activation de STAT3 diminue l'apoptose des cardiomyocytes pendant l'ischémie cardiaque, en augmentant l'expression de certains gènes anti-apoptotiques comme Bcl2. De plus, comme précisé précédemment, STAT3 est une cible du miR-17-5p (Du et al., 2014). Le rôle de STAT1 dans les maladies cardiovasculaires repose principalement sur son association avec STAT3.

Le réseau INCA ayant été construit uniquement à partir de protéines, les microARNs identifiés ont une centralité faible. En effet, le microARN avec la centralité la plus élevée n'apparaît qu'en 80^{ème} position. La table 19 présente les microARNs ayant les centralités les plus élevées dans le réseau INCA.

Table 19 : Liste des microARNs sélectionnés dans le réseau INCA

Rang	Nom	Centralité	Cluster	Voie GO la plus significative
80	miR-17-5p	0,0061	Cluster 6	Réponse immunitaire
82	miR-20a-5p	0,0060	Cluster 6	Réponse immunitaire
102	miR-26b-5p	0,0047	Cluster 22	Apoptose
114	miR-93-5p	0,0037	Cluster 6	Réponse immunitaire
116	miR-16-5p	0,0035	-	
122	miR-106b-5p	0,0033	Cluster 6	Réponse immunitaire
126	miR-106a-5p	0,0030	Cluster 6	Réponse immunitaire
139	miR-20b-5p	0,0028	Cluster 6	Réponse immunitaire

De façon intéressante, 2 de ces microARNs sont les miR-17-5p et miR-26b-5p, qui ont également été sélectionnés par l'analyse du réseau REVE-2. Leur rôle dans les maladies cardiovasculaires a été décrit précédemment. L'analyse du réseau INCA a également permis la sélection des miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-93-5p, miR-106a-5p et miR-106b-5p qui appartiennent tous à la famille du miR-17, et qui sont principalement impliqués dans l'apoptose des cardiomyocytes (Zoueïn et al., 2015). Enfin, le miR-16-5p est connu comme étant l'un des microARNs les plus abondants dans le fluide péricardique (Du et al., 2014) et serait augmenté dans le plasma des patients IC (Kuosmanen et al., 2015). Cependant, son rôle dans la fonction cardiaque reste mal connu.

2.2.5 Analyse statistique en régression pénalisée

Des analyses de régression pénalisée ont été réalisées à partir des 203 protéines modulées entre les 2 groupes de patients. Pour limiter l'influence d'individus extrêmes, nous avons conservé uniquement les protéines ayant une fréquence de sélection supérieure à 0,9 par les 168 Lasso adaptatifs. Cette analyse a permis la sélection de 6 protéines modulées entre les patients décédés et vivants après 3 ans de suivi : Complément C3 (C3), MAPKAPK5 (*Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 5*), cathepsine S (CTSS), MMP1, MMP7 et FAM107B (*Family with sequence similarity 107 member B*) (Table 20).

Table 20 : Liste des 6 protéines sélectionnées par l'analyse statistique

Nom / Uniprot ID	Modulation (Mort vs. vivants, moyenne ± SEM)	P valeur*	Fréquence	Centralité / Rang	Cluster	Voie GO la plus significative
C3 / P01024	0.65 (104221 ± 4830 vs. 159620 ± 5910)	3. 18 10 ⁻⁷	1	0.037 / 13	3	Protein G
MAPKAPK5 / Q8IW41	1.17 (484.3 ± 15.5 vs. 413.6 ± 10.6)	6.63 10 ⁻³	0.97	0.017 / 30	6	Diseases of immune system
CTSS / P25774	0.78 (752.6 ± 16.1 vs. 965.9 ± 25.2)	1.38 10 ⁻⁶	1	0.008 / 63	9	Cell cycle
MMP-1 / P03956	1.96 (1499.6 ± 93.7 vs. 766.4 ± 40.2)	5.49 10 ⁻⁵	1	0.001 / 202	13	Extracellular matrix organization
MMP-7 / P09237	1.44 (913.1 ± 51.6 vs. 635.1 ± 41.5)	1.12 10 ⁻³	1	0.001 / 213	13	Extracellular matrix organization
FAM107B / Q9H098	0.84 (812.4 ± 21 vs. 972.4 ± 28.2)	5.54 10 ⁻⁴	1	0.0004 / 353	-	-

-, pas de *cluster*; *P valeur ajustée par la méthode de Benjamini -Höcherberg; Fréquence de sélection après le Lasso adaptatif

Une carte de classification (*heatmap*) a été construite à partir des 6 protéines sélectionnées dans le but de visualiser des sous-groupes de protéines avec des profils d'expression similaires entre les 2 groupes de patients (Figure 50). Ainsi, 2 sous-groupes ont été identifiés et contiennent chacun 3 protéines. Le groupe 0 contient 3 protéines augmentées dans le plasma des patients décédés comparés aux patients vivants : MAPKAPK5, MMP1 et MMP7. Le groupe 1 contient 3 protéines diminuées dans le plasma des patients décédés comparés aux

vivants : C3, CTSS et FAM107B. Toutes les protéines ont un log2 ratio supérieur à 0,25, une fréquence supérieure à 0,9 et une *P*-valeur significative pour le test ANOVA ($P < 0,05$). La quantification par *SOMAscan assay* de ces 6 protéines est détaillée sur la figure 51.

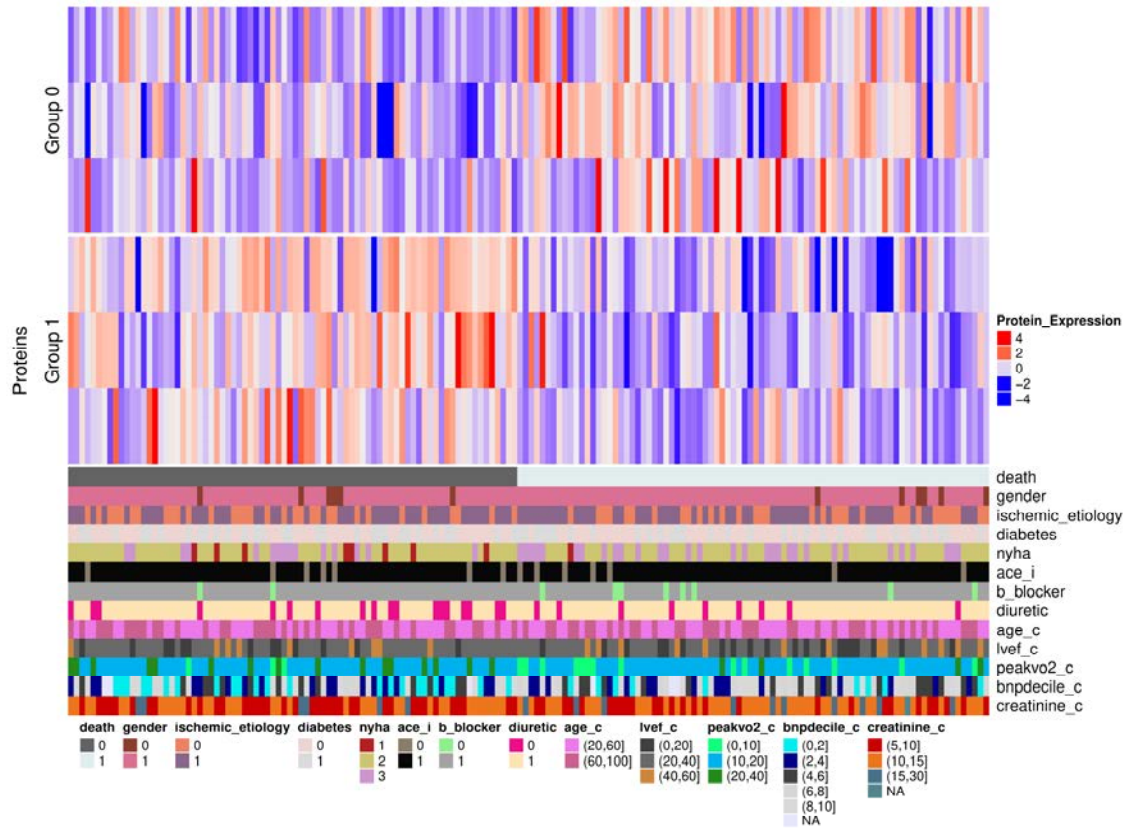


Figure 50 : Carte de classification des 6 protéines sélectionnées par analyse statistique. Les colonnes représentent les patients divisés en 2 groupes fixes (décédés et vivants). Les lignes représentent les protéines groupées en fonction de leur profil protéique. Les cellules sont colorées en fonction de l'abondance des protéines. Le rouge représente une abondance élevée et le bleu une abondance faible. Les barres colorées sous les patients représentent les différentes variables cliniques.

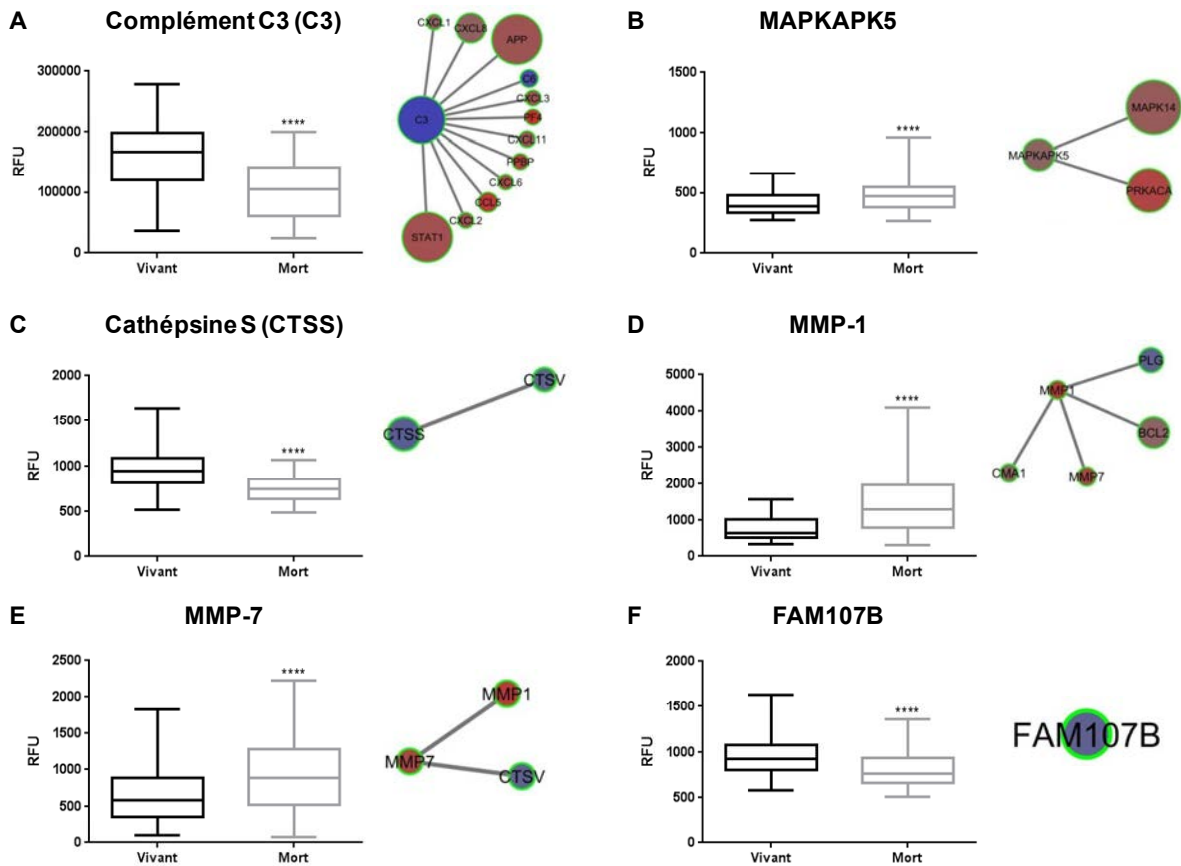


Figure 51 : Taux plasmatique des 6 protéines quantifiées par *SOMAscan assay*. Quantification de C3b (A), MAPKAPK5 (B), Cathépsine S (C), MMP-1 (D), MMP-7 (E) et FAM107B (F) par *SOMAscan assay* (panneaux de gauche) et liens les plus proches dans le réseau INCA (panneaux de droite). Les données sont exprimées en unité d'expression relative (RFU), et présentées en boîtes à moustaches montrant la médiane et les minimum et maximum. La significativité statistique est déterminée par un test de Wilcoxon-Mann-Whitney. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,00001$. Les sous-réseaux INCA centrés sur les 6 protéines sont visualisés et leurs interactions avec les autres protéines quantifiées dans le plasma des patients INCA (panneaux de droite). La couleur des nœuds représente le \log_2 ratio de la comparaison entre les patients décédés et vivants, le rouge correspondant à un \log_2 ratio élevé et le bleu à un \log_2 ratio faible. La taille des nœuds correspond à leur centralité dans le réseau INCA.

Trois de ces protéines, C3, MAPKAPK5 et la cathépsine S ont une centralité élevée dans le réseau INCA, suggérant un rôle important de ces protéines dans les mécanismes impliqués dans l'IC.

Les 6 protéines appartiennent à 4 *clusters* différents : C3 appartient au *cluster 3* associé aux voies de signalisation des protéines G, MAPKAPK5 au *cluster 6* associé aux maladies du système immunitaire, la cathépsine S au *cluster 9* associé au cycle cellulaire et les MMP-1 et MMP-7 au *cluster 13* associé à l'organisation de la matrice extracellulaire. Enfin, FAM107B n'est assigné à aucun *cluster*.

2.2.6 Quantification de C3, Cathepsine S, MMP-1 et MMP-7 par des dosages conventionnels dans une sous-population de l'étude INCA

Pour déterminer la pertinence des résultats obtenus par le *SOMAscan assay*, nous avons quantifié C3, la cathepsine S et les MMP-1 et MMP-7 dans le plasma de patients d'une sous-population de l'étude INCA par des dosages conventionnels. C3, MMP-1 et MMP-7 ont été mesurées par la technologie Luminex et la cathepsine S par dosage ELISA.

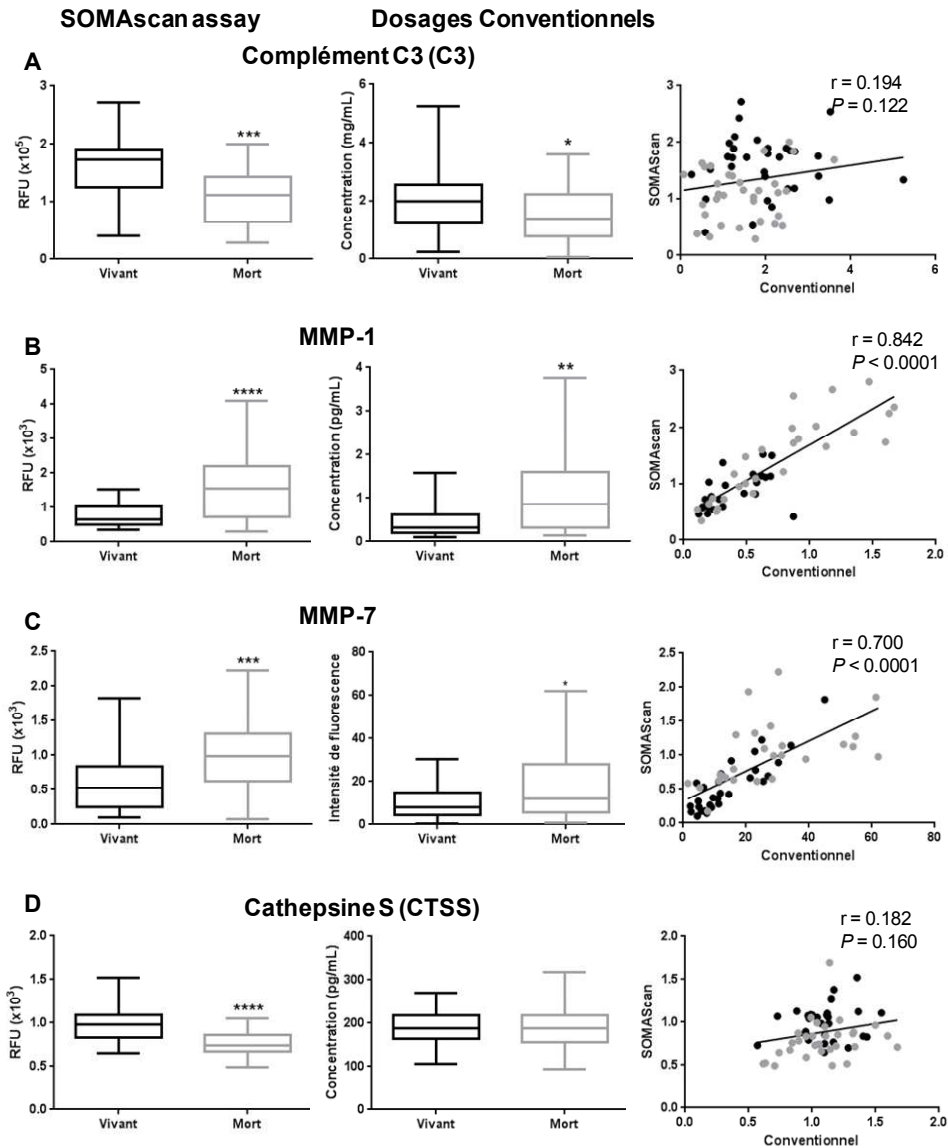


Figure 52 : Corrélation pour les 4 protéines quantifiées par *SOMAscan assay* et un dosage conventionnel. Les quantifications de C3 (A), MMP-1 (B), MMP-7 (C) et Cathepsine S (D) ont été réalisées dans les mêmes patients (33 morts et 33 vivants) de l'étude INCA par *SOMAscan assay* (panneaux de gauche) et techniques conventionnelles (panneaux du milieu). Les données sont exprimées en RFU pour le *SOMAscan assay* et en concentration pour les techniques conventionnelles, à l'exception de MMP-7 exprimée en intensité de fluorescence. Les données sont présentées en boîtes à moustaches montrant la médiane et les minimum et maximum. La significativité statistique est déterminée par un test de Wilcoxon-Mann-

Whitney. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,00001$. Les corrélations ont été réalisées pour les 4 protéines quantifiées par les 2 méthodes (panneaux de droite). Les patients décédés et vivants sont indiqués respectivement en gris et noir. Sur chaque graphique est indiqué le coefficient de corrélation Spearman et la valeur de P .

Comme le montre la figure 52, nous avons obtenu des résultats concordants entre les dosages effectués par SOMAscan (panneaux de gauche) ou conventionnels (panneaux du milieu) pour C3 (A), MMP-1 (B) et MMP-7 (C), mais pas pour la cathepsine S (D). C3 est significativement diminué dans le plasma des patients décédés comparés aux patients vivants ($P=0,0382$). MMP-1 est significativement augmentée dans le plasma des patients décédés comparés aux patients vivants ($P=0,0034$). Enfin, les taux plasmatiques de MMP-7 étant trop faibles, il n'a pas été possible de calculer les concentrations pour tous les échantillons. Nous avons donc comparé les intensités de fluorescence entre les 2 groupes. L'intensité de fluorescence de MMP-7 est significativement augmentée chez les patients décédés comparés aux vivants ($P=0,0158$). Nous n'avons pas pu valider la modulation de la cathepsine S entre les 2 groupes de patients ($P=0,3114$). Cependant, 2 isoformes de la cathepsine S ont été décrites et le dosage ELISA mesure les 2 isoformes, ce qui pourrait expliquer cette différence. Nous avons ensuite réalisé les corrélations entre les résultats du *SOMAscan assay* et des dosages conventionnels pour les 4 protéines. Seules les quantifications pour MMP-1 et MMP-7 sont corrélées entre les 2 techniques (Figure 52). Comme attendu, aucune corrélation n'est observée pour la cathepsine S. Enfin, il n'y a pas non plus de corrélation pour C3 entre les 2 techniques de dosage, ce qui peut s'expliquer par le fait qu'il existe des SOMAmers spécifiques pour C3a (SL000313) et C3b (SL00314) et que le dosage conventionnel utilisé ne permet pas de discriminer C3a et C3b. Or, l'isoforme sélectionnée par l'analyse statistique est le C3b correspondant au SOMAmer SL00314.

2.3 Conclusion-Discussion

Avec le vieillissement de la population, l'IC reste un problème de santé publique. Il est important d'améliorer la stratification des patients IC dans le but de les orienter vers des traitements adaptés. Le but de cette étude était d'identifier une liste de protéines plasmatiques qui pourraient prédire le décès précoce des patients IC systoliques, pendant un suivi de 3 ans, en utilisant des approches de biologie des systèmes et de statistiques, à partir de données de protéomique à haut débit.

Dans ce but, nous avons utilisé le *SOMAscan assay* qui permet la quantification simultanée d'un très grand nombre de protéines (Kuosmanen et al., 2015). Le *SOMAscan assay* a une gamme de quantification plus large que la technologie Luminex et permet de détecter des protéines des concentrations plasmatiques de la femtomole à la micromole (Marques et al., 2016). De plus, il a été montré que les valeurs d'intensité de fluorescence sont des indicateurs plus robustes de l'expression protéique comparées aux concentrations absolues, en termes de reproductibilité et d'analyse statistique.

Deux stratégies ont été utilisées pour analyser les protéines quantifiées par le *SOMAscan assay*. Tout d'abord, nous avons construit un réseau d'interactions moléculaires dans le but d'étudier les mécanismes sous-jacents à l'IC. Les principaux *clusters* du réseau INCA sont associés au système immunitaire, à la transcription, la traduction et à plusieurs voies de signalisation.

En parallèle, nous avons réalisé une analyse statistique en régression pénalisée pour identifier un nombre restreint de protéines permettant de prédire le décès précoce des patients IC. En utilisant une analyse de Lasso adaptatif, nous avons sélectionné 6 protéines candidates, pouvant être divisées en 2 groupes avec un profil d'expression similaire entre les patients décédés et les patients vivants : MAPKAPK5, MMP-1 et MMP-7 sont augmentées chez les patients décédés et C3b, cathepsine S et FAM107B sont diminuées chez les patients décédés comparés aux vivants. De façon intéressante, 3 de ces protéines, C3b, MAPKAPK5 et cathepsine S, ont une centralité élevée dans le réseau INCA, suggérant un rôle important de ces protéines dans les mécanismes de l'IC.

Nous avons utilisé des techniques conventionnelles pour quantifier C3, cathepsine S, MMP-1 et MMP-7 et obtenus des résultats concordants pour C3, MMP-1 et MMP-7, avec des corrélations positives pour les 2 dernières protéines. Nous n'avons pas pu valider les résultats obtenus par *SOMAscan assay* pour la Cathepsine S, ce qui pourrait s'expliquer par l'existence de 2 isoformes de la cathepsine S qui ne sont pas discriminées par le kit ELISA utilisé, et par la sensibilité plus faible de l'ELISA comparé au *SOMAscan assay*. En effet, l'isoforme 2 de la cathepsine est déletée de 50 acides aminés par rapport à l'isoforme 1. Nous n'avons pas observé de corrélation pour C3. En effet, le kit Luminex ne permet pas de discriminer C3a et C3b contrairement au *SOMAscan assay*.

Le complément C3 joue un rôle central dans le système immunitaire inné et dans le remodelage cardiaque et l'IC. C3a et C3b sont les produits du clivage du complément C3 au cours de l'activation du complément et sont composés respectivement de 77 et 915 acides aminés. Le complément C3c est le produit du clivage du C3c lors de la cascade d'activation

du complément. Il a déjà été montré que des patients IC avec des taux faible de C3c ont un risque plus élevé de mortalité (Brody et al., 2010). Au contraire, des taux élevés de C3a ont été associés à un risque élevé d'évènements cardiovasculaires chez des patients IC (Lim et al., 2017). MAPKAPK5 est une serine/thréonine kinase intracellulaire qui a été détectée dans le cœur (Frey et al., 2013). Il a récemment été suggéré qu'elle pourrait être un régulateur de la fonction des fibroblastes (Gombos et al., 2012). FAM107B appartient à la famille des petites protéines de réponse au stress FAM107, qui ont des fonctions proches de celles des HSPs (Gerits et al., 2009). Cependant, ses fonctions ont été très peu étudiées. Par leur implication dans de nombreux processus biologiques, les cathepsines, dont la cathepsine S, sont considérées comme de potentiels biomarqueurs circulants de l'IC (Sahadevan and Allen, 2017). Cependant, des patients avec une IC chronique n'ont pas montré de différence dans leurs taux de cathepsine S, mesurés par dosage ELISA, comparés à des contrôles, ce qui est consistant avec nos résultats (Liu et al., 2016). De plus, les taux sériques de cathepsine S ne sont pas associés au risque d'évènements cardiovasculaires chez des patients avec une maladie coronarienne stable (Cheng et al., 2012; Li et al., 2012). Enfin, les MMPs jouent un rôle dans le remodelage de la matrice extracellulaire pendant les maladies cardiovasculaires (Spinale 2007; De Leon et al., 2012). De façon intéressante, la combinaison du ratio sérique CITP (*Carboxy-terminal telopeptide of collagen type I*):MMP-1 (un indice du cross-linking du collagène myocardique), et du PICP (*Carboxyterminal propeptide of type I procollagen*) (un indice direct de dépôt de collagène myocardique) permet d'identifier les patients présentant une fibrose myocardique (Ravassa et al., 2017). MMP-7 a été associée à une augmentation du risque d'évènements cardiaque. De plus, chez des patients présentant une hypertrophie du VG, une augmentation des taux de MMP-7 est associé au RVG (Zile et al., 2011).

A plus long terme, afin de confirmer le rôle potentiel des 6 protéines identifiées comme biomarqueurs du décès précoce de patients IC, les résultats devront être validés dans des cohortes de patients IC indépendantes.

Discussion- Conclusion

1 Intérêt de la biologie des systèmes

Ces dernières années, la biologie des systèmes a connu un énorme développement grâce aux approches « omiques » à haut débit de plus en plus performantes. La biologie des systèmes permet donc le traitement de la grande quantité de données qui est aujourd’hui à notre disposition. De plus, l’utilisation de différentes sources de données « omiques » (génomique, transcriptomique, protéomique et métabolomique) permet l’étude des mécanismes biologiques à différents niveaux, tels que la régulation de l’expression des gènes, la régulation de la traduction des protéines par les ARNs non codants par exemple, les interactions protéine-protéine, les modifications post-traductionnelles ou encore les réactions enzymatiques (Yugi et al., 2016) (Figure 53).

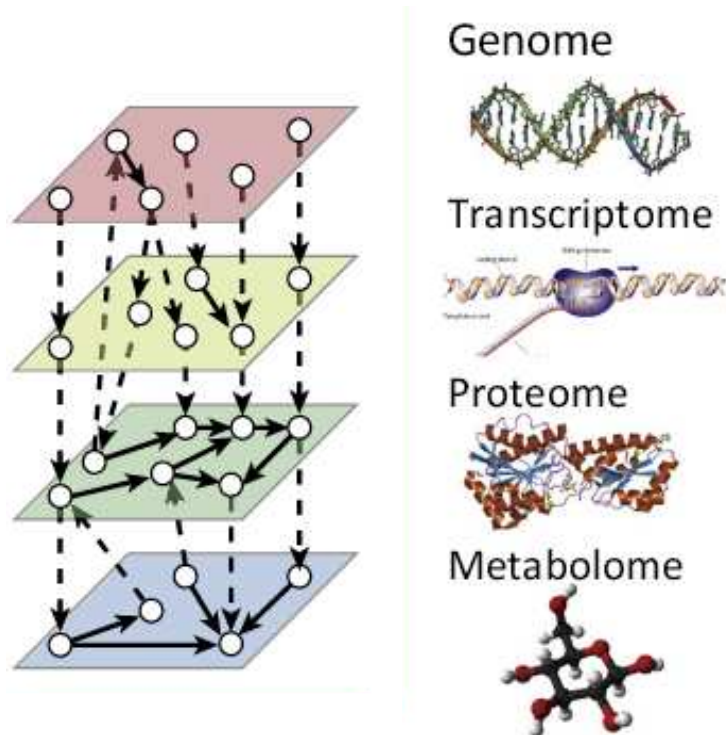


Figure 53 : Les différents niveaux d’étude de la biologie des systèmes (d’après Yugi et al., 2016)

Ainsi, la construction de réseaux d’interactions moléculaires, à partir de données expérimentales et des bases de données disponibles, permet l’étude des mécanismes physiopathologiques des maladies cardiovasculaires. Plusieurs études ont ainsi été menées pour étudier les mécanismes impliqués dans l’IDM, l’hypertrophie cardiaque ou encore l’IC. Par exemple, un réseau d’interactions protéine-protéine spécifique de l’IDM (MIPIN) a été

construit à partir d'une liste de protéines liées à l'IDM dans différentes études. L'analyse du MIPIN a montré qu'une grande quantité de protéines sont impliquées dans la transcription, la réponse inflammatoire et le remodelage de la matrice extracellulaire (Nguyen et al., 2014). De même, un réseau moléculaire de l'hypertrophie cardiaque a été construit à partir de données expérimentales et a mis en évidence le rôle de 5 interactions entre différentes voies de signalisation dans l'hypertrophie et l'apoptose des cardiomyocytes : récepteur α -adrénergique et protéines G q, IP3 (Inositol-3-phosphate) et calcium, EPAC (*Exchange Protein directly Activated by cAMP*) et CaMK, JNK et NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*), p38 et NFAT (Kang et al., 2017).

L'utilisation de la biologie des systèmes permet également l'identification de biomarqueurs dans différentes pathologies. En effet, elle permet par exemple l'identification de microARNs régulant les mécanismes pathophysiologiques et pouvant être sécrétés dans la circulation sanguine. L'intérêt de la biologie des systèmes dans la recherche de biomarqueurs repose sur le fait qu'elle apporte également des informations sur le contexte biologique (Azuaje et al., 2012).

Il est cependant important d'associer les approches de bioinformatique et la biologie expérimentale classique afin de valider les molécules identifiées comme étant potentiellement impliquées dans la pathologie ou comme nouveaux biomarqueurs dans des modèles expérimentaux d'animaux, de cultures cellulaires ou des cohortes de patients.

Les objectifs de ma thèse étaient d'étudier les mécanismes du RVG post-IDM et de l'IC et de rechercher des biomarqueurs de l'évolution délétère suite à un IDM et du décès précoce des patients IC par la construction de réseaux moléculaires. Dans ce but, nous avons utilisé 2 cohortes de patients, la population REVE-2 pour l'étude du RVG post-IDM et la population INCA pour l'étude du décès précoce des patients IC.

Le réseau REVE-2 a été construit à partir de 24 variables moléculaires dosées dans le plasma des patients post-IDM de l'étude REVE-2 à un ou plusieurs temps (inclusion, 1 mois, 3 mois et un an) (Pinet et al., 2017). Les modules actifs ont été extraits à chaque temps à partir des variables REVE-2 significativement modulées entre les patients avec un RVG et les patients sans RVG, ce qui permet l'étude des mécanismes du RVG au cours du temps. Le réseau INCA a, quant à lui, été construit à partir de 203 protéines dosées par *SOMAscan assay* et significativement modulées entre les patients décédés dans les 3 ans et les patients vivants (Cuvelliez et al., 2019 soumis).

Deux approches différentes ont été utilisées pour la construction et l'étude des réseaux moléculaires de REVE-2 et INCA. Dans l'étude REVE-2, nous avons peu de molécules à

disposition pour la construction du réseau d'interactions moléculaires qui est composé de 1310 molécules. Le but de cette étude était d'identifier d'autres biomarqueurs par leur rôle clé dans le réseau. Au contraire, dans le réseau INCA, nous avons un grand nombre de protéines à disposition, issues d'une approche de protéomique à haut débit, puisque 1310 ont été dosées par *SOMAscan assay* et que 203 étaient significativement modulées, pour construire le réseau INCA composé de 2881 molécules. Dans un 1^{er} temps, le but était de restreindre le nombre de biomarqueurs permettant de catégoriser les patients IC. Dans un 2nd temps, le réseau INCA permet d'étudier les mécanismes dans lesquels les biomarqueurs sélectionnés sont impliqués.

2 Mécanismes impliqués dans le RVG post-IDM et dans l'IC

L'extraction des modules actifs du réseau REVE-2 a montré que la majorité des changements dans l'expression des molécules a lieu à l'inclusion et à 3 mois post-IDM, correspondant respectivement à la phase post-IDM et au développement du RVG. A l'inclusion, les molécules actives sont principalement associées à des mécanismes impliqués dans l'inflammation. Au contraire, à 3 mois, les molécules actives sont impliquées dans des mécanismes spécifiques du RVG post-IDM, tels que le remodelage de la matrice extracellulaire et la fibre musculaire. Enfin, à un an post-IDM, on observe une extinction de tous les mécanismes impliqués dans le RVG, avec seulement 8 molécules encore actives (l'eau, REST pour *RE1-silencing transcription factor*, miR-375, BNP, testostérone, IDE pour *Insulin-Degrading Enzyme*, aldostérone et 8-hydroxycarvedilol), ce qui suggère que le RVG est installé.

L'analyse de la centralité des molécules du réseau REVE-2 a permis de déterminer leur importance dans les mécanismes du RVG post-IDM. Nous avons choisi d'étudier les 50 molécules ayant les centralités les plus élevées et d'exclure les molécules actives uniquement à l'inclusion, les mécanismes impliqués étant principalement associés à l'inflammation. Nous avons ainsi sélectionné 2 protéines, EP300 et ESR1, et de 4 microARNs, les miR-335-5p, miR-26b-5p, miR-375 et miR-17-5p, pouvant être impliqués dans le RVG post-IDM. L'analyse bibliographique de ces 6 molécules a montré un rôle potentiellement cardioprotecteur de ESR1 et de miR-26b-5p, miR-17-5p et miR-335-5p, alors que EP300 et le miR-375 auraient un rôle plutôt délétère dans les maladies cardiovasculaires (Figure 56). A plus long terme, il sera nécessaire de valider le rôle de ces 6 protéines dans le RVG post-IDM. Les mécanismes dans lesquels sont impliquées ces 6 molécules sont détaillés ci-après.

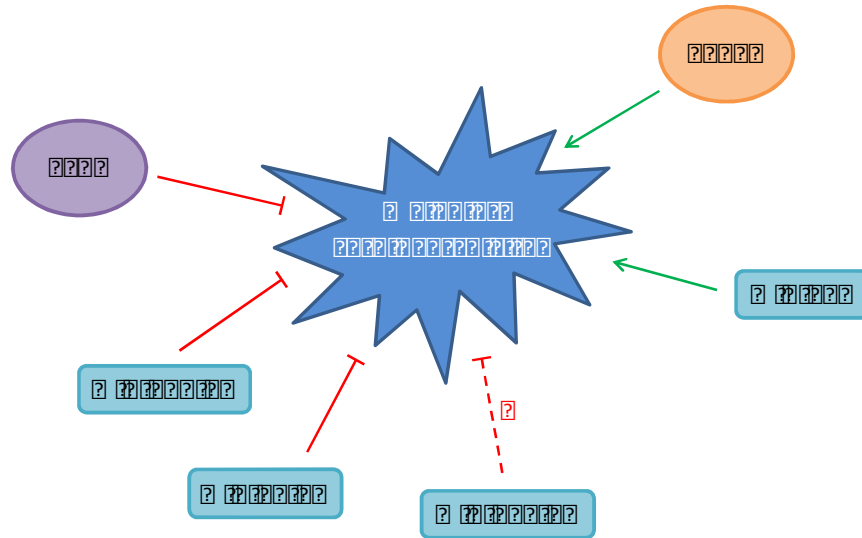


Figure 54 : Rôle des 6 molécules sélectionnées dans le réseau REVE-2 dans les maladies cardiovasculaires.

L'analyse de la topologie du réseau INCA a montré que les principaux clusters étaient associés à des mécanismes impliqués dans le système immunitaire, la transcription et la traduction et dans plusieurs voies de signalisation, comme la cascade JAK/STAT, les voies MAPK ou encore les voies de signalisation des protéines G. Le rôle de ces différentes voies dans les maladies cardiovasculaires a déjà été décrit. En effet, l'activation de la voie JAK/STAT lors du RVG post-IDM conduit à l'activation de la transcription de gènes anti-apoptotiques et anti-oxydants (Shi and Wei, 2012). L'activation des récepteurs couplés aux protéines G en conditions de stress cardiaque entraîne une activation de la PKC, de la PLC et des voies MAPK, qui conduisent à l'activation de CaMKII et donc à une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire (Bernardo et al., 2010; Anderson et al., 2011).

2.1 Rôle de EP300 dans le RVG post-IDM

L'histone acétyl-transférase EP300 est impliquée dans un grand nombre de processus cellulaire et dans différentes pathologies. L'acétylation est une modification post-traductionnelle des protéines qui consiste en l'ajout d'un groupement acétyl au niveau des lysines contenues dans des régions riches en lysine et comprenant préférentiellement une glycine en position -1 par rapport à la lysine acétylée, une proline, phénylalanine ou tyrosine en position +1 et une valine ou isoleucine en position +2 (Lundby et al., 2012). L'acétylation peut entrer en compétition avec d'autres modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation.

Les modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation, l'acétylation ou la O-GlcNAcylation, peuvent être des marqueurs particulièrement intéressants des pathologies cardiaques. En effet, des modulations des modifications post-traductionnelles de protéines clés peuvent être observées au cours du RVG post-IDM ou de l'IC. Ces modifications peuvent avoir un impact sur l'activité des protéines et donc sur leur rôle dans les processus physiopathologiques. Par exemple, une altération du statut de phosphorylation des protéines contractiles est observée dans l'IC (Van der Velden et al., 2003). Il a été montré que la diminution du taux plasmatique de troponine T phosphorylée en serine 208 pourrait être un biomarqueur du RVG post-IDM (Dubois-Deruy et al., 2011).

De manière intéressante, EP300 est connu comme étant impliqué dans l'hypertrophie et la fibrose cardiaque. En effet, EP300 est capable d'acétyler les histones, mais aussi d'autres protéines comme les facteurs de transcription MEF-2 et GATA-4 impliqués dans la croissance cellulaire, ou SMAD3 (*Mothers against decapentaplegic homolog 3*) impliqué dans la transformation des myofibroblastes (Kuno et al., 2015) (Figure 55). Il a été montré que l'interaction de ces facteurs de transcription avec EP300 et leur acétylation favorise leur activité transcriptionnelle (Slepek et al., 2001; Miyamoto et al., 2006).

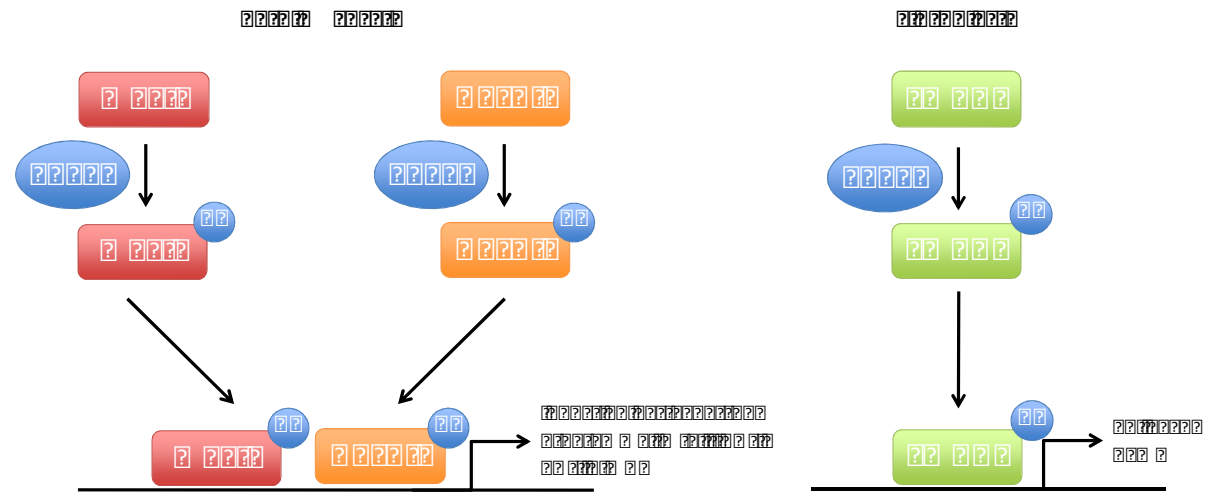


Figure 55 : Rôle de EP300 dans l'hypertrophie et la fibrose cardiaque

Les résultats obtenus à partir du réseau REVE-2 suggèrent un rôle important de l'acétylation/déacétylation des protéines dans le développement du RVG post-IDM. L'étude de la modulation de l'acétylation des protéines permettrait de mieux comprendre les mécanismes du RVG et d'identifier de nouveaux biomarqueurs potentiels. Une de ces protéines est la protéine SOD2, étudiée au laboratoire. En effet, certaines études montrent que l'acétylation de SOD2 conduit à son inactivation (Tanno et al., 2010). Inversement, SOD2 est

activée après déacétylation par les sirtuines (Figure 56). La dérégulation de la balance entre l'acétylation et la déacétylation de SOD2 pourrait donc être impliquée dans la régulation du stress oxydant lors du RVG post-IDM (Kuno et al., 2015).

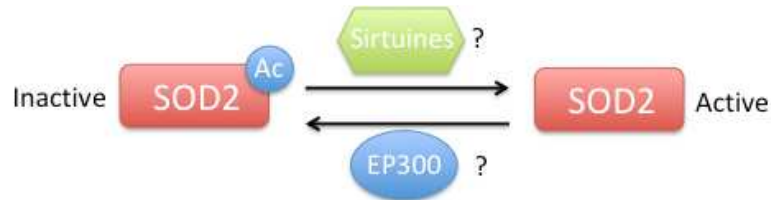


Figure 56 : Hypothèse de la régulation l'activité de SOD2 par acétylation

D'un point de vue expérimental, nous ne sommes, à ce jour, pas parvenus à détecter l'expression de EP300 dans le cœur de notre modèle de rats IC par RT-Q-PCR ou Western Blot. Il est prévu d'étudier le rôle de EP300 dans l'hypertrophie des cardiomyocytes par surexpression grâce à la transfection d'un plasmide contenant l'ADNc du gène codant pour EP300 dans des cardiomyocytes de rats nouveaux nés traités ou non à l'isoprénaline, induisant l'hypertrophie des cardiomyocytes.

2.2 Rôle des œstrogènes dans le RVG post-IDM

L'analyse du réseau REVE-2 a également permis la mise en évidence d'un rôle potentiel des œstrogènes et de leur récepteur ER , codé par le gène ESR1, dans le développement du RVG post-IDM. En effet, le rôle cardioprotecteur des œstrogènes est maintenant bien connu. Il a été montré que l'incidence d'IDM était plus faible chez les femmes pré-ménopausées comparées aux hommes, ainsi que leur taux de mortalité. ER est impliqué dans la régulation de différentes voies de signalisation impliquées dans le RVG post-IDM. En effet, ER lié à l'E2 s'associe aux kinases PI3K et Src ou aux protéines G , ce qui conduit à l'activation des voies JAK/STAT, p38/MAPK et PI3K/Akt (Puzianowska-Kuznicka, 2012; Arnal et al., 2017) (Figure 57).

ER est aussi impliqué dans la régulation du stress oxydant en favorisant l'expression des SOD et inhibant la synthèse des ROS (Puzianowska-Kuznicka, 2012). Nous avons récemment montré qu'il existe des différences dans les taux plasmatiques de SOD2 et des microARNs (miR-21-5p, miR-222-3p, miR-23a-3p) régulant son expression entre les hommes et les femmes. En effet, nous avons observé une augmentation significative de SOD2 chez les femmes présentant un RVG comparées aux femmes sans RVG, mais aucune

Dedkov et al. ont mis en place un modèle de ligature de l'artère coronaire gauche chez des rats mâles et femelles pour étudier les différences liées au sexe dans la fonction cardiaque lors d'un RVG post-IDM, et ont montré que les femelles conservaient de meilleures performances cardiaques après un IDM comparées aux mâles (Dedkov et al., 2016).

2.3 Implication des microARNs dans le RVG post-IDM et l'IC

L'analyse des réseaux REVE-2 et INCA a permis l'identification de microARNs pouvant être impliqués dans le RVG post-IDM et l'IC. L'étude REVE-2 a permis la sélection de 7 microARNs, les miR-21-5p, miR-222-3p, miR-23a-3p, miR-335-5p, miR-26b-5p, miR-375 et miR-17-5p. Malgré une centralité élevée, le rôle des miR-335-5p et miR-375 dans les maladies cardiovasculaires reste encore très mal connu. En effet, le miR-335-5p n'a jamais été décrit dans le cœur. Le miR-375, quant à lui, est surtout connu pour son rôle dans le développement embryonnaire du cœur. Les miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p sont particulièrement connus pour leur rôle dans les mécanismes impliqués dans les maladies cardiovasculaires, dont la régulation du stress oxydant (Dubois-Deruy et al., 2017). Au contraire, les miR-26b-5p et miR-17-5p sont eux bien connus pour leur rôle dans les maladies cardiovasculaires. En effet, le miR-26b-5p aurait un rôle anti-hypertrophique en inhibant la traduction de GATA-4, et est diminué dans le VG de rats ayant subi une TAC (Han et al., 2012). Le miR-17-5p aurait, quant à lui, un rôle anti-apoptotique en inhibant la traduction de STAT3, et serait augmenté dans le myocarde de souris après ischémie-reperfusion (Du et al., 2014). De plus, une analyse à l'aide de *Gene Ontology* des cibles des microARNs sélectionnés avec les applications ClueGO et CluePedia a montré qu'ils sont potentiellement impliqués dans des mécanismes sous-jacents au RVG, comme la prolifération des fibroblastes, la régulation du métabolisme des ROS et les voies de signalisation intrinsèques de l'apoptose (Charrier*, Cuvelliez* et al., 2019).

L'analyse du réseau INCA a également permis l'identification de microARNs potentiellement impliqués dans l'IC, dont les microARNs de la famille du miR-17 et miR-26b-5p, également sélectionnés dans le réseau REVE-2. Enfin, le miR-16-5p serait augmenté dans le plasma des patients IC, mais son rôle reste peu décrit (Kuosmanen et al., 2015).

Nous avons quantifié les microARNs sélectionnés par l'analyse du réseau REVE-2 dans le VG des rats IC et témoins. Le miR-21-5p est augmenté dans le VG des rats IC comparés aux contrôles à 2 mois post-IDM et le miR-23a-3p à 7 jours post-IDM. Le miR-

significative du miR-26b-5p dans le VG des rats à 7 jours post-IDM, et une tendance à l'augmentation de l'expression du miR-335-5p dans le VG des rats IC à 7 jours post-IDM comparés aux contrôles. Enfin, les miR-375 et miR-17-5p ne sont pas modulés entre les rats IC et contrôles.

Par la suite, il sera intéressant de quantifier l'expression des miR-335-5p, miR-26b-5p, miR-375 et miR-17-5p dans le plasma des rats IC, puis dans le plasma des patients de l'étude REVE-2. Pour étudier le rôle des microARNs sélectionnés, nous pourrions également quantifier l'expression de leurs cibles dans le VG des rats IC. Nous pourrions également réaliser des tests luciférase en utilisant un plasmide contenant le 3'UTR des cibles des microARNs, en présence ou non d'agomiRs et d'antagomiRs.

Nous avons utilisé 2 approches de biologie des systèmes pour identifier des microARNs pouvant être utilisés comme biomarqueurs, à partir de 2 modèles différents, un modèle d'IC chez le rat et une cohorte de patients post-IDM, l'étude REVE-2. La 1^{ère} approche reposait sur l'utilisation des 45 protéines différenciellement exprimées et/ou phosphorylées dans le VG de notre modèle de rats IC à 2 mois post-IDM et du logiciel IPA. La 2^{ème} approche consistait en l'analyse de la centralité et des modules actifs du réseau REVE-2. De façon intéressante, les 3 microARNs identifiés par l'analyse IPA (miR-21-5p, miR-222-3p, miR-23a-3p) ont également été sélectionnés dans le réseau REVE-2, en plus de l'identification de 4 autres microARNs (miR-335-5p, miR-26b-5p, miR-375, miR-17-5p). Les 2 approches donnent donc des résultats redondants. De plus, l'approche basée sur l'analyse du réseau REVE-2 permet l'identification d'un plus grand nombre de microARNs que la 1^{ère} approche, et est basée sur des données obtenues chez l'homme. Il n'est donc pas nécessaire d'utiliser les 2 techniques à chaque analyse. L'analyse du réseau REVE-2 semble la plus adaptée, même si elle est plus complexe à mettre en place.

3 Biomarqueurs du décès précoce des patients IC

Avec le vieillissement de la population, les maladies cardiovasculaires restent un enjeu majeur de santé publique. Cependant, il existe peu de biomarqueurs efficaces pour détecter le RVG post-IDM et l'IC à un stade précoce. Actuellement, le seul biomarqueur utilisé pour détecter l'IC en pratique clinique est le BNP, mais il présente des limites. En effet, il n'est pas spécifique de l'IC et peut être modulé par l'âge ou une insuffisance rénale. Il est important de

pouvoir prédire le décès précoce des patients IC afin d'améliorer la stratification des patients permettrait de diriger les patients ayant un risque de mortalité élevée vers des traitements plus invasifs, tels que la greffe cardiaque.

Une analyse de protéomique à haut débit, grâce à la technologie SOMAscan, a été réalisée dans le plasma des patients IC de l'étude INCA et a permis la quantification simultanée de 1310 protéines. Dans un 1^{er} temps, nous avons réalisé une classification des patients de l'étude INCA en fonction de l'expression des 1310 protéines et avons identifié 5 groupes de patients avec des profils protéiques différents. Cependant, ces 5 groupes n'étaient pas corrélés au devenir des patients, ni aux caractéristiques cliniques telles que le sexe, l'étiologie, le taux de BNP ou encore le stade NYHA. Récemment, il a été montré qu'il peut exister des « endotypes » de patients IC. En effet, Tromp et al. ont réalisé une classification de 1802 patients IC en fonction de 92 biomarqueurs cardiovasculaires et ont identifié 6 endotypes qui diffèrent en fonction de l'âge des patients, de la sévérité des symptômes, du risque de mortalité et de la réponse aux traitements (Tromp et al., 2018). Ces résultats permettraient d'améliorer les recommandations en matière de traitements des patients IC. Il sera par la suite nécessaire d'étudier de façon plus approfondie les caractéristiques cliniques des patients INCA afin de comprendre ce qui distingue les 5 groupes identifiés.

La classification des patients en fonction de leur profil protéique n'ayant pas permis l'identification de biomarqueurs, nous avons ensuite réalisé une analyse statistique des protéines dosées dans le plasma des patients de l'étude INCA, afin de sélectionner un petit nombre de protéines permettant de prédire le décès précoce des patients IC, en collaboration avec la plateforme Bilille. Nous avons sélectionné 6 protéines qui pourraient prédire le décès précoce des patients IC : complément C3, MAPKAPK5, cathepsine S, MMP-1, MMP-7 et FAM107B. Nous avons ensuite utilisé des dosages conventionnels pour quantifier C3, CTSS, MMP-1 et MMP-7 dans une sous-population de l'étude INCA, et avons obtenu des résultats concordants avec le *SOMAscan assay* pour C3, MMP-1 et MMP-7 (Cuvelliez et al., 2019 soumis). La technologie SOMAscan a déjà été utilisée pour identifier des biomarqueurs des maladies cardiovasculaires (Ngo et al., 2016) et du vieillissement (Tanaka et al., 2018). De façon intéressante, les 6 protéines identifiées dans notre étude n'ont pas été associées à l'âge. L'analyse de la centralité de ces 6 protéines dans le réseau INCA a permis d'étudier les mécanismes biologiques dans lesquels elles sont impliquées. En effet, 3 d'entre elles (C3, MAPKAPK5 et cathepsine S) ont une centralité élevée, suggérant un rôle important dans le développement de l'IC. De plus, les MMPs sont également connues comme étant impliquées

dans le remodelage de la matrice extracellulaire, mécanisme décrit dans le développement de l'IC.

Par la suite, il sera nécessaire de valider les 6 protéines sélectionnées par l'analyse statistique dans d'autres cohortes de patients IC. Il sera également intéressant d'étudier plus précisément les mécanismes dans lesquels elles sont impliquées.

4 Conclusion générale

L'analyse de la centralité et des modules actifs du réseau REVE-2 a donc permis la sélection de 6 molécules (EP300, ER α , miR-335-5p, miR-26b-5p, miR-375 et miR-17-5p). L'étude de ces 6 molécules dans le VG de notre modèle de rats IC permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le RVG, notamment le rôle de l'acétylation et des œstrogènes dans la régulation de ces mécanismes. Cette analyse a également permis l'identification de 4 microARNs comme potentiels biomarqueurs d'une évolution délétère suite à un IDM. Ces 4 microARNs devront être quantifiés dans le plasma des rats IC et dans le plasma des patients de l'étude REVE-2.

Une approche de protéomique à haut débit, le *SOMAscan assay*, a été utilisée pour mesurer 1310 protéines dans le plasma des patients IC de l'étude INCA, dans le but d'identifier des marqueurs permettant de prédire le décès précoce des patients IC. Une classification des patients en fonction de l'expression de ces 1310 protéines a permis d'identifier 5 groupes de patients ayant des profils protéiques différents. Une analyse plus approfondie des caractéristiques cliniques de ces patients pourrait permettre l'identification d'endotypes chez les patients IC. Enfin, une analyse statistique a permis la sélection de 6 protéines (C3, MAPKAPK5, CTSS, MMP-1, MMP-7 et FAM107B) qui pourraient prédire le décès précoce des patients IC. L'utilisation de ces 6 protéines permettrait d'améliorer la prise en charge des patients en fonction de leur risque de décès.

Bibliographie

A

- Allen-Rhoades, W., Kurenbekova, L., Satterfield, L., Parikh, N., Fuja, D., Shuck, R.L., Rainusso, N., Trucco, M., Barkauskas, D.A., Jo, E., Ahern, C., Hilsenbeck, S., Donehower, L.A., Yustein, J.T. Cross-species identification of a plasma microRNA signature for detection, therapeutic monitoring, and prognosis in osteosarcoma. *Cancer Med.* 2015. 4, 977–988. <https://doi.org/10.1002/cam4.438>
- Anderson, M.E., Brown, J.H., Bers, D.M. CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2011. 51, 468–473. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.01.012>
- Aouba, A., Eb, M., Rey, G., Pavillon, G., Jouglu, E. Données sur la mortalité en France: principales causes de décès en 2008 et évolutions depuis 2000. *Bull. Épidémiologique Hebd.* 2011. 22, 249–255.
- Arai, M., Alpert, N.R., MacLennan, D.H., Barton, P., Periasamy, M. Alterations in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure. A possible mechanism for alterations in systolic and diastolic properties of the failing myocardium. *Circ. Res.* 1993. 72, 463–9.
- Archan, S., Fleisher, L.A. From Creatine Kinase-MB to Troponin. *Anesthesiology* 2010. 112, 1005–1012. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181d31fa8>
- Arnal, J.-F., Lenfant, F., Metivier, R., Flouriot, G., Henrion, D., Adlanmerini, M., Fontaine, C., Gourdy, P., Chambon, P., Katzenellenbogen, B., Katzenellenbogen, J. Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications. *Physiol. Rev.* 2017. 97, 1045–1087. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2016>
- Ayers, D., Day, P.J. Systems Medicine: The Application of Systems Biology Approaches for Modern Medical Research and Drug Development. *Mol. Biol. Int.* 2015. 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/698169>
- Ayoub, K.F., Pothineni, N.V.K., Rutland, J., Ding, Z., Mehta, J.L. Immunity, Inflammation, and Oxidative Stress in Heart Failure: Emerging Molecular Targets. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2017. 31, 593–608. <https://doi.org/10.1007/s10557-017-6752-z>
- Azuaje, F.J., Dewey, F.E., Brutsaert, D.L., Devaux, Y., Ashley, E.A., Wagner, D.R. Systems-Based Approaches to Cardiovascular Biomarker Discovery. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2012. 5, 360–367. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.112.962977>

B

- Backs, J., Olson, E.N. Control of Cardiac Growth by Histone Acetylation/Deacetylation. *Circ. Res.* 2006. 98, 15–24. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000197782.21444.8f>
- Bang, C., Batkai, S., Dangwal, S., Gupta, S.K., Foinquinos, A., Holzmann, A., Just, A., Remke, J., Zimmer, K., Zeug, A., Ponimaskin, E., Schmiedl, A., Yin, X., Mayr, M., Halder, R., Fischer, A., Engelhardt, S., Wei, Y., Schober, A., Fiedler, J., Thum, T. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *J. Clin. Invest.* 2014. 124, 2136–2146. <https://doi.org/10.1172/JCI70577>
- Barabasi, Albert Emergence of scaling in random networks. *Science* 1999. 286, 509–12.
- Bartel, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004. 116, 281–97. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Bauters, C., Dubois, E., Porouchani, S., Saloux, E., Fertin, M., de Groote, P., Lamblin, N., Pinet, F. Long-term prognostic impact of left ventricular remodeling after a first

- myocardial infarction in modern clinical practice. *PLoS One* 2017. 12, e0188884. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188884>
- Bauters, C., Kumarswamy, R., Holzmann, A., Bretthauer, J., Anker, S.D., 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, 1837–1840. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.12.074>
- Bauters, C., Lamblin, N., Ennezat, P. V., Mycinski, C., Tricot, O., Nogue, O., Segrestin, B., Hannebicque, G., Agraou, B., Polge, A.S., de Groote, P., Helbecque, N., Amouyel, P. A prospective evaluation of left ventricular remodeling after inaugural anterior myocardial infarction as a function of gene polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone, adrenergic, and metalloproteinase systems. *Am. Heart J.* 2007. 153, 641–648. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2007.01.009>
- Bernardo, B.C., Weeks, K.L., Pretorius, L., McMullen, J.R. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol. Ther.* 2010. 128, 191–227. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.04.005>
- Bhatt, A.S., Ambrosy, A.P., Velazquez, E.J. Adverse Remodeling and Reverse Remodeling After Myocardial Infarction. *Curr. Cardiol. Rep.* 2017. 19, 71. <https://doi.org/10.1007/s11886-017-0876-4>
- Bindea, G., Galon, J., Mlecnik, B. CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics* 2013. 29, 661–663. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt019>
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W.-H., Pagès, F., Trajanoski, Z., Galon, J. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 2009. 25, 1091–1093. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp101>
- Boggs, R.M., Moody, J.A., Long, C.R., Tsai, K.L., Murphy, K.E. Identification, amplification and characterization of miR-17-92 from canine tissue. *Gene* 2007. 404, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.08.015>
- Braunwald, E. Biomarkers in heart failure. Preface. *Heart Fail. Clin.* 2009. 5, xiii–xiv. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2009.05.002>
- Brody, E.N., Gold, L., Lawn, R.M., Walker, J.J., Zichi, D. High-content affinity-based proteomics: unlocking protein biomarker discovery. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2010. 10, 1013–1022. <https://doi.org/10.1586/erm.10.89>
- Brutsaert, D.L. Cardiac Endothelial-Myocardial Signaling: Its Role in Cardiac Growth, Contractile Performance, and Rhythmicity. *Physiol. Rev.* 2003. 83, 59–115. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2002>
- Buggey, J., Mentz, R.J., DeVore, A.D., Velazquez, E.J. Angiotensin Receptor Neprilysin Inhibition in Heart Failure: Mechanistic Action and Clinical Impact. *J. Card. Fail.* 2015. 21, 741–750. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2015.07.008>

C

- Califf, R.M. Biomarker definitions and their applications. *Exp. Biol. Med.* 2018. 243, 213–221. <https://doi.org/10.1177/1535370217750088>
- Calvano, J., Edwards, G., Hixson, C., Burr, H., Mangipudy, R., Tirmenstein, M. Serum microRNAs-217 and -375 as biomarkers of acute pancreatic injury in rats. *Toxicology* 2016. 368–369, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.08.009>
- Candia, J., Cheung, F., Kotliarov, Y., Fantoni, G., Sellers, B., Griesman, T., Huang, J., Stuccio, S., Zingone, A., Ryan, B.M., Tsang, J.S., Biancotto, A. Assessment of

- Variability in the SOMAscan Assay. *Sci. Rep.* 2017. 7, 14248. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14755-5>
- Cao, L., Kong, L.-P., Yu, Z.-B., Han, S.-P., Bai, Y.-F., Zhu, J., Hu, X., Zhu, C., Zhu, S., Guo, X.-R. microRNA expression profiling of the developing mouse heart. *Int. J. Mol. Med.* 2012. 30, 1095–104. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1092>
- Cavasin, M.A., Sankey, S.S., Yu, A.-L., Menon, S., Yang, X.-P. Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 2003. 284, H1560–H1569. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01087.2002>
- Chan, S.Y., Loscalzo, J. The Emerging Paradigm of Network Medicine in the Study of Human Disease. *Circ. Res.* 2012. 111, 359–374. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.258541>
- Charrier, H., Cuvelliez, M., Dubois-Deruy, E., Mulder, P., Richard, V., Bauters, C., Pinet, F. Integrative System Biology Analyses Identify Seven MicroRNAs to Predict Heart Failure. *Non-Coding RNA* 2019. 5, 22. <https://doi.org/10.3390/ncrna5010022>
- Chen, B., Frangogiannis, N.G. Immune cells in repair of the infarcted myocardium. *Microcirculation* 2017. 24, e12305. <https://doi.org/10.1111/micc.12305>
- Chen, J., Huang, Z.-P., Seok, H.Y., Ding, J., Kataoka, M., Zhang, Z., Hu, X., Wang, G., Lin, Z., Wang, S., Pu, W.T., Liao, R., Wang, D.-Z. mir-17–92 Cluster Is Required for and Sufficient to Induce Cardiomyocyte Proliferation in Postnatal and Adult Hearts. *Circ. Res.* 2013. 112, 1557–1566. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.300658>
- Chen, J.Q., Delannoy, M., Cooke, C., Yager, J.D. Mitochondrial localization of ER and ER in human MCF7 cells. *Am. J. Physiol. Metab.* 2004. 286, E1011–E1022. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00508.2003>
- Cheng, X.W., Shi, G.-P., Kuzuya, M., Sasaki, T., Okumura, K., Murohara, T. Role for Cysteine Protease Cathepsins in Heart Disease. *Circulation* 2012. 125, 1551–1562. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.066712>
- Cieniewski-Bernard, C, Acosta, A., Dubois, E., Lamblin, N., Beseme, O., Chwastyniak, M., Amouyel, P., Bauters, C., Pinet, F. PROTEOMIC ANALYSIS IN CARDIOVASCULAR DISEASES. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2008. 35, 362–366. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.04878.x>
- Cieniewski-Bernard, Caroline, Mulder, P., Henry, J.-P., Drobecq, H., Dubois, E., Pottiez, G., Thuillez, C., Amouyel, P., Richard, V., Pinet, F. Proteomic Analysis of Left Ventricular Remodeling in an Experimental Model of Heart Failure. *J. Proteome Res.* 2008. 7, 5004–5016. <https://doi.org/10.1021/pr800409u>
- Cortez-Dias, N., Costa, M.C., Carrilho-Ferreira, P., Silva, D., Jorge, C., Calisto, C., Pessoa, T., Robalo Martins, S., de Sousa, J.C., da Silva, P.C., Fiúza, M., Diogo, A.N., Pinto, F.J., Enguita, F.J. Circulating miR-122-5p/miR-133b Ratio Is a Specific Early Prognostic Biomarker in Acute Myocardial Infarction. *Circ. J.* 2016. 80, 2183–2191. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-16-0568>
- Creemers, E.E., Tijssen, A.J., Pinto, Y.M. Circulating MicroRNAs. *Circ. Res.* 2012. 110, 483–495. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.247452>

D

- Da Costa Martins, P.A., De Windt, L.J. MicroRNAs in control of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 2012. 93, 563–572. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs013>
- 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, 1584–1589. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2003.11.059>
- Dedkov, E.I., Bogatyryov, Y., Pavliak, K., Santos, A.T., Chen, Y.-F., Zhang, Y., Pingitore, A. Sex-related differences in intrinsic myocardial properties influence cardiac function in middle-aged rats during infarction-induced left ventricular remodeling. *Physiol. Rep.* 2016. 4, e12822. <https://doi.org/10.14814/phy2.12822>
- DeLeon-Pennell, K.Y., Meschiari, C.A., Jung, M., Lindsey, M.L. Matrix Metalloproteinases in Myocardial Infarction and Heart Failure, in: *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017. . pp. 75–100. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.001>
- Doenst, T., Nguyen, T.D., Abel, E.D. Cardiac metabolism in heart failure: Implications beyond atp production. *Circ. Res.* 2013. 113, 709–724. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300376>
- Du, W., Pan, Z., Chen, X., Wang, L., Zhang, Y.Y., Li, S., Liang, H., Xu, C., Zhang, Y.Y., Wu, Y., Shan, H., Lu, Y. By targeting Stat3 microRNA-17-5p promotes cardiomyocyte apoptosis in response to ischemia followed by reperfusion. *Cell. Physiol. Biochem.* 2014. 34, 955–965. <https://doi.org/10.1159/000366312>
- Dubois-Deruy, E., Belliard, A., Mulder, P., Chwastyniak, M., Beseme, O., Henry, J.P., Thuillez, C., Amouyel, P., Richard, V., Pinet, F. Circulating plasma serine208-phosphorylated troponin T levels are indicator of cardiac dysfunction. *J. Cell. Mol. Med.* 2013. 17, 1335–1344. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12112>
- Dubois-Deruy, E., Cuvelliez, M., Fiedler, J., Charrier, H., Mulder, P., Hebbbar, E., Pfanne, A., Beseme, O., Chwastyniak, M., Amouyel, P., Richard, V., Bauters, C., Thum, T., Pinet, F. MicroRNAs regulating superoxide dismutase 2 are new circulating biomarkers of heart failure. *Sci. Rep.* 2017. 7, 14747. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15011-6>
- Dubois, E., Richard, V., Mulder, P., Lamblin, N., Drobecq, H., Henry, J.P., Amouyel, P., Thuillez, C., Bauters, C., Pinet, F. Decreased Serine207phosphorylation of troponin T as a biomarker for left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 2011. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq108>

E

- Eliasson, L. The small RNA miR-375 – a pancreatic islet abundant miRNA with multiple roles in endocrine beta cell function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2017. 456, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.02.043>
- Ertekin, S., Yıldırım, O., Dinç, E., Ayaz, L., Fidancı, S.B., Tamer, L. Evaluation of circulating miRNAs in wet age-related macular degeneration. *Mol. Vis.* 2014. 20, 1057–1066.

F

- Fang, L., Ellims, A.H., Moore, X. lei, White, D.A., Taylor, A.J., Chin-Dusting, J., Dart, A.M. Circulating microRNAs as biomarkers for diffuse myocardial fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Transl. Med.* 2015. 13, 314. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0672-0>
- Fertin, M., Hennache, B., Hamon, M., Ennezat, P. V., Biaisque, F., Elkohen, M., Nogue, O., Tricot, O., Lamblin, N., Pinet, F., Bauters, C. Usefulness of serial assessment of B-type natriuretic peptide, troponin I, and C-reactive protein to predict left ventricular remodeling after acute myocardial infarction (from the REVE-2 Study). *Am. J. Cardiol.* 2010. 106, 1410–1416. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2010.06.071>
- Frey, A., Ertl, G., Angermann, C.E., Hofmann, U., Störk, S., Frantz, S. Complement C3c as a

- Biomarker in Heart Failure. *Mediators Inflamm.* 2013. 2013, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/716902>
- Friedman, J., Hastie, T., Tibshirani, R. Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. *J. Stat. Softw.* 2010. 33, 1–20. <https://doi.org/10.18637/jss.v033.i01>

G

- Gabet, A., Danchin, N., Olié, V. Infarctus du myocarde chez la femme : évolution des taux d'hospitalisation et de mortalité, FRANCE , 2002-2013. *Bull. Épidémiologique Hebd.* 2016.
- Gajarsa, J.J., Kloner, R.A. Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: A review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities. *Heart Fail. Rev.* 2011. 16, 13–21. <https://doi.org/10.1007/s10741-010-9181-7>
- Ganz, P., Heidecker, B., Hveem, K., Jonasson, C., Kato, S., Segal, M.R., Sterling, D.G., Williams, S.A. Development and Validation of a Protein-Based Risk Score for Cardiovascular Outcomes Among Patients With Stable Coronary Heart Disease. *JAMA* 2016. 315, 2532–2541. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.5951>
- Gao, Y., Qi, G. xian, Guo, L., Sun, Y. xian Bioinformatics analyses of differentially expressed genes associated with acute myocardial infarction. *Cardiovasc. Ther.* 2016. 34, 67–75. <https://doi.org/10.1111/1755-5922.12171>
- Garikipati, V.N.S., Krishnamurthy, P., Verma, S.K., Khan, M., Abramova, T., Mackie, A.R., Qin, G., Benedict, C., Nickoloff, E., Johnson, J., Gao, E., Losordo, D.W., Houser, S.R., Koch, W.J., Kishore, R. Negative regulation of miR-375 by interleukin-10 enhances bone marrow derived progenitor cell-mediated myocardial repair and function after myocardial infarction. *Stem Cells* 2015. 33, 3519–3529. <https://doi.org/10.1007/s00261-015-0542-5>
- Gerits, N., Shiryaev, A., Kostenko, S., Klenow, H., Shiryaeva, O., Johannessen, M., Moens, U. The transcriptional regulation and cell-specific expression of the mapk-activated protein kinase MK5. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2009. 14, 548–574. <https://doi.org/10.2478/s11658-009-0020-6>
- Geyer, P.E., Holdt, L.M., Teupser, D., Mann, M. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Mol. Syst. Biol.* 2017. 13, 942. <https://doi.org/10.15252/msb.20156297>
- Gold, L., Ayers, D., Bertino, J., Bock, C., Bock, A., Brody, E.N., Carter, J., Dalby, A.B., Eaton, B.E., Fitzwater, T., Flather, D., Forbes, A., Foreman, T., Fowler, C., Gawande, B., Goss, M., Gunn, M., Gupta, S., Halladay, D., Heil, J., Heilig, J., Hicke, B., Husar, G., Janjic, N., Jarvis, T., Jennings, S., Katilius, E., Keeney, T.R., Kim, N., Koch, T.H., Kraemer, S., Kroiss, L., Le, N., Levine, D., Lindsey, W., Lollo, B., Mayfield, W., Mehan, M., Mehler, R., Nelson, S.K., Nelson, M., Nieuwlandt, D., Nikrad, M., Ochsner, U., Ostroff, R.M., Otis, M., Parker, T., Pietrasiewicz, S., Resnicow, D.I., Rohloff, J., Sanders, G., Sattin, S., Schneider, D., Singer, B., Stanton, M., Sterkel, A., Stewart, A., Stratford, S., Vaught, J.D., Vrkljan, M., Walker, J.J., Watrobka, M., Waugh, S., Weiss, A., Wilcox, S.K., Wolfson, A., Wolk, S.K., Zhang, C., Zichi, D. Aptamer-Based Multiplexed Proteomic Technology for Biomarker Discovery. *PLoS One* 2010. 5, e15004. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015004>
- Gombos, T., Föhrhéc, Z., Pozsonyi, Z., Széplaki, G., Kunde, J., Füst, G., Jánoskúti, L., Karádi, I., Prohászka, Z. Complement anaphylatoxin C3a as a novel independent prognostic marker in heart failure. *Clin. Res. Cardiol.* 2012. 101, 607–615. <https://doi.org/10.1007/s00392-012-0432-6>
- Granzier, H., Labeit, S. Cardiac titin: an adjustable multi-functional spring. *J. Physiol.* 2002.

- 541, 335–342. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.014381>
- Greco, S., De Simone, M., Colussi, C., Zaccagnini, G., Fasanaro, P., Pescatori, M., Cardani, R., Perbellini, R., Isaia, E., Sale, P., Meola, G., Capogrossi, M.C., Gaetano, C., Martelli, F. Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. *FASEB J.* 2009. 23, 3335–3346. <https://doi.org/10.1096/fj.08-128579>
- Grohé, C., Kahlert, S., Löbber, K., Stimpel, M., Karas, R.H., Vetter, H., Neyses, L. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett.* 1997. 416, 107–112. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01179-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01179-4)
- Gu, H., Liu, Z., Zhou, L. Roles of miR-17-92 cluster in cardiovascular development and common diseases. *Biomed Res. Int.* 2017. 2017, 9102909. <https://doi.org/10.1155/2017/9102909>
- Gusterson, R.J., Jazrawi, E., Adcock, I.M., Latchman, D.S. The transcriptional co-activators CREB-binding protein (CBP) and p300 play a critical role in cardiac hypertrophy that is dependent on their histone acetyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* 2003. 278, 6838–6847. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211762200>

H

- Han, M., Yang, Z., Sayed, D., He, M., Gao, S., Lin, L., Yoon, S., Abdellatif, M. GATA4 expression is primarily regulated via a miR-26b-dependent post-transcriptional mechanism during cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 2012. 93, 645–654. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs001>
- Han, P., Li, W., Lin, C.H., Yang, J., Shang, C., Nurnberg, S.T., Jin, K.K., Xu, W., Lin, C.Y., Lin, C.J., Xiong, Y., Chien, H.C., Zhou, B., Ashley, E., Bernstein, D., Chen, P.S., Chen, H.S.V., Quertermous, T., Chang, C.P. A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy. *Nature* 2014. 514, 102–106. <https://doi.org/10.1038/nature13596>
- Herzog, R., Zendedel, A., Lammerding, L., Beyer, C., Slowik, A., Zendedel, A., Lammerding, L., Beyer, C., Slowik, A. Impact of 17beta-estradiol and progesterone on inflammatory and apoptotic microRNA expression after ischemia in a rat model. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2017. 167, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.11.018>
- Hobuß, L., Bär, C., Thum, T. Long Non-coding RNAs: At the Heart of Cardiac Dysfunction? *Front. Physiol.* 2019. 10, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00030>
- Hoerl, A.E., Kennard, R.W. Ridge Regression: Biased Estimation for Nonorthogonal Problems. *Technometrics* 1970. 12, 55–67. <https://doi.org/10.1080/00401706.1970.10488634>

I

- Icli, B., Dorbala, P., Feinberg, M.W. An emerging role for the miR-26 family in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc. Med.* 2014. 24, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2014.06.003>

J

- Jacob, J., Ngo, D., Finkel, N., Pitts, R., Gleim, S., Benson, M.D., Keyes, M.J., Farrell, L.A., Morgan, T., Jennings, L.L., Gerszten, R.E. Application of Large-Scale Aptamer-Based

- Proteomic Profiling to Planned Myocardial Infarctions. *Circulation* 2018. 137, 1270–1277. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029443>
- Jakob, P., Kacprowski, T., Briand-Schumacher, S., Heg, D., Klingenberg, R., Stahl, B.E., Jaguszewski, M., Rodondi, N., Nanchen, D., Raber, L., Vogt, P., Mach, F., Windecker, S., Volker, U., Matter, C.M., Lüscher, T.F., Landmesser, U. Profiling and validation of circulating microRNAs for cardiovascular events in patients presenting with ST-segment elevation myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 2017. 38, 511–515. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw563>
- Jiao, M., You, H.-Z., Yang, X.-Y., Yuan, H., Li, Y.-L., Liu, W.-X., Jin, M., Du, J. Circulating microRNA signature for the diagnosis of childhood dilated cardiomyopathy. *Sci. Rep.* 2018. 8, 724. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-19138-4>
- Jinawath, N., Bunbanjerdasuk, S., Chayanupatkul, M., Ngamphaiboon, N., Asavapanumas, N., Svasti, J., Charoensawan, V. Bridging the gap between clinicians and systems biologists: from network biology to translational biomedical research. *J. Transl. Med.* 2016. 14, 324. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1078-3>

K

- Kang, J.H., Lee, H.-S.S., Park, D., Kang, Y.-W.W., Kim, S.M., Gong, J.-R.R., Cho, K.-H.H. Context-independent essential regulatory interactions for apoptosis and hypertrophy in the cardiac signaling network. *Sci. Rep.* 2017. 7, 34. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00086-y>
- Kim, C.H., Tworoger, S.S., Stampfer, M.J., Dillon, S.T., Gu, X., Sawyer, S.J., Chan, A.T., Libermann, T.A., Eliassen, A.H. Stability and reproducibility of proteomic profiles measured with an aptamer-based platform. *Sci. Rep.* 2018. 8, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26640-w>
- Kim, T.T., Dyck, J.R.B. Is AMPK the savior of the failing heart? *Trends Endocrinol. Metab.* 2015. 26, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.11.001>
- Kocijan, R., Muschitz, C., Geiger, E., Skalicky, S., Baierl, A., Dormann, R., Plachel, F., Feichtinger, X., Heimel, P., Fahrleitner-Pammer, A., Grillari, J., Redl, H., Resch, H., Hackl, M. Circulating microRNA signatures in patients with idiopathic and postmenopausal osteoporosis and fragility fractures. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2016. 101, 4125–4134. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-2365>
- Kontaraki, J.E., Marketou, M.E., Parthenakis, F.I., Maragkoudakis, S., Zacharis, E.A., Petousis, S., Kochiadakis, G.E., Vardas, P.E. Hypertrophic and antihypertrophic microRNA levels in peripheral blood mononuclear cells and their relationship to left ventricular hypertrophy in patients with essential hypertension. *J. Am. Soc. Hypertens.* 2015. 9, 802–810. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2015.07.013>
- Krenz, M., Robbins, J. Impact of beta-myosin heavy chain expression on cardiac function during stress. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004. 44, 2390–2397. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.09.044>
- Kumar, P., Wu, Q., Chambliss, K.L., Yuhanna, I.S., Mumby, S.M., Mineo, C., Tall, G.G., Shaul, P.W. Direct interactions with G_i and G₁₂ mediate nongenomic signaling by Estrogen Receptor. *Mol. Endocrinol.* 2007. 21, 1370–1380. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0360>
- 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, 1569–1575. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.303915>
- Kumarswamy, R., Thum, T. Non-coding RNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Circ.*

- Res. 2013. 113, 676–689. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300226>
- Kuno, A., Hori, Y.S., Hosoda, R., Tanno, M., Miura, T., Shimamoto, K., Horio, Y. Resveratrol improves cardiomyopathy in dystrophin-deficient mice through sirt1 protein-mediated modulation of p300 protein. *J. Biol. Chem.* 2013. 288, 5963–5972. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.392050>
- Kuno, A., Tanno, M., Horio, Y. The effects of resveratrol and SIRT1 activation on dystrophic cardiomyopathy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2015. 1348, 46–54. <https://doi.org/10.1111/nyas.12812>
- Kuosmanen, S.M., Hartikainen, J., Hippelainen, M., Kokki, H., Levonen, A.L., Tavi, P. MicroRNA profiling of pericardial fluid samples from patients with heart failure. *PLoS One* 2015. 10, e0119646. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119646>

L

- Lemesle, G., Maury, F., Beseme, O., Ouart, 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* 2015. 10, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119265>
- Li, X., Liu, Z., Cheng, Z., Cheng, X. Cysteinyln Cathepsins: Multifunctional Enzymes in Cardiovascular Disease. *Chonnam Med. J.* 2012. 48, 77–85. <https://doi.org/10.4068/cmj.2012.48.2.77>
- Lim, S.Y., Lee, J.H., Welsh, S.J., Ahn, S.B., Breen, E., Khan, A., Carlino, M.S., Menzies, A.M., Kefford, R.F., Scolyer, R.A., Long, G. V., Rizos, H. Evaluation of two high-throughput proteomic technologies for plasma biomarker discovery in immunotherapy-treated melanoma patients. *Biomark. Res.* 2017. 5, 32. <https://doi.org/10.1186/s40364-017-0112-9>
- Liu, S., Iskandar, R., Chen, W., Zhang, J., Wang, Y., Chen, X., Xiang, F. Soluble Glycoprotein 130 and Heat Shock Protein 27 as Novel Candidate Biomarkers of Chronic Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Hear. Lung Circ.* 2016. 25, 1000–1006. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2016.02.011>
- Liu, X., Meng, H., Jiang, C., Yang, S., Cui, F., Yang, P. Differential microRNA Expression and Regulation in the Rat Model of Post-Infarction Heart Failure. *PLoS One* 2016. 11, e0160920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160920>
- Liu, Z.Z., Gou, Y., Zhang, H.H., Zuo, H., Zhang, H.H., Liu, Z.Z., Yao, D. Estradiol improves cardiovascular function through up-regulation of SOD2 on vascular wall. *Redox Biol.* 2014. 3, 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.11.001>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- CT method. *Methods* 2001. 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lopaschuk, G.D. Metabolic Modulators in Heart Disease: Past, Present, and Future. *Can. J. Cardiol.* 2017. 33, 838–849. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2016.12.013>
- Lu, Y., Thomson, J.M., Yuen, H., Wang, F., Hammond, S.M., Hogan, B.L.M.M., Wang, H.Y.F., Hammond, S.M., Hogan, B.L.M.M. Transgenic over-expression of the microRNA miR-17-92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells. *Dev. Biol.* 2007. 310, 442–453. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11602-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11602-3). Association
- Lundby, A., Lage, K., Weinert, B.T., Bekker-Jensen, D.B., Secher, A., Skovgaard, T., Kelstrup, C.D., Dmytriiev, A., Choudhary, C., Lundby, C., Olsen, J. V. Proteomic Analysis of Lysine Acetylation Sites in Rat Tissues Reveals Organ Specificity and Subcellular Patterns. *Cell Rep.* 2012. 2, 419–431.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.07.006>

Luo, X.X.-Y., Pan, Z., Shan, H., Xiao, J., Sun, X., Wang, N., Lin, H., Xiao, L., Maguy, A., Qi, X.-Y., Li, Y., Gao, X., Dong, D., Zhang, Y., Bai, Y., Ai, J., Sun, L., Lu, H., Luo, X.X.-Y., Wang, Z., Lu, Y., Yang, B., Nattel, S. MicroRNA-26 governs profibrillatory inward-rectifier potassium current changes in atrial fibrillation. *J. Clin. Invest.* 2013. 123, 1939–1951. <https://doi.org/10.1172/JCI62185DS1>

M

- Ma'ayan, A. Introduction to network analysis in systems biology. *Sci. Signal.* 2011. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001965>
- Madamanchi, C., Alhosaini, H., Sumida, A., Runge, M.S. Obesity and natriuretic peptides, BNP and NT-proBNP: Mechanisms and diagnostic implications for heart failure. *Int. J. Cardiol.* 2014. 176, 611–617. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.08.007>
- Maggioni, A.P., Dahlström, U., Filippatos, G., Chioncel, O., Leiro, M.C., Drozd, J., Fruhwald, F., Gullestad, L., Logeart, D., Fabbri, G., Urso, R., Metra, M., Parissis, J., Persson, H., Ponikowski, P., Rauchhaus, M., Voors, A.A., Nielsen, O.W., Zannad, F., Tavazzi, L. EUR Observational Research Programme: regional differences and 1-year follow-up results of the Heart Failure Pilot Survey (ESC-HF Pilot). *Eur. J. Heart Fail.* 2013. 15, 808–817. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hft050>
- Magnussen, C., Niiranen, T.J., Ojeda, F.M., Gianfagna, F., Blankenberg, S., Vartiainen, E., Sans, S., Pasterkamp, G., Hughes, M., Costanzo, S., Donati, M.B., Jousilahti, P., Linneberg, A., Palosaari, T., de Gaetano, G., Bobak, M., den Ruijter, H.M., Jørgensen, T., Söderberg, S., Kuulasmaa, K., Zeller, T., Iacoviello, L., Salomaa, V., Schnabel, R.B. Sex-Specific Epidemiology of Heart Failure Risk and Mortality in Europe. *JACC Hear. Fail.* 2019. 7, 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.jchf.2018.08.008>
- Maisel, A., Mueller, C., Adams, K., Anker, S.D., Aspromonte, N., Cleland, J.G.F., Cohen-Solal, A., Dahlstrom, U., DeMaria, A., Di Somma, S., Filippatos, G.S., Fonarow, G.C., Jourdain, P., Komajda, M., Liu, P.P., McDonagh, T., McDonald, K., Mebazaa, A., Nieminen, M.S., Peacock, W.F., Tubaro, M., Valle, R., Vanderhyden, M., Yancy, C.W., Zannad, F., Braunwald, E. State of the art: Using natriuretic peptide levels in clinical practice. *Eur. J. Heart Fail.* 2008. 10, 824–839. <https://doi.org/10.1016/j.ejheart.2008.07.014>
- Malekar, P., Hagenmueller, M., Anyanwu, A., Buss, S., Streit, M.R., Weiss, C.S., Wolf, D., Riffel, J., Bauer, A., Katus, H.A., Hardt, S.E. Wnt signaling is critical for maladaptive cardiac hypertrophy and accelerates myocardial remodeling. *Hypertension* 2010. 55, 939–945. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.141127>
- Marfella, R., Di Filippo, C., Potenza, N., Sardu, C., Rizzo, M.R., Siniscalchi, M., Musacchio, E., Barbieri, M., Mauro, C., Mosca, N., Solimene, F., Mottola, M.T., Russo, A., Rossi, F., Paolisso, G., D'Amico, M. Circulating microRNA changes in heart failure patients treated with cardiac resynchronization therapy: responders vs. non-responders. *Eur. J. Heart Fail.* 2013. 15, 1277–1288. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hft088>
- Marín-García, J. Cell death in the pathogenesis and progression of heart failure. *Heart Fail. Rev.* 2016. 21, 117–121. <https://doi.org/10.1007/s10741-016-9538-7>
- Marques, F.Z., Vizi, D., Khammy, O., Mariani, J.A., Kaye, D.M. The transcadiac gradient of cardio-microRNAs in the failing heart. *Eur. J. Heart Fail.* 2016. 18, 1000–1008. <https://doi.org/10.1002/ejhf.517>
- Martinelli, N.C., Cohen, C.R., Santos, K.G., Castro, M.A., Biolo, A., Frick, L., Silvello, D., Lopes, A., Schneider, S., Andrades, M.E., Clausell, N., Matte, U., Rohde, L.E. An analysis of the global expression of microRNAs in an experimental model of

- physiological left ventricular hypertrophy. *PLoS One* 2014. 9, e93271. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093271>
- Menche, J., Sharma, A., Kitsak, M., Ghiassian, S.D., Vidal, M., Loscalzo, J., Barabási, A.L. Uncovering disease-disease relationships through the incomplete interactome. *Science* (80-.). 2015. <https://doi.org/10.1126/science.1257601>
- Mendis, S., Thygesen, K., Kuulasmaa, K., Giampaoli, S., Mahonen, M., Blackett, K.N., Lisheng, L. World Health Organization definition of myocardial infarction: 2008-09 revision. *Int. J. Epidemiol.* 2011. 40, 139–146. <https://doi.org/10.1093/ije/dyq165>
- Meyer, S.U., Sass, S., Mueller, N.S., Krebs, S., Bauersachs, S., Kaiser, S., Blum, H., Thirion, C., Krause, S., Theis, F.J., Pfaffl, M.W. Integrative analysis of microRNA and mRNA data reveals an orchestrated function of micrornas in skeletal myocyte differentiation in response to TNF- or IGF1. *PLoS One* 2015. 10, e0135284. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135284>
- Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanian, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., Lin, D.W., Urban, N., Drescher, C.W., Knudsen, B.S., Stirewalt, D.L., Gentleman, R., Vessella, R.L., Nelson, P.S., Martin, D.B., Tewari, M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008. 105, 10513–10518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105>
- Mitra, K., Carvunis, A.A.R., Ramesh, S.S.K., Ideker, T. Integrative approaches for finding modular structure in biological networks. *Nat. Rev. Genet.* 2013. 14, 719–732. <https://doi.org/10.1038/nrg3552>. Integrative
- Miyamoto, S., Kawamura, T., Morimoto, T., Ono, K., Wada, H., Kawase, Y., Matsumori, A., Nishio, R., Kita, T., Hasegawa, K. Histone Acetyltransferase Activity of p300 Is Required for the Promotion of Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction in Adult Mice In Vivo. *Circulation* 2006. 113, 679–690. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.585182>
- Mohr, A., Mott, J. Overview of MicroRNA Biology. *Semin. Liver Dis.* 2015. 35, 003–011. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1397344>
- Molitoris, J.K., McColl, K.S., Distelhorst, C.W. Glucocorticoid-mediated repression of the oncogenic microRNA cluster miR-17-92 contributes to the induction of Bim and initiation of apoptosis. *Mol. Endocrinol.* 2011. 25, 409–420. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0402>
- Mulder, P., Devaux, B., Richard, V., Henry, J., Wimart, M., Thibout, E., Mace, B., Thuillez, C. Early Versus Delayed Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition in Experimental Chronic Heart Failure. Effects on Survival, Hemodynamics, and Cardiovascular Remodeling. *Circulation* 1997. 95, 1314–1319.
- Münzel, T., Gori, T., Keane, J.F., Maack, C., Daiber, A. Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications. *Eur. Heart J.* 2015. 36, 2555–2564. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv305>

N

- Nakajima, H., Koizumi, K. Family with sequence similarity 107: A family of stress responsive small proteins with diverse functions in cancer and the nervous system (Review). *Biomed. Reports* 2014. 2, 321–325. <https://doi.org/10.3892/br.2014.243>
- Ngo, D., Sinha, S., Shen, D., Kuhn, E.W., Keyes, M.J., Shi, X., Benson, M.D., O'Sullivan, J.F., Keshishian, H., Farrell, L.A., Fifer, M.A., Vasan, R.S., Sabatine, M.S., Larson, M.G., Carr, S.A., Wang, T.J., Gerszten, R.E. Aptamer-Based Proteomic Profiling

- Reveals Novel Candidate Biomarkers and Pathways in Cardiovascular Disease. *Circulation* 2016. 134, 270–285. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.021803>
- Nguyen, N.T., Zhang, X., Wu, C., Lange, R.A., Chilton, R.J., Lindsey, M.L., Jin, Y.F. Integrative computational and experimental approaches to establish a post-myocardial infarction knowledge map. *PLoS Comput. Biol.* 2014. 10, e1003472. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003472>
- Noh, J.H., Kim, K.M., McClusky, W.G., Abdelmohsen, K., Gorospe, M. Cytoplasmic functions of long noncoding RNAs. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2018. 9, 1–15. <https://doi.org/10.1002/wrna.1471>

O

- Olive, V., Bennett, M.J., Walker, J.C., Ma, C., Jiang, I., Cordon-Cardo, C., Li, Q.J., Lowe, S.W., Hannon, G.J., He, L. miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev.* 2009. 23, 2839–2849. <https://doi.org/10.1101/gad.1861409>
- Ounzain, S., Crippa, S., Pedrazzini, T. Small and long non-coding RNAs in cardiac homeostasis and regeneration. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2013. 1833, 923–933. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2012.08.010>
- Ovchinnikova, E.S.E.S., Schmitter, D., Vegter, E.L.E.L., Ter Maaten, J.M.J.M., Valente, M.A.E.M.A.E., Liu, L.C.Y.L.C.Y., Van Der Harst, P., Pinto, Y.M.Y.M., De Boer, R.A.R.A., Meyer, S., Teerlink, J.R.J.R., O'Connor, C.M.C.M., Metra, M., Davison, B.A.B.A., Bloomfield, D.M.D.M., Cotter, G., Cleland, J.G.J.G., Mebazaa, A., Laribi, S., Givertz, M.M.M.M., Ponikowski, P., Van Der Meer, P., Van Veldhuisen, D.J.D.J., Voors, A.A.A., Berezikov, E. Signature of circulating microRNAs in patients with acute heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 2016. 18, 414–423. <https://doi.org/10.1002/ejhf.332>

P

- Pahnke, A., Conant, G., Huyer, L.D., Zhao, Y., Feric, N., Radisic, M., Chemistry, A. The role of Wnt regulation in heart development, cardiac repair and disease: a tissue engineering perspective. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016. 473, 698–703. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.060>
- Park, K.C., Gaze, D.C., Collinson, P.O., Marber, M.S. Cardiac troponins: From myocardial infarction to chronic disease. *Cardiovasc. Res.* 2017. 113, 1708–1718. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx183>
- Perbellini, R., Greco, S., Sarra-Ferraris, G., Cardani, R., Capogrossi, M.C., Meola, G., Martelli, F. Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul. Disord.* 2011. 21, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.11.012>
- Pigati, L., Yaddanapudi, S.C.S.S., Iyengar, R., Kim, D.-J.J., Hearn, S.A., Danforth, D., Hastings, M.L., Duelli, D.M. Selective Release of MicroRNA Species from Normal and Malignant Mammary Epithelial Cells. *PLoS One* 2010. 5, e13515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013515>
- Pinet, F., Cuvelliez, M., Kelder, T., Amouyel, P., Radonjic, M., Bauters, C. Integrative network analysis reveals time-dependent molecular events underlying left ventricular remodeling in post-myocardial infarction patients. *Biochim. Biophys. Acta* 2017. 1863, 1445–1453. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.02.001>
- Piran, M.M., Enderami, S.E., Piran, M.M., Sedeh, H.S., Seyedjafari, E., Ardeshtyrlajimi, A.

- Insulin producing cells generation by overexpression of miR-375 in adipose-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients. *Biologicals* 2017. 46, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.12.004>
- Pollard, T.D. Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2016. 8, a018226. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018226>
- Ponikowski, P., Voors, A.A., Anker, S.D., Bueno, H., Cleland, J.G.F., Coats, A.J.S., Falk, V., González-Juanatey, J.R., Harjola, V.-P., Jankowska, E.A., Jessup, M., Linde, C., Nihoyannopoulos, P., Parissis, J.T., Pieske, B., Riley, J.P., Rosano, G.M.C., Ruilope, L.M., Ruschitzka, F., Rutten, F.H., van der Meer, P. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur. Heart J.* 2016. 37, 2129–2200. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw128>
- Poulter, N. Global risk of cardiovascular disease. *Heart* 2003. 89 Suppl 2, ii2-5; discussion ii35-7. https://doi.org/10.1136/heart.89.suppl_2.ii2
- Poy, M.N., Hausser, J., Trajkovski, M., Braun, M., Collins, S., Rorsman, P., Zavolan, M., Stoffel, M. miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009. 106, 5813–5818. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810550106>
- Prabhu, S.D., Frangogiannis, N.G. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction. *Circ. Res.* 2016. 119, 91–112. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303577>
- Pugach, E.K., Blenck, C.L., Dragavon, J.M., Langer, S.J., Leinwand, L.A. Estrogen receptor profiling and activity in cardiac myocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2016. 431, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.05.004>
- Puzianowska-Kuznicka, M. ESR1 in myocardial infarction. *Clin. Chim. Acta* 2012. 413, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.10.028>

Q

- Qian, C., Chang, D., Li, H., Wang, Y. Identification of potentially critical genes in the development of heart failure after ST segment elevation myocardial infarction (STEMI). *J. Cell. Biochem.* 2019. 120, 7771–7777. <https://doi.org/10.1002/jcb.28051>

R

- Rao, E., Jiang, C., Ji, M., Huang, X., Iqbal, J., Lenz, G., Wright, G., Staudt, L.M., Zhao, Y., McKeithan, T.W., Chan, W.C., Fu, K. The miRNA-17~92 cluster mediates chemoresistance and enhances tumor growth in mantle cell lymphoma via PI3K/AKT pathway activation. *Leukemia* 2012. 26, 1064–1072. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.305>
- Rao, P.K., Toyama, Y., Chiang, H.R., Gupta, S., Bauer, M., Medvid, R., Reinhardt, F., Liao, R., Krieger, M., Jaenisch, R., Lodish, H.F., Blelloch, R. Loss of cardiac microRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ. Res.* 2009. 105, 585–594. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.200451.Loss>
- Reddy, K. Recent advances in the diagnosis and treatment of acute myocardial infarction. *World J. Cardiol.* 2015. 7, 243. <https://doi.org/10.4330/wjc.v7.i5.243>
- Ryall, K.A., Holland, D.O., Delaney, K.A., Kraeutler, M.J., Parker, A.J., Saucerman, J.J. Network reconstruction and systems analysis of cardiac myocyte hypertrophy signaling. *J. Biol. Chem.* 2012. 287, 42259–42268. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.382937>

S

- Sahadevan, P., Allen, B.G. MK5: A novel regulator of cardiac fibroblast function? *IUBMB Life* 2017. 69, 785–794. <https://doi.org/10.1002/iub.1677>
- Saks, V.A., Belikova, Y.O., Kuznetsov, A. V. In vivo regulation of mitochondrial respiration in cardiomyocytes: specific restrictions for intracellular diffusion of ADP. *BBA - Gen. Subj.* 1991. 1074, 302–311. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(91\)90168-G](https://doi.org/10.1016/0304-4165(91)90168-G)
- Savoie, C., Equine, O., Tricot, O., Nugue, O., Segrestin, B., Sautière, K., Elkohen, M., Pretorian, E.M., Taghipour, K., Philias, A., Aumégeat, V., Decoulx, E., Ennezat, P. V., Bauters, C. Left Ventricular Remodeling After Anterior Wall Acute Myocardial Infarction in Modern Clinical Practice (from the REmodelage VENTriculaire [REVE] Study Group). *Am. J. Cardiol.* 2006. 98, 1144–1149. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2006.06.011>
- Shi, J., Wei, L. Regulation of JAK/STAT signalling by SOCS in the myocardium. *Cardiovasc. Res.* 2012. 96, 345–347. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs321>
- Shikama, N., Lutz, W., Kretzschmar, R., Sauter, N., Roth, J.-F.F., Marino, S., Wittwer, J., Scheidweiler, A., Eckner, R. Essential function of p300 acetyltransferase activity in heart, lung and small intestine formation. *EMBO J.* 2003. 22, 5175–85. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg502>
- Simpson, E.R.R. Sources of estrogen and their importance. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2003. 86, 225–230. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00360-1](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00360-1)
- Slepek, T.I., Webster, K.A., Zang, J., Prentice, H., O'Dowd, A., Hicks, M.N., Bishopric, N.H. Control of Cardiac-specific Transcription by p300 through Myocyte Enhancer Factor-2D. *J. Biol. Chem.* 2001. 276, 7575–7585. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004625200>
- Spinale, F.G. Myocardial Matrix Remodeling and the Matrix Metalloproteinases: Influence on Cardiac Form and Function. *Physiol. Rev.* 2007. 87, 1285–1342. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2007>
- Spinale, F.G. The extracellular matrix: Summation. *J. Card. Fail.* 2002. 8, 349–350. <https://doi.org/10.1054/jcaf.2002.129257>
- St John Sutton, M.G., Sharpe, N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction pathophysiology and therapy. *Circulation* 2000. 101, 2981–2988. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.25.2981>
- Stirone, C., Duckles, S.P.S., Krause, D.D.N., Procaccio, V. Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Mol. Pharmacol.* 2005. 68, 959–965. <https://doi.org/10.1124/mol.105.014662.Recent>
- Sun, Q., Hao, Q., Prasanth, K. V. Nuclear Long Noncoding RNAs: Key Regulators of Gene Expression. *Trends Genet.* 2018. 34, 142–157. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.11.005>
- Suppers, A., van Gool, A., Wessels, H. Integrated Chemometrics and Statistics to Drive Successful Proteomics Biomarker Discovery. *Proteomes* 2018. 6, 20. <https://doi.org/10.3390/proteomes6020020>
- Sweeney, H.L., Hammers, D.W. Muscle Contraction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2018. 10, a023200. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023200>
- Sweeney, H.L., Holzbaur, E.L.F. Motor Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2018. 10, a021931. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021931>

T

- Taegtmeyer, H., Sen, S., Vela, D. Return to the fetal gene program. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2010. 1188, 191–198. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05100.x>

- Takakura, S., Mitsutake, N., Nakashima, M., Namba, H., Saenko, V.A., Rogounovitch, T.I., Nakazawa, Y., Hayashi, T., Ohtsuru, A., Yamashita, S. Oncogenic role of miR-17-92 cluster in anaplastic thyroid cancer cells. *Cancer Sci.* 2008. 99, 1147–1154. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00800.x>
- Tanaka, T., Biancotto, A., Moaddel, R., Moore, A.Z., Gonzalez-Freire, M., Aon, M.A., Candia, J., Zhang, P., Cheung, F., Fantoni, G., Semba, R.D., Ferrucci, L. Plasma proteomic signature of age in healthy humans. *Aging Cell* 2018. 17, 1–13. <https://doi.org/10.1111/acer.12799>
- Tanno, M., Kuno, A., Yano, T., Miura, T., Hisahara, S., Ishikawa, S., Shimamoto, K., Horio, Y. Induction of Manganese Superoxide Dismutase by Nuclear Translocation and Activation of SIRT1 Promotes Cell Survival in Chronic Heart Failure. *J. Biol. Chem.* 2010. 285, 8375–8382. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.090266>
- Tannous, P., Zhu, H., Nemchenko, A., Berry, J.M., Johnstone, J.L., Shelton, J.M., Miller, F.J., Rothermel, B.A., Hill, J.A. Intracellular Protein Aggregation Is a Proximal Trigger of Cardiomyocyte Autophagy. *Circulation* 2008. 117, 3070–3078. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.763870>
- Tao, H., Yang, J.J., Shi, K.H., Li, J. Wnt signaling pathway in cardiac fibrosis: New insights and directions. *Metabolism* 2016. 65, 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.10.013>
- Tham, Y.K., Bernardo, B.C., Ooi, J.Y.Y., Weeks, K.L., McMullen, J.R. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch. Toxicol.* 2015. 89, 1401–1438. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1477-x>
- Thygesen, K., Alpert, J.S., Jaffe, A.S., Chaitman, B.R., Bax, J.J., Morrow, D.A., White, H.D., Thygesen, K., Alpert, J.S., Jaffe, A.S., Chaitman, B.R., Bax, J.J., Morrow, D.A., White, H.D., Mickley, H., Crea, F., Van de Werf, F., Bucciarelli-Ducci, C., Katus, H.A., Pinto, F.J., Antman, E.M., Hamm, C.W., De Caterina, R., Januzzi, J.L., Apple, F.S., Alonso Garcia, M.A., Underwood, S.R., Canty, J.M., Lyon, A.R., Devereaux, P.J., Zamorano, J.L., Lindahl, B., Weintraub, W.S., Newby, L.K., Virmani, R., Vranckx, P., Cutlip, D., Gibbons, R.J., Smith, S.C., Atar, D., Luepker, R. V, Robertson, R.M., Bonow, R.O., Steg, P.G., O’Gara, P.T., Fox, K.A.A., Hasdai, D., Aboyans, V., Achenbach, S., Agewall, S., Alexander, T., Avezum, A., Barbato, E., Bassand, J.-P., Bates, E., Bittl, J.A., Breithardt, G., Bueno, H., Bugiardini, R., Cohen, M.G., Dangas, G., de Lemos, J.A., Delgado, V., Filippatos, G., Fry, E., Granger, C.B., Halvorsen, S., Hlatky, M.A., Ibanez, B., James, S., Kastrati, A., Leclercq, C., Mahaffey, K.W., Mehta, L., Müller, C., Patrono, C., Piepoli, M.F., Piñeiro, D., Roffi, M., Rubboli, A., Sharma, S., Simpson, I.A., Tenders, M., Valgimigli, M., van der Wal, A.C., Windecker, S., Chettibi, M., Hayrapetyan, H., Roithinger, F.X., Aliyev, F., Sujayeva, V., Claeys, M.J., Smaji, E., Kala, P., Iversen, K.K., El Hefny, E., Marandi, T., Porela, P., Antov, S., Gilard, M., Blankenberg, S., Davlouros, P., Gudnason, T., Alcalai, R., Colivicchi, F., Elezi, S., Baitova, G., Zakke, I., Gustiene, O., Beissel, J., Dingli, P., Grosu, A., Damman, P., Juliebø, V., Legutko, J., Morais, J., Tatu-Chitoiu, G., Yakovlev, A., Zavatta, M., Nedeljkovic, M., Radsel, P., Sionis, A., Jemberg, T., Müller, C., Abid, L., Abaci, A., Parkhomenko, A., Corbett, S. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur. Heart J.* 2019. 40, 237–269. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy462>
- Tibshirani, R. Regression Shrinkage and Selection via the Lasso. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* 1996. 58, 267–288.
- Tijssen, A.J., Creemers, E.E., Moerland, P.D., de Windt, L.J., Van Der Wal, A.C., Kok, W.E., Pinto, Y.M. MiR423-5p As a Circulating Biomarker for Heart Failure. *Circ. Res.* 2010. 106, 1035–1039. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.218297>
- Tromp, J., Ouwerkerk, W., Demissei, B.G., Anker, S.D., Cleland, J.G., Dickstein, K.,

- Filippatos, G., van der Harst, P., Hillege, H.L., Lang, C.C., Metra, M., Ng, L.L., Ponikowski, P., Samani, N.J., van Veldhuisen, D.J., Zannad, F., Zwinderman, A.H., Voors, A.A., van der Meer, P. Novel endotypes in heart failure: effects on guideline-directed medical therapy. *Eur Heart J.* 2018. 39(48), 4269-4276. doi: 10.1093/eurheartj/ehy712
- Tsuchida, A., Ohno, S., Wu, W., Borjigin, N., Fujita, K., Aoki, T., Ueda, S., Takanashi, M., Kuroda, M. miR-92 is a key oncogenic component of the miR-17-92 cluster in colon cancer. *Cancer Sci.* 2011. 102, 2264–71. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.02081.x>
- Tsutsui, H., Kinugawa, S., Matsushima, S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. *Cardiovasc. Res.* 2009. 81, 449–456. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn280>

V

- van Boven, N., Kardys, I., van Vark, L.C., Akkerhuis, K.M., de Ronde, M.W.J., Khan, M.A.F.F., Merkus, D., Liu, Z., Voors, A.A., Asselbergs, F.W., van den Bos, E.J., Boersma, E., Hillege, H., Duncker, D.J., Pinto, Y.M., Postmus, D., Boven, N. Van, Kardys, I., Vark, L.C. Van, Akkerhuis, K.M., Ronde, M.W.J. De, Khan, M.A.F.F., Merkus, D., Liu, Z., Voors, A.A., Asselbergs, F.W., Bos, E. Van Den, Boersma, E., Hillege, H., Duncker, D.J., Pinto, Y.M., Postmus, D. Serially measured circulating microRNAs and adverse clinical outcomes in patients with acute heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 2018. 20, 89–96. <https://doi.org/10.1002/ejhf.950>
- van de Bunt, M., Gaulton, K.J., Parts, L., Moran, I., Johnson, P.R., Lindgren, C.M., Ferrer, J., Gloyn, A.L., McCarthy, M.I. The miRNA profile of human pancreatic islets and beta-cells and relationship to type 2 diabetes pathogenesis. *PLoS One* 2013. 8, e55272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055272>
- Van der Velden, J., Papp, Z., Zaremba, R., Boontje, N.M., De Jong, J.W., Owen, V.J., Burton, P.B.J., Goldmann, P., Jaquet, K., Stienen, G.J.M. Increased Ca²⁺-sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc. Res.* 2003. 57, 37–47. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00606-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00606-5)
- van Eickels, M., Patten, R.D., Aronovitz, M.J., Alsheikh-Ali, A., Gostyla, K., Celestin, F., Grohe, C., Mendelsohn, M.E., Karas, R.H. 17-Beta-estradiol increases cardiac remodeling and mortality in mice with myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003. 41, 2084–2092. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(03\)00423-6](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(03)00423-6)
- Van Rooij, E. The Art of MicroRNA Research. *Circ. Res.* 2011. 108, 219–234. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.227496>
- Vanhoutte, D., Heymans, S. TIMPs and cardiac remodeling: ‘Embracing the MMP-independent-side of the family.’ *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010. 48, 445–453. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.09.013>
- Vegter, E.L., Ovchinnikova, E.S., Sillj, H.H.W., Meems, L.M.G., Van Der Pol, A., Van Der Velde, A.R., Berezikov, E., Voors, A.A., Boer, R.A.D., Van Der Meer, P. Rodent heart failure models do not reflect the human circulating microRNA signature in heart failure. *PLoS One* 2017. 12, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177242>
- Ventura-Clapier, R., Dworatzek, E., Seeland, U., Kararigas, G., Arnal, J.F., Brunelleschi, S., Carpenter, T.C., Erdmann, J., Franconi, F., Giannetta, E., Glezerman, M., Hofmann, S.M., Junien, C., Katai, M., Kublickiene, K., König, I.R., Majdic, G., Malorni, W., Mieth, C., Miller, V.M., Reynolds, R.M., Shimokawa, H., Tannenbaum, C., D’Ursi, A.M., Regitz-Zagrosek, V. Sex in basic research: Concepts in the cardiovascular field.

Cardiovasc. Res. 2017. 113, 711–724. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx066>
 Ventura-Clapier, R., Garnier, A., Veksler, V., Joubert, F. Bioenergetics of the failing heart. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2011. 1813, 1360–1372. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.09.006>

W

- Wang, L., Liu, J., Xu, B., Liu, Y.-L., Liu, Z. Reduced exosome miR-425 and miR-744 in the plasma represents the progression of fibrosis and heart failure. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 2018. 34, 626–633. <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2018.05.008>
- Wang, Y., Zhao, W., Fu, Q. miR-335 suppresses migration and invasion by targeting ROCK1 in osteosarcoma cells. *Mol. Cell. Biochem.* 2013. 384, 105–111. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1786-4>
- Wei, J.Q., Shehadeh, L.A., Mitrani, J.M., Pessanha, M., Slepak, T.I., Webster, K.A., Bishopric, N.H., Keith, A., Bishopric, N.H. Quantitative control of adaptive cardiac hypertrophy by acetyltransferase p300. *Circulation* 2008. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.760488>. Quantitative
- Widera, C., Gupta, S.K., Lorenzen, J.M., Bang, C., Bauersachs, J., Bethmann, K., Kempf, T., Wollert, K.C., Thum, T. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2011. 51, 872–875. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.07.011>
- 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, 855–862. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90530-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90530-4)
- Wuopio, J., Hilden, J., Bring, C., Kastrup, J., Sajadieh, A., Jensen, G.B., Kjølner, E., Kolmos, H.J., Larsson, A., Jakobsen, J.C., Winkel, P., Gluud, C., Carlsson, A.C., Ärlöv, J. Cathepsin B and S as markers for cardiovascular risk and all-cause mortality in patients with stable coronary heart disease during 10 years: a CLARICOR trial sub-study. *Atherosclerosis* 2018. 278, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.09.006>

Y

- Yan, H.L., Xue, G., Mei, Q., Wang, Y.Z., Ding, F.X., Liu, M.F., Lu, M.H., Tang, Y., Yu, H.Y., Sun, S.H. Repression of the miR-17-92 cluster by p53 has an important function in hypoxia-induced apoptosis. *EMBO J.* 2009. 28, 2719–2732. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.214>
- Yan, J., She, Q., Shen, X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, G. Potential role of microRNA-375 as biomarker in human cancers detection: A meta-analysis. *Biomed Res. Int.* 2017. 2017, 1875843. <https://doi.org/10.1155/2017/1875843>
- Yan, Y., Wang, X., Venø, M.T., Bakholdt, V., Sorensen, J.A., Krogdahl, A., Sun, Z., Gao, S., Kjems, J.J., Venø, M.T., Bakholdt, V., Sørensen, J.A., Krogdahl, A., Sun, Z., Gao, S., Kjems, J.J. Circulating miRNAs as biomarkers for oral squamous cell carcinoma recurrence in operated patients. *Oncotarget* 2017. 8, 8206–8214. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14143>
- Yanazume, T., Hasegawa, K., Morimoto, T., Kawamura, T., Wada, H., Matsumori, A., Kawase, Y., Hirai, M., Kita, T. Cardiac p300 Is Involved in Myocyte Growth with Decompensated Heart Failure. *Mol. Cell. Biol.* 2003. 23, 3593–3606. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.10.3593-3606.2003>
- Yar, S., Monasky, M.M., Solaro, R.J. Maladaptive modifications in myofilament proteins and

- triggers in the progression to heart failure and sudden death. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 2014. 466, 1189–1197. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1457-7>
- Yates, L.A., Norbury, C.J., Gilbert, R.J.C. The long and short of microRNA. *Cell* 2013. 153, 516–519. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.003>
- Yin, Z., Ren, J., Guo, W. Sarcomeric protein isoform transitions in cardiac muscle: A journey to heart failure. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2015. 1852, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.11.003>
- Yugi, K., Kubota, H., Hatano, A., Kuroda, S. Trans-Omics: How To Reconstruct Biochemical Networks Across Multiple “Omic” Layers. *Trends Biotechnol.* 2016. 34, 276–290. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.12.013>

Z

- Zhang, G., Shi, H., Wang, L., Zhou, M., Wang, Z., Liu, X., Cheng, L., Li, W., Li, X. MicroRNA and transcription factor mediated regulatory network analysis reveals critical regulators and regulatory modules in myocardial infarction. *PLoS One* 2015. 10, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135339>
- Zhang, J., Feng, C., Song, C., Ai, B., Bai, X., Liu, Y., Li, X., Zhao, J., Shi, S., Chen, X., Su, X., Li, C. Identification and analysis of a key long non-coding RNAs (lncRNAs)-associated module reveal functional lncRNAs in cardiac hypertrophy. *J. Cell. Mol. Med.* 2017. XX, 1–12. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13376>
- Zhang, J., Tu, Q., Bonewald, L.F., He, X., Stein, G., Lian, J., Chen, J. Effects of miR-335-5p in modulating osteogenic differentiation by specifically downregulating Wnt antagonist DKK1. *J. Bone Miner. Res.* 2011. 26, 1953–1963. <https://doi.org/10.1002/jbmr.377>
- Zhang, M., Cheng, Y.-J., Sara, J.D., Liu, L.-J., Liu, L.-P., Zhao, X., Gao, H. Circulating MicroRNA-145 is Associated with Acute Myocardial Infarction and Heart Failure. *Chin. Med. J. (Engl.)* 2017. 130, 51–56. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.196573>
- Zhou, S., Liu, Y., Prater, K., Zheng, Y., Cai, L. Roles of microRNAs in pressure overload- and ischemia-related myocardial remodeling. *Life Sci.* 2013. 93, 855–862. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.08.023>
- Zhou, X., Yin, C., Dang, Y., Ye, F., Zhang, G. Identification of the long non-coding RNA H19 in plasma as a novel biomarker for diagnosis of gastric cancer. *Sci. Rep.* 2015. 5, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep11516>
- Zhu, S., Cao, L., Zhu, J., Kong, L., Jin, J., Qian, L., Zhu, C., Hu, X., Li, M., Guo, X., Han, S., Yu, Z. Identification of maternal serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for prenatal detection of fetal congenital heart defects. *Clin. Chim. Acta* 2013. 424, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.05.010>
- Zile, M.R., DeSantis, S.M., Baicu, C.F., Stroud, R.E., Thompson, S.B., McClure, C.D., Mehurg, S.M., Spinale, F.G. Plasma Biomarkers That Reflect Determinants of Matrix Composition Identify the Presence of Left Ventricular Hypertrophy and Diastolic Heart Failure. *Circ. Hear. Fail.* 2011. 4, 246–256. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.958199>
- Zou, H. The Adaptive Lasso and Its Oracle Properties. *J. Am. Stat. Assoc.* 2006. 101, 1418–1429. <https://doi.org/10.1198/016214506000000735>
- Zouein, F.A., Altara, R., Chen, Q., Lesnefsky, E.J., Kurdi, M., Booz, G.W. Pivotal Importance of STAT3 in Protecting the Heart from Acute and Chronic Stress: New Advancement and Unresolved Issues. *Front Cardiovasc Med* 2015. 2, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2015.00036>

Annexes

1 Annexe I : Integrative network analysis reveals time-dependent molecular events underlying left ventricular remodeling in post-myocardial infarction patients

Florence Pinet, Marie Cuvellez, Thomas Kelder, Philippe Amouyel, Marijana Radonjic, Christophe Bauters

Publié dans la revue *Biochimica et Biophysica Acta*. 2017. 1863, 1445–1453

2 Annexe II : MicroRNAs regulating superoxide dismutase 2 are new circulating biomarkers of heart failure

Emilie Dubois-Deruy, Marie Cuvelliez, Jan Fiedler, Henri Charrier, Paul Mulder, Eleonore Hebbar, Angelika Pfanne, Olivia Beseme, Maggy Chwastyniak, Philippe Amouyel, Vincent Richard, Christophe Bauters, Thomas Thum, Florence Pinet

Publié dans la revue *Scientific Report*. 2017. 7, 14747

3 Annexe III : Integrative System Biology Analyses Identify Seven MicroRNAs to Predict Heart Failure

Henri Charrier*, Marie Cuvelliez*, Emilie Dubois-Deruy, Paul Mulder, Vincent Richard, Christophe Bauters, Florence Pinet

*co-first

Publié dans la revue *Non coding RNA*. 2019. 5, 22

4 Annexe IV : Circulating proteomic signature of early death in heart failure patients with reduced ejection fraction

Marie Cuvelliez*, Vincent Vandewalle*, Maxime Brunin, Olivia Beseme, Audrey Hulot, Pascal de Groot, Philippe Amouyel, Christophe Bauters, Guillemette Marot, Florence Pinet
*co-first

Soumis dans *Scientific Report*

Résumé

De nos jours, les maladies cardiovasculaires restent un enjeu de santé publique majeur dans les pays développés. Suite à un infarctus du myocarde (IDM), 30% des patients développent un remodelage ventriculaire gauche (RVG) qui peut conduire à une insuffisance cardiaque (IC) et au décès des patients. Les objectifs de ce projet sont d'étudier les mécanismes impliqués dans le RVG post-IDM et l'IC et d'identifier de nouveaux biomarqueurs permettant de prédire une évolution délétère suite à un IDM et le décès précoce des patients IC par des approches de biologie des systèmes et de statistiques.

Dans un premier temps, nous avons construit un réseau d'interactions moléculaires à partir de données expérimentales obtenues dans le plasma des patients post-IDM de l'étude REVE-2 à 4 temps (inclusion, 1 mois, 3 mois et 1 an post-IDM). Une analyse des modules actifs, extraits à chaque temps entre les patients avec un RVG élevé et les patients sans RVG, et de la centralité a permis d'identifier 6 molécules possiblement impliquées dans le RVG post-IDM : 2 facteurs de transcription (EP300 et ESR1) et 4 microARNs (miR-335-5p, miR-26b-5p, miR-375 et miR-17-5p). Nous avons montré que l'ARNm de ESR1 est significativement augmenté dans le VG d'un modèle de rats post-IDM à 2 mois post-IDM, que le miR-26b-5p est significativement diminué à 7 jours post-IDM et que le miR-335-5p tend à augmenter à 7 jours post-IDM.

Dans un second temps, nous avons construit un réseau d'interactions moléculaires à partir de données expérimentales obtenues par *SOMAscan assay*, dans le plasma des patients IC de l'étude INCA suivis pendant 3 ans. Une analyse des clusters et de la centralité des molécules du réseau a permis l'étude des mécanismes impliqués dans l'IC. En parallèle, une analyse de régression pénalisée, réalisée en collaboration avec la plateforme Bilille, a permis l'identification de 6 protéines (Complément C3, MAPKAPK5, Cathepsine S, MMP-1, MMP-7 et FAM107B) permettant de prédire le décès précoce des patients IC. La quantification de C3, MMP-1 et MMP-7 par des dosages conventionnels (ELISA, Luminex) dans une sous-population de INCA a donné des résultats concordants avec le *SOMAscan assay*, mais pas pour la cathepsine S.

Abstract

Nowadays, cardiovascular diseases remain a main public health issue in developed countries. Following a myocardial infarction (MI), at least 30% of patients developed a left ventricular remodeling (LVR), that can lead to heart failure (HF) and to death. The aims of this project were to study the mechanisms involved in LVR post-MI and HF and to identify new biomarkers allowing the prediction of a deleterious evolution after MI and early death of HF patients by systems biology and statistical approaches.

First, we built a molecular network based on experimental data obtained in the plasma of post-MI patients of the REVE-2 study at 4 time-points (baseline, 1 month, 3 months and 1 year). An active module analysis, extracted at each time-point between patients with LVR and patients without LVR, and a betweenness centrality analysis allowed the selection of 6 molecules potentially involved in LVR : 2 transcription factors, EP300 and ESR1, and 4 microRNAs, miR-335-5p, miR-26b-5p, miR-375 and miR-17-5p. We showed that ESR1 mRNA was significantly increased at 2 months post-MI in the LV a model of post-MI rats, miR-26b-5p was significantly decreased at 7 days post-MI and miR-335-5p had a trend to increase at 7 days post-MI.

Secondly, we built a molecular network using the experimental data obtained by *SOMAscan assay*, in the plasma of patients diagnosed for systolic HF from the INCA study and followed during 3 years. A topological and betweenness centrality analysis allowed the study of the mechanisms involved in HF. In parallel, a penalised regression analysis, performed in collaboration with the Bilille platform, allowed the selection of 6 proteins (C3, MAPKAPK5, Cathepsin S, MMP-1, MMP-7 and FAM107B) that allowed the prediction of early death of HF patients. The quantification of C3, MMP-1 and MMP-7 by conventional assays (ELISA, Luminex) in a subset of the INCA population gave consistent results with the *SOMAscan assay*, but not for cathepsin S.