



HAL
open science

Identification d'une signature de 7 microARNs pour prédire l'insuffisance cardiaque après un infarctus et caractérisation des vésicules extracellulaires cardiaques impliquées dans leur transport

Henri Charrier

► **To cite this version:**

Henri Charrier. Identification d'une signature de 7 microARNs pour prédire l'insuffisance cardiaque après un infarctus et caractérisation des vésicules extracellulaires cardiaques impliquées dans leur transport. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2020. Français. NNT : 2020LILUS040 . tel-03931478

HAL Id: tel-03931478

<https://theses.hal.science/tel-03931478v1>

Submitted on 9 Jan 2023

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

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

THÈSE

Biochimie, biologie cellulaire et moléculaire et physiologie

En vue de l'obtention du **DOCTORAT D'UNIVERSITE**

Délivré par l'**UNIVERSITE DE LILLE** et l'**ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE DE LILLE**



Identification d'une signature de 7 microARNs pour prédire l'insuffisance cardiaque après un infarctus et caractérisation des vésicules extracellulaires cardiaques impliquées dans leur transport.

Soutenue publiquement le 31 mars 2020 par

Henri CHARRIER

Devant le jury composé de:

Pr. Philippe Amouyel (Inserm U1167, Lille, France): Président

Dr. Xavier Loyer (Inserm U970, Paris, France): Rapporteur

Dr. Carmen Martinez (Inserm U1063, Angers, France): Rapporteur

Pr. Sandrine Horman (Université de Louvain, Belgique): Examinateur

Pr. Paul Mulder (Inserm U1096, Rouen, France): Examinateur

Dr. Florence Pinet (Inserm U1167, Lille, France): Directrice de thèse

Thèse effectuée dans l'unité de recherche

U1167-RID-AGE, équipe 2, Université de Lille, Inserm, Institut Pasteur de Lille, France



Thèse cofinancée par l'**UNIVERSITE DE LILLE** et la **Région Hauts-de-France**



REMERCIEMENTS

Cette thèse est le fruit d'un travail que j'ai commencé en 2015 en tant qu'étudiant en Master 2 et que j'achève en 2020 avec un sentiment de reconnaissance envers nombre de personnes.

En premier lieu, je tiens à remercier l'**Université de Lille** ainsi que la **Région Hauts-de-France** qui ont cofinancé mon projet de thèse.

Je tiens ensuite à remercier les membres de mon jury de thèse:

Monsieur le Professeur Philippe Amouyel,

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire. Je suis particulièrement honorée que vous présidiez mon jury de thèse. Soyez assuré de mes sincères remerciements et mon profond respect.

Madame le Docteur Florence Pinet,

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre équipe et de m'avoir encadré tout au long de ma thèse. Votre confiance a été indispensable à l'accomplissement de ce projet. Vous avez été pour moi un exemple de dynamisme et de rigueur scientifique. Ce fût un plaisir pour moi de partager votre enthousiasme à chaque nouveau résultat et de partir en congrès à vos côtés. Merci beaucoup pour votre soutien, j'ai appris énormément grâce à vous.

Monsieur le Docteur Xavier Loyer et Madame le Docteur Carmen Martinez,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Merci pour vos critiques. Soyez assurés de mes sincères remerciements et mon profond respect.

Madame le Professeur Sandrine Horman et Monsieur le Professeur Paul Mulder,

Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer ma thèse. Soyez assurés de mes sincères remerciements et mon profond respect.

Je tiens aussi à remercier les membres de mon comité de suivi individuel de thèse:

Madame le Docteur Martine Duterque et Monsieur le Professeur Vincent Richard,

Je vous remercie d'avoir participé à l'encadrement de ma thèse. Soyez assuré de mes sincères remerciements et mon profond respect.

REMERCIEMENTS

Un grand merci à tous les membres de l'équipe 2 de l'unité U1167 et plus particulièrement:

Maggy Chwastiniak,

Ton aide pour réaliser toutes ces RT-qPCR m'a été inestimable pendant ma thèse. Merci.

Annie Turkieh,

Tu connais déjà ma thèse par cœur mais quelque chose me dit que tu iras voir mes remerciements. Merci pour ton aide au cours de chaque étape de ma thèse et surtout lors des périodes de rédaction. Ton amitié, tes conseils avisés, et ta (longue) expérience ont été précieux. Kesik !

Emilie Dubois-Deruy,

Merci pour ton soutien quotidien et tes conseils scientifiques (et sportifs). Ta capacité à enchaîner tes différents projets est une source d'inspiration pour moi.

Olivia Besème,

Tu m'as formé aux différentes techniques du laboratoire et tu as été un soutien indispensable par la suite. Merci pour tout.

Marie Cuvelliez,

Merci de m'avoir fait découvrir les joies des réseaux d'interactions moléculaires. Merci aussi d'avoir participé à la correction de cette thèse. Ton soutien ces derniers mois a été précieux.

Victorienne Peugnet,

Merci pour ton soutien quotidien. Nos sorties « animalerie » me manqueront presque. J'espère être tenu informé des derniers rebondissements des « malheurs de Willou ».

Fadi Abou Zeid,

Enfin la relève ! les vésicules extracellulaires cardiaques n'ont qu'à bien se tenir. Merci de m'avoir permis de m'exercer un peu à l'anglais et au libanais. Bonne chance pour la suite !

Je remercie également les anciens membres de l'équipe 2 de l'unité U1167 : **Ouriel Saura, Sina Pourouchani, Arthur Dechaumes, Marion Bouvet, Gilles Lemesle.**

Enfin merci aux 5 étudiants qui sont venus faire un stage avec moi et qui ont contribué significativement à l'évolution de mon projet de thèse : **Marie-Cécile Caron, Axel Corbau, Estelle Carpentier, Marc Verhagen et Melissa Rabah.**

REMERCIEMENTS

Un grand merci aux autres membres de l'unité U1167, et plus particulièrement:

Amandine Flaig,

Merci pour ton soutien moral quotidien, ta bonne humeur et ton audition.

Fanny Eysert,

Merci pour tes conseils administratifs, ton accent chantant et tes fameux proverbes.

Anaïs-Camille, Jean-Charles, Devrim, Tiago, Florie, Marcos, Ana-Raquel, Ortis, Anne-Sophie, Camille, Anne-Marie, Pierre, Aline, Jean, Nadine, Julie, Benjamin, Céline, Vincent, Audrey, Hugo, Xavier, Julien, Valérie, Manon, Victoria, Antoine, Vincent, Estelle, Dominique et j'en oublis.

Merci pour votre accueil chaleureux, votre sympathie et votre soutien.

Pour finir merci aux membres de ma famille et plus particulièrement:

Papa, Maman, Pierre, Mamie Jeanne

Merci de m'avoir encouragé toute ces années.

Tatate Thérèse

Merci d'avoir lu ma thèse et surtout merci de l'avoir dépouillée au maximum de toutes les petites erreurs d'orthographe qui s'y étaient glissées.

PRODUCTIONS DE THESE ET FORMATIONS EFFECTUEES

Articles publiés (3):

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. *Noncoding RNA*. 2019; 5(1):22.

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 superoxide dismutase 2 are new circulating biomarkers of heart failure. *Sci. Rep.* 2017;7.

[REVUE] Turkieh A, **Charrier H**, Dubois-Deruy E, Porouchani S, Bouvet M, Pinet F. Non-coding RNAs in cardiac autophagy following myocardial infarction. *Oxid Med Cell Longev*, 2019 ;2019:6.

Articles en cours de rédaction (2):

Charrier H, Abou Zeid F, Besème O, Amouyel P, Pinet F. Characterization of cardiac extracellular vesicles involved in the transport of microRNAs associated with heart failure progression.

Charrier H, Chwastyniak M, Besème O, Turkieh A, Dubois-Deruy E, Heyse W, Mulder P, Amouyel P, Richard V, Pinet F. Among 7 microRNAs identified in silico to predict heart failure, miR-26b-5p may regulate cardiac fibrosis after myocardial infarction by targeting expression of collagens.

Communications orales (2) :

- Printemps de la Cardiologie, Nantes, 2017.
- 1ère journée scientifique du FHU-REMOD-VHF, Rouen, 2017 ***200 € Prix Présentation ***.

Communications affichées (12) :

- 4th COST Action CardioRNA MC and WG Meeting 2020, Maastrich, 2020 ;
- Journée André Verbert, Lille, 2018
- Société Française des Vésicules Extracellulaires, Nantes, 2019 Paris, 2017 ;
- Printemps de la Cardiologie, Lille, 2019 Montpellier, 2018 Nantes, 2017 ;
- Journée du FHU-REMOD-VHF, Rouen, 2019 2018 ***2000 € Travel Award*** 2017 ;
- *International Society of Extracellular Vesicles*, Barcelone, 2018 ***450 € Travel Award***;
- Heart Failure meeting, Paris, 2017

Séminaires d'experts (4) :

- *xCELLigence user meeting*, Paris, 2019
- Automnales du GRRC, Pornichet, 2018.
- Journée de Recherche Cardiovasculaire du CCF & du Groupe Réseau Avenir du GRRC, La Grande-Motte, 2016 et Tours, 2017;

Séminaires thématiques (7) :

- Insuffisance cardiaque et trouble du rythme, Lille, 2019;
- Enjeux déontologiques et éthiques de la science, Lille, 2018;
- Habilitation à la microscopie confocale à fluorescence, Lille, 2018; 2016.
- Gestion de l'innovation dans le management stratégique de l'entreprise, Lille, 2018;
- Entraînement à l'intervention aux congrès scientifiques internationaux, Lille, 2018;
- Habilitation à l'expérimentation animale, Lille 2017;

SOMMAIRE

ABBREVIATIONS	8
RESUMES	12
INTRODUCTION	14
I - L'INSUFFISANCE CARDIAQUE (IC)	14
<i>I.1 - Définition et symptômes de l'IC</i>	14
<i>I.2 - Epidémiologie de l'IC</i>	14
<i>I.3 - Etiologies de l'IC et prévalence de la cause ischémique</i>	14
<i>I.4 - L'infarctus du myocarde (IDM)</i>	15
<i>I.5 - Le remodelage ventriculaire gauche (RVG) après un IDM</i>	18
I.5.1 - Définition du RVG après un IDM	18
I.5.2 - Mécanismes physiopathologiques du RVG après un IDM	19
I.5.2.1 - L'inflammation	19
I.5.2.2 - La fibrose cardiaque	20
I.5.2.3 - L'hypertrophie cardiaque.....	26
<i>I.6 - Evaluation diagnostique, pronostique et fonctionnelle des patients après l'IDM</i>	31
I.6.1 - Les paramètres électriques et morphométriques cardiaques	32
I.6.2 - Les paramètres moléculaires circulants	34
II - RECHERCHE D'UNE SIGNATURE MOLECULAIRE CIRCULANTE POUR PREDIRE LE RVG APRES UN IDM	37
<i>II.1 - Les données omiques et la biologie des systèmes</i>	37
<i>II.2 - Les microARNs</i>	40
II.2.1 - La biogénèse des microARNs	40
II.2.2 - Les mécanismes d'action des microARNs	41
II.2.3 - Les microARNs et le RVG après l'IDM	44
II.3 - Les transporteurs extracellulaires des microARNs.....	46
II.3.1 - La biogénèse des vésicules extracellulaires (VEs)	47
II.3.1.1 - Les VEs issues de la membrane plasmique	47
II.3.1.2 - Les VEs issues de la membrane endosomale	49
II.3.2 - L'isolement, la purification et la caractérisation des VEs	53
II.3.3 - Le tropisme, l'absorption et la fonction des VEs.....	56
III - POSITION DU PROBLEME	59
IV - RESULTATS ANTERIEURS	60
<i>IV.1 - Le réseau d'interactions microARNs-protéines cibles construit à partir des données protéomiques issues des VG des rats post-IDM permet d'identifier 13 microARNs susceptibles de réguler 8 protéines modulées par le RVG après l'IDM</i>	60
<i>IV.2 - Le réseau REVE-2 construit à partir des données multi-omiques issues des plasma des patients post-IDM de l'étude REVE-2 permet d'identifier 24 microARNs susceptibles de réguler des molécules lors du RVG après l'IDM</i>	62
V - OBJECTIFS DE THESE	64

SOMMAIRE

MATERIEL ET METHODES	65
I – MODELES	65
<i>I.1 – Ventricules et plasma de rats adultes après un IDM</i>	65
<i>I.2 – Etude REVE-2 [REmodelage VEntriculaire 2]</i>	65
<i>I.3 – Réseau REVE-2</i>	66
<i>I.4 – Lignée de cardiomyoblastes H9c2 (CMs-H9c2) de rats embryonnaires</i>	67
<i>I.5 – Ventricules et plasma de rats néonataux</i>	67
<i>I.6 – Cultures primaires de CMs et CFs ventriculaires de rats néonataux</i>	68
<i>I.7 – Traitements neuro-hormonaux</i>	69
I.7.1 – Stimulation de l’hypertrophie des CMs-H9c2 des CMs de rats néonataux	69
I.7.2 – Stimulation de la fibrose cardiaque dans les CFs de rats néonataux.....	69
II – PRODUCTION ET PURIFICATION DES VES	69
<i>II.1 – Conditionnement des CMs-H9c2, des CMs et des CFs de rats néonataux</i>	69
<i>II.2 – Purifications des VEs</i>	70
II.2.1 – Centrifugations différentielles.....	70
II.2.2 – Chromatographie d’exclusion de taille	70
II.2.3 – Affinité lipidique (EVtrap).....	70
III – CARACTERISATION DE LA MORPHOLOGIE DES CELLULES ET DES VES	71
<i>III.1 – Morphologie des cellules</i>	71
III.1.1 – Microscopie confocale à fluorescence des cellules.....	71
III.3.2 – Suivi en temps réel de la prolifération/adhésion des CFs.....	71
<i>III.2– Morphologie des VEs</i>	72
III.2.1 – Analyse du suivi individuel des particules (NTA).....	72
III.2.2– Analyse en microscopie électronique à transmission (MET)	72
IV – CARACTERISATION DES PROTEINES DES CELLULES ET DES VES	73
<i>IV.1 – Extraction des protéines</i>	73
IV.1.1 – Protéines solubles en RIPA.....	73
IV.1.2 – Protéines insolubles en RIPA et solubles en urée	73
IV.1.3 – Dosage des protéines.....	73
IV.2 – Western blot	74
<i>IV.3 – Analyses protéomiques</i>	76
IV.3.1 – Séparation des protéines en gel 1D et MALDI-TOF/TOF.....	76
IV.3.2 – Séparation des protéines par chromatographie en phase liquide et LC-MS	78
V – CARACTERISATION DES ARNS	79
<i>V.1 – Extraction des ARNs</i>	79
<i>V.3 – Rétrotranscription des ARNs messagers et des microARNs en ADNc</i>	81
<i>V.4– Amplification des ADNc par qPCR</i>	81

SOMMAIRE

RESULTATS	83
I - SELECTION D'UNE SIGNATURE EN MICROARNs ASSOCIEE AVEC LE RVG APRES L'IDM.	83
<i>I.1 - Analyse des 13 microARNs identifiées dans le réseau d'interactions microARNs-protéines cibles construit à partir des données protéomiques issues des VG des rats post-IDM</i>	<i>83</i>
<i>I.2 - Analyse des 24 microARNs identifiés dans le réseau REVE-2.....</i>	<i>84</i>
<i>I.3 - Fonction des cibles des miR-21-5p, miR-222-3p, miR-335-5p, miR-26b- 5p, miR-23a-3p, miR-375 et miR-17-5p</i>	<i>86</i>
II - IMPLICATION DE LA FIBROSE CARDIAQUE ET DE L'HYPERTROPHIE CARDIOMYOCYTAIRE DANS LA REGULATION DE LA SIGNATURE EN MICROARNs ASSOCIEE AVEC LE RVG APRES L'IDM.	87
<i>II.1 - Association de la signature en microARNs associée avec le RVG après l'IDM avec la fibrose.....</i>	<i>87</i>
<i>II.2 - Caractérisation phénotypique des fibroblastes cardiaques (CFs) mis en culture et analyse de l'expression de la signature en microARNs.....</i>	<i>89</i>
<i>II.3 - Caractérisation phénotypique des fibroblastes cardiaques (CFs) stimulés à l'isoprénaline (ISO) et à l'angiotensine II (ANGII) et analyse de l'expression de la signature en microARNs .</i>	<i>93</i>
<i>II.4 - Implication des 5 microARNs dans la régulation des gènes de la fibrose cardiaque</i>	<i>101</i>
<i>II.5 - Association de la signature en microARNs avec l'hypertrophie des cardiomyocytes.....</i>	<i>104</i>
III - CARACTERISATION DES VES CARDIAQUES IMPLIQUEES DANS LE TRANSPORT DE LA SIGNATURE EN MICROARNs ASSOCIEE AVEC LE RVG APRES L'IDM.	105
<i>III.1 - Implication des VEs cardiaques dans le transport de la signature en microARNs</i>	<i>105</i>
<i>III.2 - Caractérisation des VEs cardiaques impliquées dans le transport de la signature en microARNs.....</i>	<i>109</i>
<i>III.3 - Identification des protéines abondantes dans les VEs intra-ventriculaires.....</i>	<i>112</i>
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	121
I - IDENTIFICATION D'UNE SIGNATURE EN MICROARNs ASSOCIEE AU RVG APRES L'IDM	121
<i>I.1 - Pertinence des données omiques générées à partir des rats et des patients de l'étude REVE-2</i>	<i>121</i>
<i>I.2 - Analyse des données omiques par la biologie des systèmes.....</i>	<i>123</i>
II - ASSOCIATION DE LA SIGNATURE EN MICROARNs AVEC LES MECANISMES ASSOCIES AU RVG APRES L'IDM	125
<i>II.1 - Implication de la fibrose cardiaque dans la régulation de la signature en microARNs..</i>	<i>125</i>
<i>II.2 - Implication de l'hypertrophie par rapport à la fibrose dans la régulation de la signature en microARNs</i>	<i>127</i>
<i>II.3 - Fonction des miR-21-5p, miR-222-3p, miR-17-5p, miR-26b-5p et miR-335-5p dans la fibrose.....</i>	<i>128</i>
III - IMPLICATION DES VES CARDIAQUES DANS LE TRANSPORT DE LA SIGNATURE EN MICROARNs	129
<i>III.1 - Diversité des VEs issues des CFs, des CMs, des CMs-H9c2 et des ventricules de rats ...</i>	<i>130</i>
<i>III.2 - Identification des protéines exprimées par les VEs cardiaques isolées.....</i>	<i>131</i>
RÉFÉRENCES	134

ABBREVIATIONS

ABBREVIATIONS

%	pourcentage	CHRU	Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille
(s)ST2	protéine (soluble) de suppression tumorale 2	CircRNA	<i>Circular RNA</i>
°C	degré Celsius	CK-MB	créatine kinase
µg	microgramme	CLU	clusterine
µL	microlitre	cm ²	centimètre carré
µm	micromètre	CMs	cardiomyocytes
O ²⁻	anion superoxyde	CO ₂	dioxyde de carbone
¹⁵ O	oxygène 15	Col1	collagène de type 1
3'UTR	<i>3' untranslated region</i>	Col3	collagène de type 3
5'UTR	<i>5' untranslated region</i>	CRP	protéine C réactive
ACC	<i>American College of Cardiology</i>	CTGF	facteur de croissance du tissu conjonctif
Agos	protéines Argonautes	cTn	isoforme cardiaque de la troponine
AHA	<i>American Heart Association</i>	Da	Dalton
Akt	<i>Akt / protein kinase B</i>	DAMPs	<i>Damage Associated Molecular Pattern</i>
ALIX	<i>ALG-2 Interacting protein X</i>	DDR2	<i>Discoidin Domain Receptor 2</i>
ANGII	angiotensine II	DGCR8	<i>DiGeorge Syndrome Critical Region 8</i>
ANP	peptides natriurétiques atriaux	DMEM	<i>Dulbecco Modified Eagle's minimal Essential Medium</i>
ARF6	<i>ADP-Ribosylation Factor 6</i>	DTT	dithiothréitol
ARN	acide ribonucléique	ECG	électrocardiogramme
AT1	récepteur à l'angiotensine de type 1	ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
Atg	<i>Autophagy-related protein</i>	EDTA	Ethylène Diamine Tétracétique
ATP	adénosine triphosphate	ERK1/2	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2</i>
BCA	acide bicinchoninique	ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
BICeL	<i>Bio Imaging Center Lille</i>	EVTRAP	<i>Extracellular Vesicles Total Recovery and Purification</i>
BNP	peptides natriurétiques de type B	FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>	FAP	<i>Fibroblast-Activation Protein</i>
C18	chaîne de 18 atomes de carbone	FasL	<i>Fas Ligand</i>
Ca ²⁺	calcium	FDR	<i>False Discovery Rate</i>
CAA	chloroacétamide		
CaCl ₂	chlorure de calcium		
CaN	calcineurine		
CCL2	<i>Chemokine (C-C motif) Ligand 2</i>		
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>		
CFs	fibroblastes cardiaques		

ABBREVIATIONS

FEVG	Fraction d'Ejection du Ventricule Gauche	ILK	<i>Integrin-Linked Kinase</i>
FGF2	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i>	ILV	vésicules intraluminales
FSP1	<i>Fibroblast Specific Protein 1</i>	Inserm	Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale
g	gramme	IP	intrapéritonéal
<i>g</i>	unité de gravité	IPA	<i>Ingenuity Patway Analysis</i>
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogenase	IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
GDF-15	facteur 15 de croissance et de différenciation	ISEV	<i>Internationnal Society of Extracellular Vesicles</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>	ISO	isoprénaline
GO	<i>Gene Ontology</i>	Itg	Intégrine
GSK-3 β	Glycogene synthase kinase-3 beta	KCl	chlorure de potassium
gVEs	grandes VEs	kg	kilogramme
h	heure	kg	kilogramme
H ⁺	proton	KH ₂ PO ₄	phosphate de monopotassium
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène	L	litre
H ₂ O	eau	LC	<i>Liquid Chromatography</i>
HA	acide hyaluronique	LDB3	protéine 3 de liaison au domaine LIM
HDL	<i>High Density Lipoproteins</i>	LDL	<i>Low Density Lipoproteins</i>
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique	LINC	<i>Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton</i>
HF	<i>Heart Failure</i>	LIPCAR	<i>mitochondrial long noncoding RNA uc022bqs.1</i>
HGF	facteur de croissance des hépatocytes	lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>
hnRNPA2 B1	<i>nuclear ribonucleoproteins A2/B1</i>	Log2	logarithme de 2
HSP90	Heat Shock Protein, 90	LOX	Lysine Oxydase
IC	insuffisance cardiaque	LTBP1	TGF- β complexée avec un peptide de latence
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>	LV	<i>Left Ventricle</i>
ICTP	<i>C-Telopeptide Pyridinoline Crosslinks of Type I Collagen</i>	LVR	<i>Left Ventricular Remodelling</i>
IDL	<i>Intermediate Density Lipoproteins</i>	m	masse
IDM	infarctus du myocarde	m/z	masse/charge
IL1	Interleukine 1	MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>
IL-33	Interleukine 33	MAPKs	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
IL6	Interleukine 6		

ABBREVIATIONS

MET	Microscopie Electronique à Transmission	NT-pro-BNP	fragment N-terminal du proBNP
mg	milligramme	NYHA	<i>New York Heart Association</i>
MgSO ₄	sulfate de magnésium	P1NP	propeptide N-Terminal du procollagène de type 1
MI	<i>Myocardial Infarction</i>	P3NP	propeptide N-Terminal du procollagène de type 3
microARNs	micro-acides ribonucléiques	P4HB	Prolyl 4-Hydroxylase beta
min	minute	P-Akt	phospho-Akt (Ser473)
miR-3p	extrémité 3' (3p) du pri-miRNA	P-bodies	<i>Processing-bodies</i>
miR-5p	extrémité 5' (5p) du pri-miRNA	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
miRISC	<i>miRNA-Induced Silencing Complex</i>	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
miRNA	microARN mature	PDCD4	<i>Programmed Cell Death 4</i>
MLP	<i>Muscle LIM Protein</i>	PDGFR α	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor A</i>
mM	millimolaire	PDLIM5	<i>PDZ and LIM domain protein 5</i>
mm ²	millimètre carré	PE	phényléphrine
MMPs	<i>Matrix Metalloproteinases</i>	PGAM1	<i>Phosphoglycerate Mutase</i>
MR-proANP	forme précurseur de l'ANP	P-GSK-3 β	phospho glycogène synthase kinase-3 beta (Ser9)
MRTF	<i>Myocardin-Related Transcription Factor</i>	pH	sérum de veau fœtal
MS	spectrométrie de masse	PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i>
mV	milliVolt	PKM	<i>Pyruvate Kinase Muscle</i>
MVE	<i>Multi-Vesicular Endosomes</i>	ppm	partie par million
MVP	<i>Major Vault Protein</i>	PRDX	<i>Peroxyredoxin</i>
Na ⁺	sodium	pre-miRNA	microARN précurseur
NaCl	chlorure de sodium	pri-miRNA	microARN primaire
NaH ₂ PO ₄	dihydrogénophosphate de sodium	Pro-ANP	précurseur de l'ANP
NaHCO ₃	bicarbonate de sodium	Pro-BNP	forme précurseur du BNP
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>	PS	pénicilline-streptomycine
NF κ B	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>	PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
nm	nanomètre	pVEs	petites VEs
NO	monoxyde d'azote	RAB	<i>RAS-related protein GTPases</i>
NRVFs	<i>Neonatal Rat Ventricular Fibroblasts</i>	RAL-1	<i>Ras-related GTPase homolog 1</i>
NRVMs	<i>Neonatal Rat Ventricular Myocytes</i>	REVE-2	Remodelage Ventriculaire 2
NTA	Nanoparticles Tracking Analysis	RhoA	<i>Ras homolog family member A</i>
		RIN	<i>RNA Integrity Number</i>

ABBREVIATIONS

RiPA	<i>Radio immunoprecipitation Assay</i>	TCEP	tris[2-carboxyethyl] phosphine–HCl
RNAse	ribonucléase	Tcf21	<i>Transcription factor 21</i>
ROCK	<i>Rho associated kinase</i>	TEP	tomographie par émission de position
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>	TF	facteur de transcription
RT	rétrotranscription	TGF-β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
RTCA	<i>Real-Time Cell Analysis</i>	TGN	<i>Trans Golgi Network</i>
RVG	remodelage du ventricule gauche	Ti	Titane
Sca1	<i>stem cells antigen-1</i>	TIM4	<i>T cell Immunoglobulin Mucin receptor 4</i>
sCMOS	<i>scientific Complementary Metal–Oxide–Semiconductor</i>	TIMPs	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate	TLRs	<i>Toll-Like Receptors</i>
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>	TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
SERCA	pompe ATPase calcique du réticulum endoplasmique	TOF	<i>Time-Of-Flight</i>
SFRP5	<i>Secreted Frizzled-Related Protein 5</i>	TPM1	<i>Tropomyosin α1 chain</i>
SLRP	<i>Small Leucine-Rich Proteoglycans</i>	TRBP	<i>Transactivating Response RNA-Binding Protein</i>
SMAD	<i>Mothers against decapentaplegic homolog</i>	TRPs	<i>Transient Receptor Potentials</i>
SMM	<i>Slow Muscle Myosin</i>	TSG101	<i>Tumor Susceptibility Gene 101 protein</i>
SNAP23	<i>Synaptosomal-Associated Protein 23</i>	UV	ultraviolet
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor</i>	v	volume
SOD	Superoxyde Dismutase	VAMPs	<i>Vesicle-Associated Membrane Proteins</i>
Spry1	<i>Sprouty 1</i>	VD	ventricule droit
STRING	<i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins</i>	VED	volume du VG en fin de diastole
SVF	sérum de veau foetal	VEs	vésicules extracellulaires
SYNCRIP	<i>Synaptotagmin-binding Cytoplasmic RNA-Interacting Protein</i>	VES	volume du VG en fin de systole
SYTL4	<i>Synaptotagmin-like protein 4</i>	VG	ventricule gauche
SYX-5	<i>Syntaxin 5</i>	VLDL	<i>Very Low Density Lipoproteins</i>
TA	température ambiante	VPS4	<i>Vacuolar Protein Sorting 4</i>
TAT-5	<i>phospholipid-transporting ATPase</i>	YAP/TAZ	<i>Yes-Associated Protein/Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif</i>
TBS	tampon phosphate salin	YB-1	<i>Y box Binding protein</i>
		α-SMA	<i>α-Smooth Muscle Actin</i>

RESUMES

Résumé profane

L'obstruction d'une artère irrigant le cœur cause un infarctus qui altère les cellules cardiaques, menant à une perte de contractilité qui peut conduire à l'insuffisance cardiaque (IC). Malgré les traitements existants, le patient IC est incapable de répondre aux besoins en sang de ses organes, ce qui peut le tuer. Mon objectif de thèse est de détecter les altérations des cellules du cœur après l'infarctus qui conduisent à l'IC pour éviter sa survenue. J'ai montré que ces altérations cellulaires modifient la sécrétion de 7 molécules particulières dans le sang. Ces molécules sont transportées dans le sang par des vésicules extracellulaires (VEs) qui les protègent de la dégradation et qui sont composées d'éléments hérités des cellules qui les produisent. J'ai identifié ces éléments pour permettre d'isoler les VEs cardiaques et offrir la possibilité de détecter les 7 molécules capables de prédire la survenue de l'IC afin d'adapter la prise en charge thérapeutique.

Résumé scientifique

Le remodelage du ventricule gauche (RVG) et ses mécanismes comme la fibrose et l'hypertrophie après l'infarctus du myocarde (IDM) peuvent mener à l'insuffisance cardiaque et sont associés à des modifications d'expression de microARNs. Les vésicules extracellulaires (VEs) sont des transporteurs hétérogènes des microARNs dont la composition dérive de leurs cellules sources. Les objectifs de cette thèse sont de définir une signature en microARNs capable de prédire le RVG et ses mécanismes après l'IDM et caractériser les vésicules extracellulaires (VEs) cardiaques impliquées dans leur transport.

A partir des données moléculaires obtenues lors du RVG après l'IDM chez les rats après la ligature de l'artère coronaire et chez les patients de l'étude REVE-2 (REmodelage VEntriculaire), une signature de 7 microARNs susceptible de prédire le RVG a été identifiée. Pour valider cette signature, les microARNs ont été quantifiés après l'IDM chez les rats et chez les patients de l'étude REVE-2: leur modulation par le RVG a été confirmée dans le VG et le plasma des rats et le plasma des patients. Dans les fibroblastes (CFs) et les myocytes (CMs) cardiaques de rats néonataux, l'activation de la fibrose et de l'hypertrophie module aussi la signature en microARNs. Ces résultats confirment que la signature en microARNs permet de détecter le RVG et ses mécanismes après l'IDM.

Nous avons montré que les petites VEs cardiaques isolées par ultracentrifugation sont impliquées dans le transport des microARNs de la signature. Les petites VEs cardiaques sont différentes entre les CFs et les CMs et entre le ventricule et le plasma de rats néonataux. Par analyse protéomique des VEs isolées par affinité lipidique à partir de ventricules et du plasma, la protéine 3 de liaison au domaine LIM (Ldb3) a été identifiée puis validée pour être plus abondante dans les petites VEs de ventricules comparées aux VEs de plasma, aux grandes VEs et aux particules non-VEs de ventricules séparées par chromatographie d'exclusion de taille. La détection de la signature en microARNs dans les VEs de plasma exprimant Ldb3 pourrait améliorer sa capacité à prédire spécifiquement le RVG et l'IC après l'IDM.

ABSTRACTS

Lay summary

The obstruction of a coronary artery that irrigates the heart caused myocardial infarction (MI) that impairs cardiac cells, causing a loss of contractility that can lead to heart failure (HF). Despite current treatments, HF patient does not provide enough blood supply to his organs and may die. My PhD project aims to detect the cellular alterations after MI that lead to HF and to improve the diagnostic and treatments of HF. I showed that these alterations change the secretion of 7 specific molecules in the blood. These molecules are transported into the blood through extracellular vesicles that protect them against degradation and that are composed by elements inherited from the producing cells. I have identified these elements to allow the isolation of cardiac EVs and give the possibility to detect the 7 molecules able to predict HF in order to adapt early healthcare.

Scientific summary

Left ventricular remodelling (LVR) and its mechanisms such as fibrosis and hypertrophy after myocardial infarction (MI) can lead to heart failure (HF) and are associated with modulation of microRNA levels. Extracellular vesicles (EVs) are heterogeneous transporters of microRNAs and their composition is derived from their cellular sources. This project aims to identify a microRNA-signature to predict LVR after MI and to characterize the cardiac extracellular vesicles (EVs) involved in their transport.

Using molecular data of LVR after MI obtained in an experimental rat model in which MI is induced by coronary artery ligation and in post-MI patients from the REVE-2 study (REmodelage VEtriculaire), we identified a signature of 7 microRNAs able to detect LVR post-MI. To validate this signature, we quantified the 7 microRNAs after MI in rats and REVE-2 patients and we confirmed their modulation in the LV and plasma of rats and in the plasma of patients. In the cardiac fibroblasts (CFs) and myocytes (CMs) of neonatal rats, fibrosis activation and hypertrophy also lead to the modulation of the 7 microRNAs-signature. These results confirm that the 7 microRNAs-signature is able to detect LVR and its mechanisms after MI.

We shown that the small cardiac EVs isolated by differential centrifugation were involved in the transport of microRNAs from the 7 microRNAs-signature. The small cardiac EVs are different between CFs and CMs and between ventricles and plasma. Proteomic analysis of EVs isolated by lipid affinity from ventricles and plasma identified the LIM domain binding 3 (Ldb3) protein that we validated to be more abundant in small cardiac EVs from ventricles than EVs from plasma, large EVs and non-EVs components separated by size exclusion chromatography. The detection of the 7 microRNAs-signature in the plasma EVs expressing Ldb3 may improve its ability to predict specifically LVR and HF after MI.

INTRODUCTION

I - L'insuffisance cardiaque (IC)

I.1 - Définition et symptômes de l'IC

L'insuffisance cardiaque (IC) est une anomalie de la structure et/ou de la fonction du cœur qui altère sa capacité à fournir un débit sanguin suffisant avec une pression normale pour satisfaire les besoins métaboliques de l'organisme (Ponikowski *et al.*, 2016).

Les symptômes de l'IC comprennent: la dyspnée (essoufflement qui s'apparente à la suffocation), liée à un engorgement de sang dans les poumons; la fatigue, liée à la diminution de l'apport énergétique des muscles; et la prise de poids (> 2 kg par semaine), liée à la rétention hydrosodée (eau et sel) (Ponikowski *et al.*, 2016). Les signes physiques comprennent des crépitations pulmonaires qui sont des bruits liés à la présence de liquide dans les alvéoles pulmonaires, des œdèmes des membres inférieurs, et des turgescences jugulaires (Ponikowski *et al.*, 2016).

I.2 - Epidémiologie de l'IC

Dans les pays industrialisés, l'incidence de l'IC est en pleine augmentation avec le vieillissement de la population: la prévalence de l'IC entre 2013 et 2016 est estimée à 2% avant 60 ans, 7% entre 60 et 80 ans et 12% après 80 ans (Benjamin *et al.*, 2019). Malgré les améliorations thérapeutiques actuelles, le pronostic des patients reste mauvais: presque 20% de mortalité dans la première année après le diagnostic de l'IC et plus de 80% dans les 8 années suivantes (Benjamin *et al.*, 2019). Chez la femme, le risque de développer une IC est de 4% plus faible que chez l'homme jusqu'à la ménopause mais pas après; par contre, le pronostic de l'IC est plus sévère chez la femme avec 5 à 10% de mortalité en plus (Benjamin *et al.*, 2019; Cenko *et al.*, 2019; Magnussen *et al.*, 2018).

I.3 - Etiologies de l'IC et prévalence de la cause ischémique

L'IC est le point de confluence de la plupart des pathologies cardiovasculaires (Ponikowski *et al.*, 2016). Les causes qui peuvent conduire à la survenue d'une IC sont multiples: une lésion du myocarde, un défaut de chargement du cœur en sang, une arythmie et une malformation (Ponikowski *et al.*, 2016). Dans les pays industrialisés, 60-70% des cas d'IC sont dus à des lésions ischémiques (privation en oxygène et en substrats métaboliques), provoquées généralement par un infarctus du myocarde (IDM) (Shore *et al.*, 2015) (**Introduction I.4**). D'autres causes peuvent entraîner une lésion du myocarde et une IC: une cardiotoxicité liée à une exposition à l'alcool, aux métaux lourds et aux médicaments anti-tumoraux, une réponse immunitaire comme après une

INTRODUCTION

infection, une infiltration tumorale, une dérégulation hormonale (cas du diabète) ou nutritionnelle et une mutation génétique (Ponikowski *et al.*, 2016). Les causes restantes d'IC sont liées soit à une anomalie de chargement du cœur en sang en cas d'hypertension par exemple, soit à une arythmie cardiaque (Ponikowski *et al.*, 2016).

I.4 - L'infarctus du myocarde (IDM)

L'IDM désigne la mort des cellules du myocarde en réponse à une ischémie provoquée par un défaut d'irrigation du myocarde en sang (Thygesen *et al.*, 2019). Dans la majorité des cas, l'évènement déclencheur de l'ischémie est l'occlusion d'une artère coronaire par un thrombus (caillot sanguin) formé après la rupture d'une plaque d'athérome, essentiellement composée de lipides (Thygesen *et al.*, 2019) (**Figure 1**).

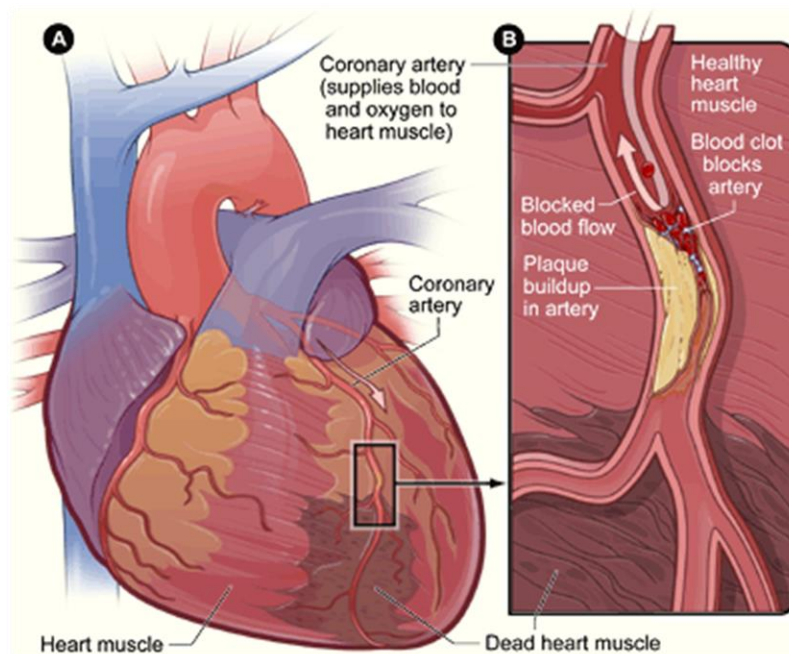


Figure 1: Infarctus du myocarde (National Heart, Lung and Blood Institute). (A) Cœur avec une zone infarctée en noir. (B) coupe transversale de l'artère coronaire obstruée par une accumulation de plaque athéromateuse et de cellules sanguines.

Le ventricule gauche (VG) est plus affecté par l'IDM que le ventricule droit (VD): les autopsies de patients issus d'un service de coronarographie montrent que seuls 3% des IDM affectent exclusivement le VD alors que 25% des IDM affectent à la fois le VD et le VG (Andersen *et al.*, 1987). La forte prévalence de l'IDM dans le VG est expliquée par l'importante connectivité du VG avec le réseau artériel cardiaque et par les fortes contraintes de pressions qui s'y exercent du fait de sa structure elliptique, sensible à la déformation (Andersen *et al.*, 1987). Par ailleurs, les besoins métaboliques du VD étant plus faibles que ceux du VG, les conséquences de l'ischémie y sont moindres (Andersen *et al.*, 1987).

INTRODUCTION

Pendant l'ischémie, le défaut d'apport en oxygène s'accompagne d'un arrêt ou d'un ralentissement de la chaîne respiratoire mitochondriale et de la phosphorylation oxydative, normalement en charge de 95% de la production d'énergie cardiaque sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) (Gibb *et al.*, 2018). Le défaut d'apport en substrats métaboliques et notamment en acides gras, s'accompagne d'un *switch* métabolique de la beta-oxydation des acides gras vers la glycolyse anaérobie, qui nécessite moins d'oxygène pour produire de l'ATP mais favorise l'accumulation intracellulaire de protons, acidifiant la cellule, et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'anion superoxyde (O₂⁻) (Gibb *et al.*, 2018). L'acidification de la cellule active l'échangeur sodium/protons (Na⁺/H⁺) qui permet d'éliminer une partie des protons accumulés au prix d'un flux entrant de Na⁺ (Gibb *et al.*, 2018). La diminution du gradient sodique entraîne l'inversion du fonctionnement de l'échangeur sodium/calcium, à l'origine d'une augmentation cytosolique de calcium (Ca²⁺) (Gibb *et al.*, 2018). Les ROS réduisent la biodisponibilité de molécules cardioprotectrices comme le monoxyde d'azote (NO) et oxydent notamment la pompe ATPase calcique du réticulum endoplasmique (SERCA), ce qui inhibe le retour du calcium cytosolique vers le réticulum endoplasmique (Schluter *et al.* 1995). L'excès de calcium cytosolique est déplacé dans les mitochondries (Giorgi *et al.*, 2018), ce qui déclenche l'ouverture permanente du port de transition de perméabilité mitochondriale, ce qui rend la mitochondrie perméable et peut mener à la rupture de sa membrane externe (Bernardi *et al.*, 2015). En conséquence, des molécules comme le cytochrome c sont libérées dans le cytosol, ce qui initie une mort cellulaire par nécrose ou, si les niveaux d'ATP sont suffisants, par apoptose (Del Re *et al.*, 2019). Alors que les cellules apoptotiques sont fragmentées en corps apoptotiques qui sont recyclés par le système lysosomal des cellules qui les absorbent comme les macrophages, le contenu des cellules nécrosées se déverse dans l'espace extracellulaire et entraîne une réponse inflammatoire. Les isoformes cardiaques des troponines T et I, produites par les cardiomyocytes, sont libérées dans la circulation en cas de nécrose et leurs taux plasmatiques sont des indicateurs de l'IDM proportionnels à la taille de la zone infarctée (Thygesen *et al.*, 2019). L'implication de 10 autres mécanismes de mort cellulaire comme par exemple: la ferroptosis et la pyroptosis témoigne de la diversité de la réponse à l'IDM et ouvre de nouvelles perspectives dans la recherche d'indicateurs pronostiques après l'IDM (Del Re *et al.*, 2019).

Après 10-15 min d'ischémie, des anomalies ultrastructurales sont détectées au niveau de la membrane des cellules myocardiques (Jennings *et al.* 1974). Après 40-60 min d'ischémie, le tiers interne de l'épaisseur de la paroi du myocarde est infarcté puis, l'IDM s'étend progressivement de l'endocarde vers l'épicarde (Reimer & Jennings *et al.* 1979). L'ischémie myocardique induit rapidement des lésions irréversibles conditionnées par 5 facteurs: la durée de l'ischémie, la taille

INTRODUCTION

de la région du myocarde vascularisée par l'artère coronaire occluse, le degré de réduction du débit sanguin myocardique, l'existence d'un réseau artériel collatéral, et les interventions visant à protéger le myocarde de l'ischémie (Thygesen *et al.*, 2019).

Les recommandations actuelles en cas d'IDM insistent sur la nécessité de reperfusion le patient par fibrinolyse et angioplastie de l'artère coronaire occluse le plus rapidement possible afin de réduire la sévérité de l'IDM (Van de Werf *et al.*, 2014). Le réapprovisionnement brutal en oxygène du myocarde est à l'origine de lésions de reperfusion: la réactivation de la chaîne respiratoire mitochondriale et de la phosphorylation oxydative décuple les concentrations intracellulaires de ROS, ce qui favorise les processus de mort cellulaire (Ibanez *et al.*, 2015). Les systèmes antioxydants, comme celui qui convertit O_2^- en H_2O_2 par l'intermédiaire des superoxydes dismutases (SODs) et l' H_2O_2 en eau (H_2O) par l'intermédiaire des catalases, des peroxyredoxines et de la glutathion peroxydase protègent les cellules contre l'ischémie/reperfusion (Wang *et al.*, 1998). Cliniquement, les lésions de reperfusion peuvent se manifester par: des arythmies ventriculaires, une sidération myocardique (dysfonction temporaire du myocarde), l'obstruction microvasculaire liée à la compression des microvaisseaux par un œdème, et l'agrandissement de la zone infarctée (Ibanez *et al.*, 2015).

L'IDM entraîne une adaptation cardiovasculaire immédiate pour maintenir la perfusion des organes vitaux. La surcharge volumique du VG entraîne immédiatement une dilatation du ventricule qui augmente l'étirement des fibres musculaires, ce qui engendre une contraction plus forte lors de la systole suivante (loi de Franck-Starling). D'autre part, les perturbations hémodynamiques et contractiles provoquées par l'IDM activent les barorécepteurs artériels (sensibles aux changements de pression), les chimiorécepteurs (sensibles à l'hypoxie) et les ergorécepteurs du myocarde (sensibles à la contraction musculaire), ce qui déclenche l'activation des systèmes neuro-hormonaux (Hartupée *et al.*, 2017). L'activation rapide du système nerveux sympathique en réponse à la diminution de pression artérielle entraîne la libération d'adrénaline et de noradrénaline (dont l'agoniste synthétique est l'isoprénaline), qui stimulent les récepteurs α -adrénergiques (essentiellement présents dans les vaisseaux) et β -adrénergiques (fortement exprimés dans le myocarde mais aussi présents dans les vaisseaux coronaires et les reins) (Hartupée *et al.*, 2017). L'activation du récepteur β_1 -adrénergique (>80 % des récepteurs β -adrénergiques) induit des effets inotropes (augmentation de la force de contraction) et chronotropes positifs (augmentation de la fréquence de contraction) et augmente la vasoconstriction artérielle et veineuse (Hartupée *et al.*, 2017). Dans les reins, l'activation du récepteur β_1 -adrénergique déclenche au niveau des cellules juxta-glomérulaires la libération de rénine, qui convertit l'angiotensinogène, une protéine inactive produite par le foie, en

INTRODUCTION

angiotensine I qui est à son tour transformée par l'enzyme de conversion à l'angiotensine en angiotensine II, un vasoconstricteur (Hartupee *et al.*, 2017). Dans le cœur, l'angiotensine I est convertie en angiotensine II par la chymase. La liaison de l'angiotensine II à son récepteur de type 1 (AT₁) dans la zone glomérulée des glandes surrénales déclenche la libération d'aldostérone (Hartupee *et al.*, 2017). L'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone stimule la réabsorption de sodium (Na⁺) dans les tubules rénaux et le colon, entraînant des mouvements d'eau et d'électrolytes et l'augmentation du volume plasmatique. La rétention hydrosodée dans le plasma mène à l'activation de mécanismes vasodilatateurs impliquant notamment les peptides natriurétiques (Hartupee *et al.*, 2017). Ainsi, l'angiotensine II favorise la redistribution du sang dans le cœur et augmente sa contractilité.

La réduction de la masse contractile après l'IDM est irréversible. Pour éviter l'effondrement de la structure et de la fonction cardiaque, les réponses mécaniques (loi de Franck-Starling) et neuro-hormonales ont un rôle adaptatif mais l'activation chronique de ces mécanismes peut parfois conduire à un remodelage mal-adaptatif du cœur et conduire à l'IC (Sutton & Sharpe, 2000).

1.5 - Le remodelage ventriculaire gauche (RVG) après un IDM

1.5.1 - Définition du RVG après un IDM

Le remodelage cardiaque désigne l'ensemble des événements cellulaires et interstitiels entraînant une modification progressive de la structure et de la fonction du cœur en réponse à la surcharge de pression et/ou de volume (Cokkinos & Belogiannas, 2016). Le remodelage physiologique du cœur, observé chez les sportifs et les femmes enceintes par exemple, est considéré comme un processus adaptatif et bénéfique. Par contre, le remodelage physiopathologique du cœur et plus particulièrement du VG (RVG), causé principalement par l'IDM, peut devenir un processus mal-adaptatif et délétère qui conduit à l'IC (Sutton & Sharpe, 2000; Bauters *et al.*, 2017). Le RVG après un IDM est caractérisé par l'expansion de la zone infarctée et par la dilatation progressive du VG (Sutton & Sharpe, 2000) (**Figure 2**).

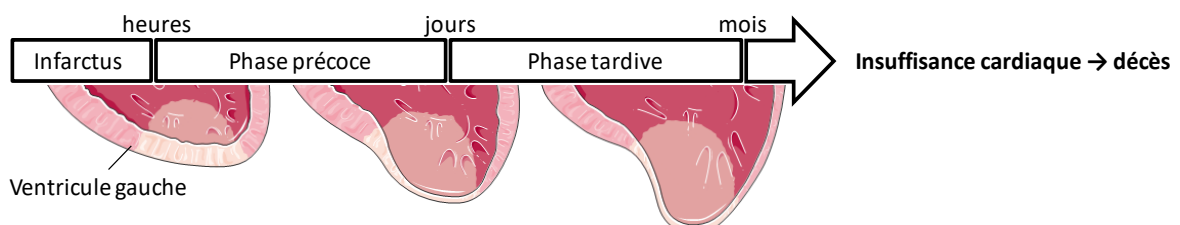


Figure 2: Remodelage du ventricule gauche après un infarctus du myocarde. La zone infarctée est indiquée en rose clair.

INTRODUCTION

La perte irréversible de la zone infarctée dans le VG peut entraîner l'apparition de segments akinétiques ou dyskinétiques (Sutton & Sharpe, 2000). L'augmentation de la pression dans le VG après l'IDM entraîne une consolidation progressive du myocarde afin de restaurer un stress pariétal normal (loi de Laplace). Tant que le stress pariétal n'est pas compensé, la surcharge volumique du VG continue d'augmenter la dilatation du VG pour tenter d'améliorer sa force de contraction (loi de Frank-Starling).

I.5.2 - Mécanismes physiopathologiques du RVG après un IDM

Le RVG est un procédé complexe et dynamique qui implique différents types cellulaires dans le myocarde. Les mécanismes cellulaires activés par le RVG après l'IDM comprennent l'inflammation par les leucocytes, la cicatrisation ou fibrose cardiaque par les fibroblastes cardiaques et l'hypertrophie des cardiomyocytes (Sutton & Sharpe, 2000). Plus récemment, l'analyse de la composition cellulaire dans le cœur sain de souris, montre que les cellules endothéliales sont majoritaires. En effet, parmi les cellules cardiaques on dénombre 48% de cellules endothéliales, 25% de cardiomyocytes, au moins 10% de fibroblastes cardiaques et 7% de leucocytes (Pinto *et al.*, 2019). Les cellules endothéliales vasculaires, non détaillées dans ce rapport, permettent la néovascularisation du myocarde lors du RVG après l'IDM (Li *et al.*, 2019).

I.5.2.1 - L'inflammation

La nécrose du tissu cardiaque génère un gradient chimiotactique inflammatoire au niveau de la zone infarctée (ROS et motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMPs) et des cellules endothéliales des vaisseaux (facteur de nécrose tumorale α , interleukines 1β et I), entraînant le recrutement de fibroblastes pro-inflammatoires et de leucocytes comme les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les macrophages qui maintiennent la viabilité du myocarde en prenant en charge les débris des cellules mortes (Frangogiannis *et al.*, 2014). L'infiltration des leucocytes dans la zone infarctée est favorisée par la libération de métalloprotéinases matricielles (MMPs), qui dégradent la matrice extracellulaire (Frangogiannis *et al.*, 2014). L'activité des MMPs est régulée par des inhibiteurs spécifiques comme les TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*), également libérés dans la zone infarctée (Nielsen *et al.*, 2019). La matrice extracellulaire est une structure, composée majoritairement de fibres de collagène, qui maintient l'architecture tissulaire (Nielsen *et al.*, 2019). Lors de la réponse inflammatoire, la dégradation de la matrice extracellulaire amincit la zone infarctée et participe à son extension (Nielsen *et al.*, 2019).

INTRODUCTION

I.5.2.2 - La fibrose cardiaque

La fibrose cardiaque est définie par une accumulation excessive de matrice extracellulaire dans le myocarde (Tallquist *et al.*, 2017). Après l'IDM, la fibrose cardiaque permet de cicatriser la zone infarctée mais son activation excessive conduit à la rigidification du myocarde et est à l'origine de la plupart des dysfonctions diastoliques, des anomalies de contraction et des arythmies (Nielsen *et al.*, 2019). La cicatrisation, avec l'œdème inflammatoire, peut entraver le système vasculaire en ralentissant les flux d'oxygène et de nutriments, et déclencher des douleurs de poitrine symptomatiques (angor) (Nielsen *et al.*, 2019).

Les principaux effecteurs de la synthèse de la matrice extracellulaire lors de la fibrose cardiaque sont les fibroblastes cardiaques qui s'activent et se transforment progressivement en myofibroblastes cardiaques pour produire plus de matrice extracellulaire (Tallquist *et al.*, 2017).

In vitro, les fibroblastes cardiaques cultivés en 3 dimensions dans une matrice de collagène sont fusiformes, sans fibres de stress et ne produisent pas beaucoup de matrice extracellulaire (Shinde *et al.*, 2017). Au contraire, les fibroblastes cardiaques cultivés en 1 dimension pendant 2 passages présentent une morphologie d'étoile avec des fibres de stress, caractéristique d'une transformation en myofibroblastes (Shinde *et al.*, 2017). L'implication des différents phénotypes des fibroblastes cardiaques dans la réparation du myocarde et dans la fibrose cardiaque reste méconnue. La diversité fonctionnelle des fibroblastes cardiaques peut refléter une activation séquentielle de populations distinctes de fibroblastes cardiaques ou témoigner d'une plasticité importante des fibroblastes cardiaques pour coordonner leurs réponses de manière dynamique face aux perturbations de leur microenvironnement.

Bien que plusieurs marqueurs protéiques des fibroblastes et des myofibroblastes ont été proposés (**Tableau 1**), leur spécificité est limitée: leur identification nécessite d'exclure les marqueurs des autres cellules cardiaques (Humeres & Frangogiannis, 2019).

INTRODUCTION

Tableau 1: Sensibilité et spécificité des marqueurs de fibroblastes cardiaques

Marqueur	Sensibilité	Spécificité
Vimentine	Marquage de tous les fibroblastes.	Marquage des cardiomyocytes, des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses vasculaires.
α -SMA	Marquage des fibroblastes activés et des myofibroblastes mais pas des fibroblastes quiescents.	Marquage des cardiomyocytes, des cellules musculaires lisses vasculaires et des péricytes.
Col1 α 1	Marquage de tous les fibroblastes.	Marquage de la matrice extracellulaire. DéTECTÉE en faible quantité dans les cellules endothéliales, les cellules immunitaires, les cellules musculaires lisses vasculaires et les péricytes.
Périostine	Marquage des fibroblastes quiescents et des fibroblastes activés néonataux mais pas adultes.	Marquage des sous-types de cellules musculaires lisses vasculaires.
Fibronectine	Marquage des fibroblastes activés.	Marquage de la matrice extracellulaire. Peut être détectée dans d'autres cellules comme les macrophages et les cellules endothéliales.
PDGFR α	Marquage des fibroblastes quiescents et activés.	Marquage des cellules musculaires lisses vasculaires en condition de stress.
DDR2	Marquage de tous les fibroblastes qui expriment la vimentine et Col1 α 1.	Marquage en condition de stress des cellules musculaires lisses vasculaires et des cellules endothéliales.
Antigène reconnu par MEFSK4	Marquage des fibroblastes qui expriment la PDGFR α et Col1 α 1.	Marquage des péricytes.
CD90	Marquage d'un sous-type de fibroblastes.	Marquage des cellules immunitaires, des cellules endothéliales lymphatiques et des péricytes.
Sca1	Marquage d'un sous-type de fibroblastes comprenant 60% des cellules exprimant PDGFR α et Col1 α 1.	Marquage des cellules endothéliales et des péricytes.
Tcf21	Marquage de la majorité des fibroblastes mais peut-être pas ceux exprimant α -SMA.	Ne marque pas les cellules immunitaires exprimant CD45, les cellules musculaires lisses vasculaires et les cellules endothéliales.
FSP1	Ne marque pas les fibroblastes quiescents ni les cellules exprimant α -SMA.	Marquage des macrophages, des cellules musculaires lisses vasculaires et des cellules endothéliales.
FAP	Marquage des fibroblastes activés mais pas des fibroblastes quiescents et des myofibroblastes.	Marquage de sous-types de cellules immunitaires et des cellules endothéliales.

INTRODUCTION

Les fibroblastes cardiaques sont sensibles aux stress mécaniques et chimiques causés par l'IDM (Herum *et al.*, 2017) (Figure 3).

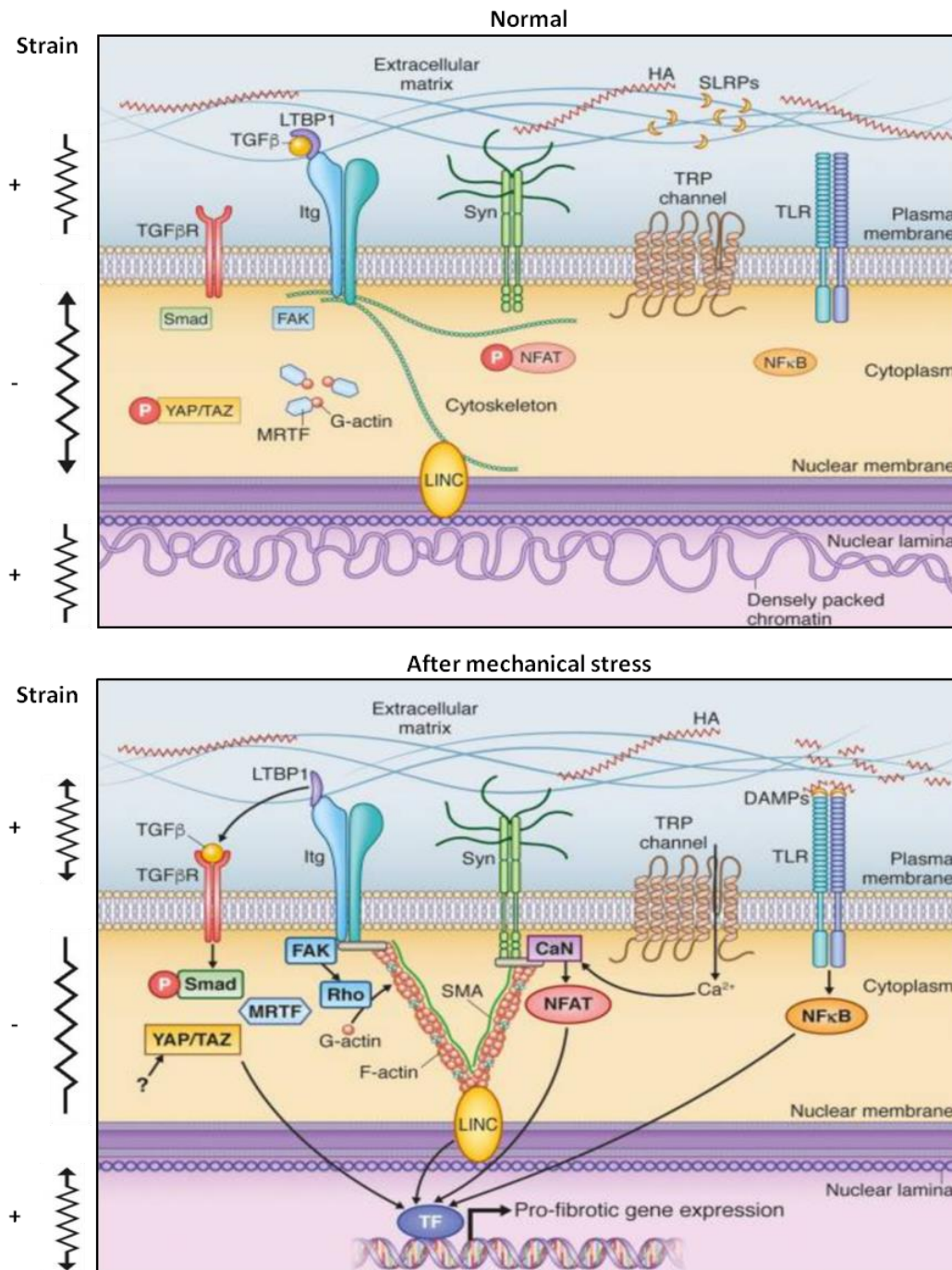


Figure 3: Activation de la fibrose dans les fibroblastes cardiaques (Herum *et al.* 2017). HA (Hyaluronic Acid); SLRPs (small leucine-rich proteoglycans); TGF-β (transforming growth factor beta); LTBP1 (latent TGF-β binding protein 1); TGF-βR (TGF-β receptor); intégrines (itg); syndécane (syn); canal TRP (transient receptor potential); TLR (toll-like receptor); FAK (focal adhesion kinase); YAP (Yes-associated protein); TAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif); MRTF (myocardin-related transcription factor); NFAT (nuclear factor of activated T-cells); NFκ-B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells); DAMPs (danger-associated molecular patterns); CaN (calcineurin); α-SMA (alpha smooth muscle -actin); LINC (linker of nucleoskeleton and cytoskeleton), facteur de transcription (TF).

INTRODUCTION

Le premier stress à survenir après l'IDM est mécanique et peut réguler la fibrose cardiaque (Humeres & Frangogiannis, 2019).

La dégradation de la matrice extracellulaire dans le myocarde diminue les liaisons entre les intégrines situées à la membrane des fibroblastes cardiaques et les composants de la matrice extracellulaire, ce qui peut activer l'un des 150 partenaires connus des intégrines comme la protéine kinase FAK (*Focal Adhesion Kinase*) (Seong *et al.*, 2013). FAK est un senseur important du stress mécanique dont l'activation favorise la production de matrice extracellulaire et la transformation des fibroblastes cardiaques en myofibroblastes (Seong *et al.*, 2013). *In vitro*, FAK est activée par les intégrines (Seong *et al.*, 2013) et les facteurs de croissances (Leask, 2013), ce qui induit l'activation de la voie des PI3K/AKT (*phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B*) et ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*) qui favorisent la transformation en myofibroblastes (Zhang *et al.*, 2017). *In vivo*, l'inhibition pharmacologique de FAK par un compétiteur à ATP diminue la fibrose cardiaque après l'IDM induit par ligature de l'artère coronaire chez le rat (Zhang *et al.*, 2017).

Le cytosquelette des fibroblastes cardiaques réagit aux déformations structurelles entraînées par la diminution de l'adhésion avec la matrice extracellulaire et les cellules du myocarde. Par exemple, l'activation de la protéine GTPase RhoA active la protéine kinase Rho (ROCK) qui favorise l'apparition de fibres de stress composées notamment d'actine α du muscle lisse (α -SMA), augmentant les capacités d'adhésion de la cellule et limitant les déformations structurelles (Herum *et al.* 2017). L'apparition des fibres de stress implique un assemblage des actines G en polymères d'actine F, ce qui libère le facteur de transcription MRTF (*myocardin-related transcription factor*) et induit sa relocalisation dans le noyau (Herum *et al.* 2017). La voie de signalisation des ROCKs (ROCK1 et ROCK2) active MRTF et les coactivateurs YAP/TAZ (*yes-associated protein/transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*) (Sharma *et al.*, 2019), ce qui favorise l'assemblage des filaments d'actine en fibres de stress et active les MAPKs, ce qui augmente la prolifération, la survie, la migration et la différenciation des fibroblastes cardiaques (Herum *et al.* 2017). *In vivo*, l'inhibition pharmacologique de ROCK1 diminue la fibrose dans un modèle de ligature de l'artère coronaire de rat (Luo *et al.*, 2017). L'inhibition de ROCK2, au contraire de celle de ROCK1, augmente l'expression cardiaque des facteurs de croissance du tissu conjonctif (CTGF) et des fibroblastes (FGF2) chez la souris, ce qui suggère que ROCK2 est un inhibiteur de la fibrose cardiaque (Shimizu *et al.*, 2017). Le noyau des fibroblastes cardiaques est sensible à l'augmentation des forces de tension sur le cytosquelette: le complexe LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton), localisé à la membrane nucléaire, est tracté par les fibres de

INTRODUCTION

stress du cytosquelette vers le cytoplasme, ce qui déforme le noyau et peut entraîner des changements transcriptionnels (Alam *et al.*, 2016).

D'autre part, la composition du milieu extracellulaire régule la fibrose cardiaque (Humeres & Frangogiannis, 2019).

Les DAMPs, comme les fragments d'acide hyaluronique issus des cellules mortes de la zone infarctée, se fixent sur les récepteurs TLRs (*toll-like receptors*) des fibroblastes cardiaques, ce qui entraîne la relocalisation nucléaire du facteur de transcription NFκB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) et favorise l'acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire des fibroblastes cardiaques. L'acidification de la zone infarctée déclenche un influx de calcium dans le cytoplasme des fibroblastes cardiaques via les canaux cationiques non spécifiques TRPs (*Transient Receptor Potential*), ce qui active la phosphatase calcineurine, qui déphosphoryle le facteur de transcription NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) pour induire sa relocalisation dans le noyau, ce qui favorise l'activation des fibroblastes cardiaques (Sharma *et al.*, 2017).

Les fibroblastes cardiaques expriment aussi les chémorécepteurs sensibles à l'activation des systèmes neuro-hormonaux après l'IDM (Saucerman *et al.*, 2019). *In vitro*, la stimulation du système beta-adrénergique par l'isoprénaline augmente la production de molécules pro-inflammatoires comme l'interleukine 6 (IL6) et active les MAPKs, ce qui favorise la prolifération des fibroblastes cardiaques (Sun *et al.*, 2015). *In vivo*, la stimulation chronique du système beta-adrénergique par l'isoprénaline ou par la surexpression des récepteurs beta-adrénergiques active la fibrose cardiaque (Nguyen *et al.*, 2015). L'activation de la fibrose cardiaque *in vivo* implique aussi des facteurs sécrétés par d'autres cellules en réponse à la stimulation beta-adrénergique comme les cardiomyocytes. La fixation de l'angiotensine II sur son récepteur AT1 augmente l'expression de AT1 et la production de TGF-β (*transforming growth factor β*) (Campbell *et al.*, 1997). La plupart des cellules du myocarde sécrète du TGF-β complexé avec un peptide de latence (LTBP1) qui le rend inactif. L'activation du TGF-β nécessite la dissociation du complexe de latence par différents médiateurs comme les ROS et les intégrines de surface, ce qui entraîne sa fixation sur les récepteurs au TGF-β des fibroblastes cardiaques qui se dimérisent et se phosphorylent, ce qui active les SMADs et favorise la transformation en myofibroblastes (Staufenberger *et al.*, 2001). L'angiotensine II diminue aussi l'activité des MMPs et augmente celle des TIMPs, ce qui inhibe la dégradation de la matrice extracellulaire (Pan *et al.*, 2008).

De par leur sensibilité mécanique et chimique, les fibroblastes cardiaques développent des phénotypes fonctionnels différents pour réparer le myocarde après l'IDM (**Figure 4**) (Humeres & Frangogiannis, 2019).

INTRODUCTION

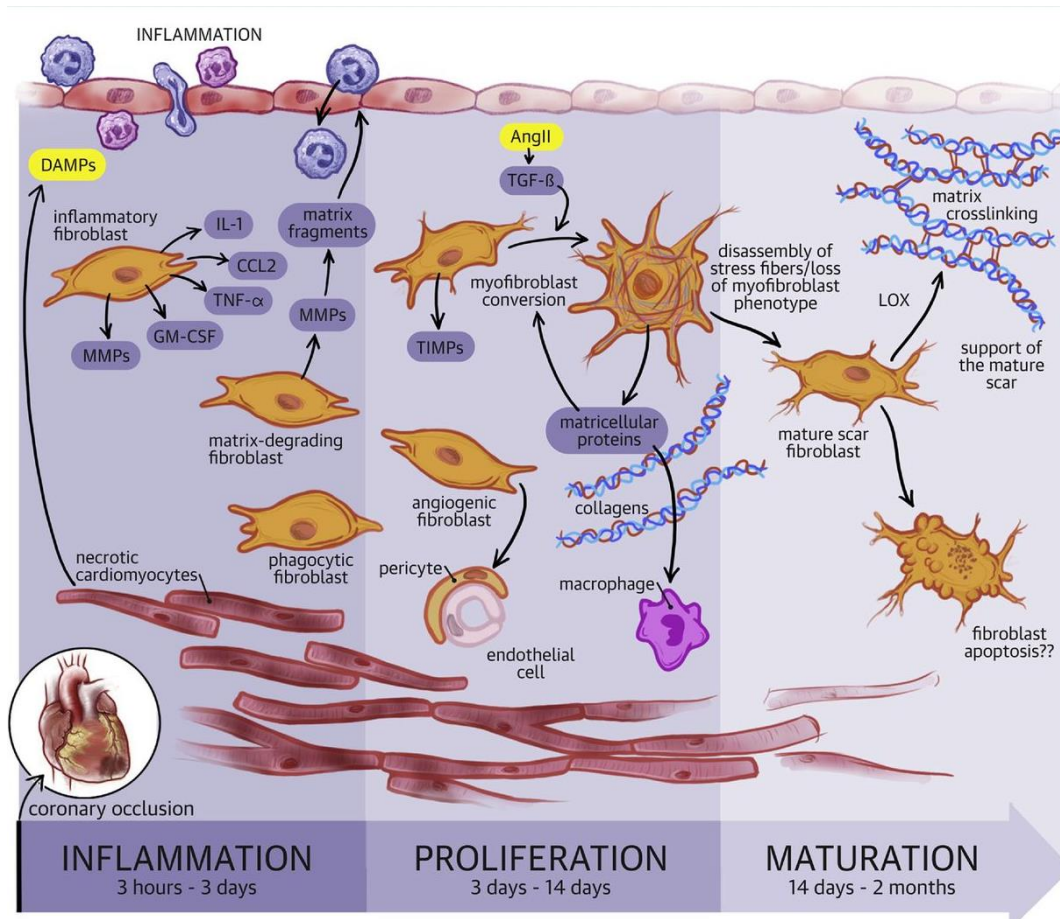


Figure 4: Diversité fonctionnelle des fibroblastes cardiaques après un IDM (Humeres & Frangogiannis, 2019). Angiotensine II (AngII); TGF-β (transforming growth factor beta); DAMPs (*danger-associated molecular patterns*); Interleukine 1 (IL-1); CCL2 (*chemokine (C-C motif) ligand 2*); facteur nécrosant α (TNF-α); facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF); métalloprotéinases matricielles (MMPs); inhibiteurs des MMPs (TIMPs); lysine oxydase (LOX).

Les fibroblastes cardiaques répondent à leur microenvironnement en adaptant leur phénotype inflammatoire, angiogénique et leur synthèse de matrice extracellulaire (Humeres & Frangogiannis, 2019). Les DAMPs libérés par les cellules mortes activent le phénotype pro-inflammatoire des fibroblastes cardiaques qui sécrètent des chimiokines comme CCL2 et des cytokines comme l'interleukine 1 (IL-1), le facteur nécrosant α (TNF-α) et le facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF), ce qui favorise le recrutement et l'activation des leucocytes. La stimulation des fibroblastes cardiaques par les cytokines entraîne la sécrétion de métalloprotéinases qui dégradent la matrice extracellulaire et favorisent l'infiltration du myocarde par les leucocytes. La relative contribution des fibroblastes cardiaques face aux macrophages dans la phagocytose des cellules mortes reste méconnue. La clairance des cellules mortes dans le myocarde mène à une réponse anti-inflammatoire et à l'augmentation du nombre de fibroblastes cardiaques. L'augmentation du nombre de fibroblastes cardiaques est liée à

INTRODUCTION

l'augmentation de leur prolifération et à leur recrutement principalement depuis l'épicarde (Tallquist *et al.*, 2017). Les fibroblastes cardiaques acquièrent ensuite un phénotype de myofibroblastes qui favorise la production de protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène. Par ailleurs, les fibroblastes cardiaques pourraient réguler la néovascularisation du myocarde en favorisant le recrutement des cellules vasculaires murales (cellules endothéliales et les péricytes). Enfin, lorsque la cicatrice fibreuse est formée, un désassemblage des fibres de stress peut être observé dans les myofibroblastes. Ces derniers adoptent à nouveau un phénotype similaire aux fibroblastes cardiaques et peuvent libérer des enzymes comme la lysine oxydase (LOX) qui emmêle les fibres de la matrice extracellulaire entre elles, ce qui favorise la consolidation de la cicatrice. La réduction du nombre de myofibroblastes dans la cicatrice mature pourrait impliquer un mécanisme de régulation anti-fibrotique par apoptose (Humeres & Frangogiannis, 2019).

I.5.2.3 - L'hypertrophie cardiaque

Deux types d'hypertrophie cardiaque sont classiquement décrits. L'un s'appelle "concentrique", l'autre "excentrique". L'hypertrophie concentrique est observée en cas de pression anormalement élevée chez les patients hypertendus par exemple; elle est caractérisée par une augmentation de l'épaisseur de la paroi du VG avec une cavité de taille inchangée ou diminuée (Grossman, 1980). L'hypertrophie excentrique est observée en cas de surcharge volumique lors du RVG après l'IDM par exemple; elle est caractérisée par une augmentation de l'épaisseur de la paroi du VG avec une cavité de taille augmentée proportionnellement (Grossman, 1980) (**Figure 5**). L'hypertrophie cardiaque après l'IDM a d'abord été considérée comme adaptative car elle diminue les contraintes pariétales. Pourtant, l'hypertrophie non-physiologique du VG est associée à un mauvais pronostic (Haider *et al.*, 1998). En effet, l'hypertrophie du VG peut devenir pathologique notamment lorsqu'elle réduit la densité des capillaires sanguins irrigant le myocarde (Oldfield *et al.*, 2019).

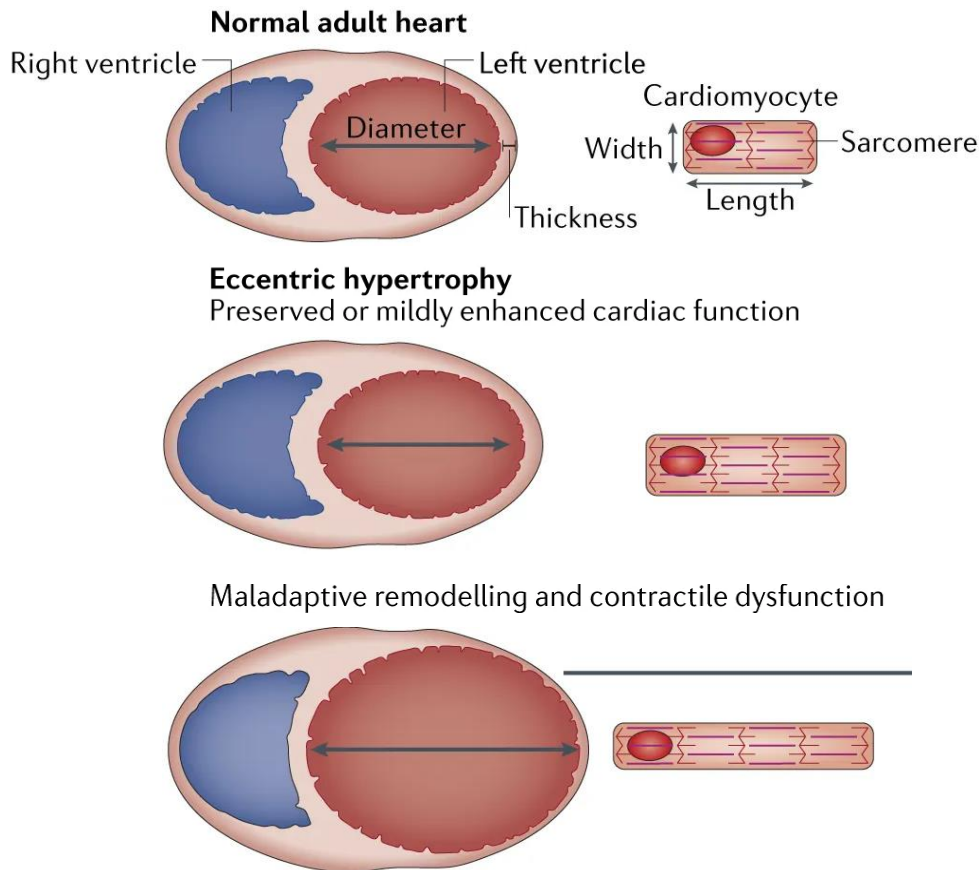


Figure 5: Hypertrophie excentrique du cœur et des cardiomyocytes après un IDM (Nakamura *et al.*, 2018).

Les principaux effecteurs de l'hypertrophie excentrique du cœur après l'IDM sont les cardiomyocytes qui occupent 70% du volume du myocarde (Grossman, 1980). Les cardiomyocytes adultes ne prolifèrent quasiment pas: ceux qui meurent après l'IDM ne sont pas remplacés (Bergmann *et al.*, 2009). Les cardiomyocytes de la zone non infarctée s'hypertrophient pour compenser la perte de contractilité du myocarde. Alors que l'hypertrophie concentrique du cœur est caractérisée par l'addition de sarcomères en parallèle dans les cardiomyocytes, ce qui les rend plus épais, l'hypertrophie excentrique du cœur est caractérisée par l'addition de sarcomères en série dans les cardiomyocytes, ce qui les rend plus longs (Grossman, 1980) (**Figure 5**). Le sarcomère est l'unité contractile du cardiomyocyte qui résulte de l'assemblage des protéines contractiles comme les troponines et la myosine de muscle lent (SMM) avec des protéines du cytosquelette comme la desmine et l' α -actinine (**Figure 6**). Le sarcomère correspond au segment entre 2 disques Z (de l'allemand *zwischen*, signifiant "entre").

INTRODUCTION

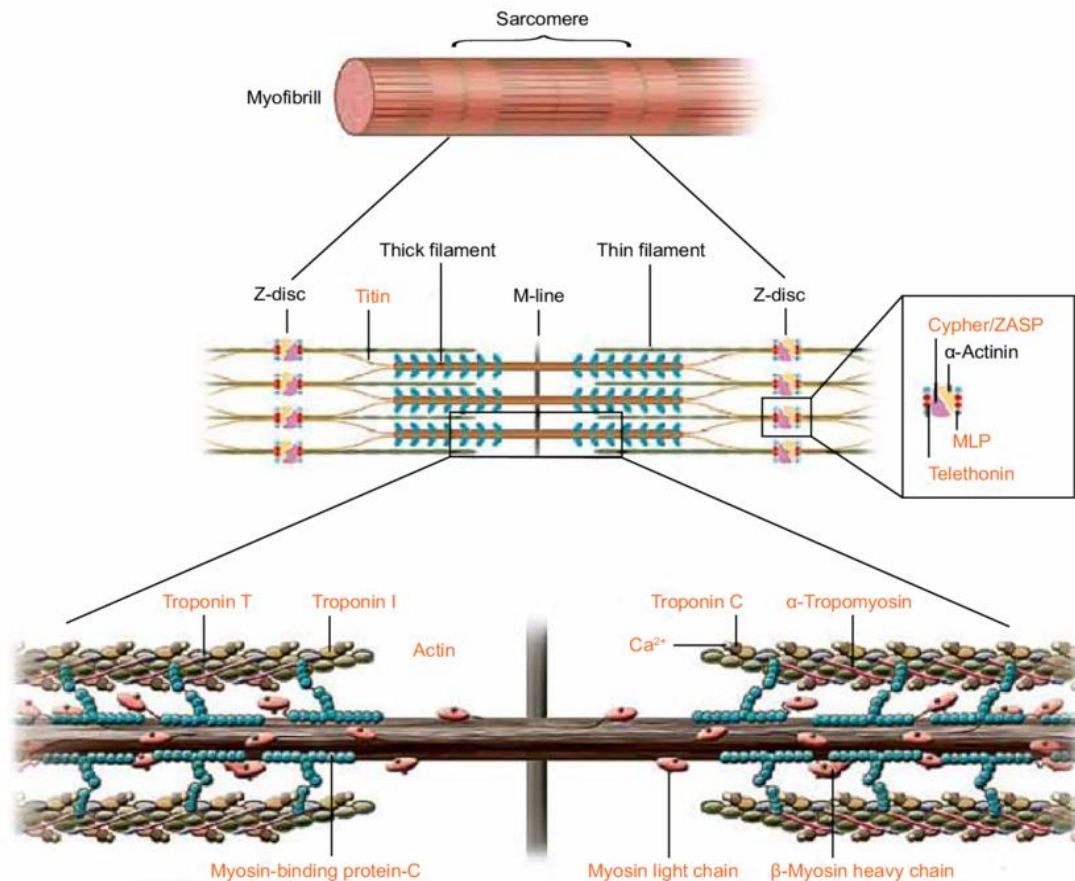


Figure 6: Structure et composition d'un sarcomère de cardiomyocyte. Les disques Z (de l'allemand zwischen, signifiant "entre") sont composés notamment de la protéine Cypher/ZASP aussi connue sous le nom de Ldb3 (*Lim domain binding protein 3*) et de MLP (*Muscle LIM Protein*). Le nom du domaine LIM dérive des trois protéines où il a été découvert: Lin-11 de *Caenorhabditis elegans*, Isl-1 de rat, et Mec-3 de *C. elegans* (Li *et al.*, 2012). Le domaine LIM consiste en une structure en doubles doigts de zinc riche en résidus cystéines.

Tout comme les fibroblastes cardiaques, les cardiomyocytes sont sensibles aux stress chimiques et mécaniques causés par l'IDM (Saucerman *et al.*, 2019) (Figure 7). La composition du milieu extracellulaire est un déterminant critique de l'hypertrophie cardiaque (Nakamura *et al.*, 2018). Tout comme les fibroblastes cardiaques, les cardiomyocytes expriment des TLRs, des TRPs, des récepteurs aux neuro-hormones, dont l'activation après l'IDM favorise l'hypertrophie (Saucerman *et al.*, 2019). Les facteurs neuro-hormonaux conduisent à l'activation de plusieurs voies de signalisation (comme celles impliquant PI3K/Akt, les MAPK et la calcineurine) qui peuvent activer des facteurs nucléaires entraînant la synthèse de protéines impliquées dans l'hypertrophie (Nakamura *et al.*, 2018). La plupart des traitements modernes utilise les bêtabloquants et les inhibiteurs de l'enzyme de conversion à l'Angiotensine II afin de retarder ou d'inverser le remodelage délétère du myocarde. Cependant, certains individus continuent à remodeler malgré ces traitements, montrant que d'autres facteurs sont impliqués dans l'hypertrophie. Parmi eux, le stress mécanique joue un rôle important (Saucerman *et al.*, 2019) (Figure 7).

INTRODUCTION

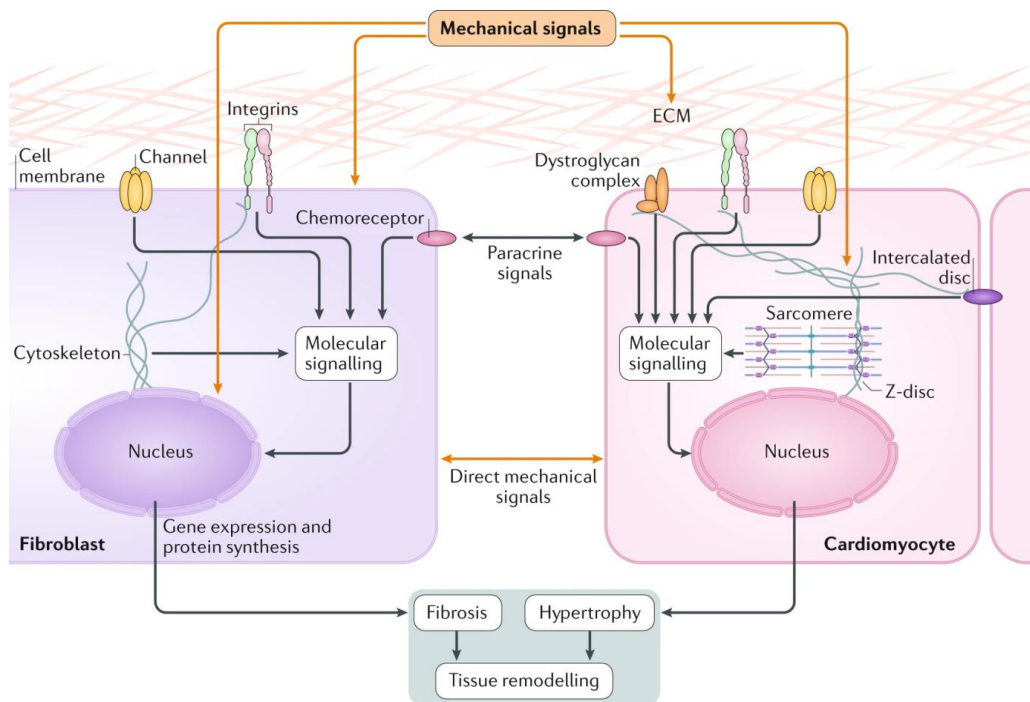


Figure 7: Mécanotransduction de l'activation de la fibrose dans les fibroblastes cardiaques et de l'hypertrophie cardiomyocytaire (Saucerman *et al.*, 2019). Matrice extracellulaire (ECM).

La diminution des liaisons entre les intégrines des cardiomyocytes et les composants de la matrice extracellulaire après l'IDM perturbe la transmission des forces issues de la contraction vers l'extérieur des cardiomyocytes et active les kinases ILK (*Integrin-Linked Kinase*) et FAK. La kinase ILK est un régulateur important de la pompe SERCA, ce qui réduit l'influx calcique dans le réticulum endoplasmique et augmente le calcium cytoplasmique. La calcineurine, une phosphatase capable de déphosphoryler NFAT, est activée par le calcium et régule la contractilité (Traister *et al.*, 2014). La kinase FAK induit une réorganisation des sarcomères et participe à l'hypertrophie (Kovacic-Milivojevic *et al.*, 2001). Le complexe associé à la dystroglycane est un autre point d'ancrage des cardiomyocytes à la matrice extracellulaire. *In vivo*, la mutation de la dystrophine, l'un des partenaires des dystroglycanes, mène à la dystrophie musculaire de Duchenne caractérisée par un affaiblissement de la contractilité (Ervasti *et al.* 1993). *In vitro*, la diminution des liaisons entre le complexe dystrophine des cardiomyocytes et les composants de la matrice extracellulaire altère leur capacité à produire du monoxyde d'azote (NO), ce qui réduit leur capacité à se protéger d'un stress et favorise leur dilation (Garbincius *et al.*, 2015).

Alors que la mécanotransduction par le cytosquelette des fibroblastes cardiaques passe principalement par les filaments d'actine, celle des cardiomyocytes passe aussi par les sarcomères à l'origine de la contraction et les disques Z qui les relient au cytosquelette (Saucerman *et al.*,

INTRODUCTION

2019). Les protéines de liaison aux disques Z sensibles au stress mécanique comprennent la protéine à domaine LIM MLP (Li *et al.*, 2012), impliquée *in vitro* dans l'ancrage aux disques Z de la calcineurine ce qui augmente la quantité de calcium intracellulaire et favorise l'hypertrophie des cardiomyocytes (Heineke *et al.*, 2005). Chez les souris déficientes en MLP, la calcineurine n'est plus activée après un IDM, ce qui entraîne un taux de mortalité plus élevé que chez les souris sauvages, montrant ainsi que la compartimentation de la calcineurine au niveau des disques Z des cardiomyocytes par la MLP favorise une hypertrophie adaptative en cas de stress mécanique (Heineke *et al.*, 2005). Tout comme les fibroblastes cardiaques, les cardiomyocytes expriment le complexe LINC qui connecte la membrane nucléaire avec le cytosquelette et les sarcomères via ses partenaires comme la lamine, régulant la morphologie du noyau en cas de stress mécanique, ce qui peut entraîner des changements transcriptionnels (Enyedi *et al.*, 2017). *In vivo*, la mutation de la lamine peut causer des laminopathies caractérisées par une dystrophie musculaire, ce qui suggère que le noyau est un senseur du stress mécanique qui pourrait participer à l'hypertrophie cardiomyocytaire (Schreiber *et al.*, 2013).

La mécanotransduction responsable de l'hypertrophie des cardiomyocytes est aussi initiée par des interactions cellule-cellule. Les disques intercalaires forment les jonctions longitudinales entre les cardiomyocytes et participent au couplage mécanique et électrique nécessaire à la contractilité du myocarde (Saucerman *et al.*, 2019). En réponse à une surcharge de volume comme après l'IDM, les disques intercalaires des cardiomyocytes modifient leur ultrastructure en association avec l'addition en série de sarcomères, suggérant qu'ils sont impliqués dans l'hypertrophie (Yoshida *et al.* 2010). Les 3 types de jonctions des disques intercalaires comprennent les jonctions d'ancrage du cytosquelette d'actine avec les sarcomères via les caténines notamment, les filaments intermédiaires des desmosomes qui connectent les cytosquelettes de deux cellules voisines, et les jonction communicantes, perméables aux molécules inférieures à 480 Daltons, qui permettent de propager les flux métaboliques et électriques (Saucerman *et al.*, 2019). Les caténines recrutent la vinculine en réponse à un stress mécanique, activant ainsi les coactivateurs YAP/TAZ, ce qui favorise la réorganisation du cytosquelette des cardiomyocytes (Vite *et al.*, 2018). *In vivo*, la déficience en caténine altère la structure des disques intercalaires et mène à une cardiomyopathie dilatée (Vite *et al.*, 2018). Une mutation au niveau des protéines des desmosomes, comme la desmogléine 2, entraîne un découplage mécanique des cardiomyocytes et une altération des sarcomères, à l'origine d'une cardiomyopathie arythmique (Pilichou *et al.*, 2006). Les jonctions communicantes sont composées de protéines comme la connexine 43 dont l'expression est augmentée après un stress mécanique, ce qui élève le nombre de jonctions communicantes et accélère la vitesse de conduction des flux

INTRODUCTION

métaboliques et électriques (Salameh *et al.*, 2010). Les interactions directes entre les cardiomyocytes et les fibroblastes cardiaques participent aussi au couplage mécanique et électrique nécessaire à la contractilité du myocarde (Saucerman *et al.*, 2019). Après l'IDM, la perte des interactions entre les fibroblastes et les cardiomyocytes favorise la survenue d'arythmies: *in vivo* la surexpression de la connexine 43 réduit le risque d'arythmie (Roell *et al.*, 2018).

De par leur sensibilité mécanique et chimique, les cardiomyocytes acquièrent un phénotype hypertrophique (**Figure 8**) (Nakamura *et al.*, 2018).

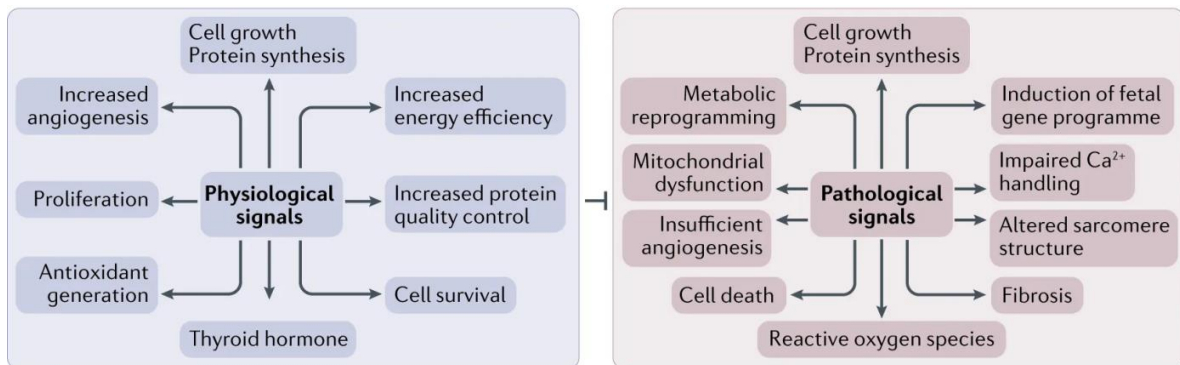


Figure 8: Voies de signalisation de l'hypertrophie adaptative (en bleu) et pathologique (en rouge) des cardiomyocytes après l'IDM (Nakamura *et al.*, 2018).

L'hypertrophie du cardiomyocyte après l'IDM est adaptative et réversible lorsque le système antioxydant et la survie cellulaire sont activés (Abel *et al.*, 2011). La production d'énergie est alors proportionnelle à l'augmentation des besoins métaboliques du cardiomyocyte pour qu'il puisse combiner l'augmentation de la charge de travail et la synthèse des nouvelles protéines nécessaires au processus hypertrophique (Abel *et al.*, 2011). L'hypertrophie des cardiomyocytes après l'IDM peut devenir mal-adaptative si les stress mécaniques et chimiques sont trop intenses. L'excès de calcium et de ROS intracellulaires accumulés dans le cardiomyocyte hypertrophié peut mener à une dysfonction des mitochondries, à une reprogrammation métabolique, à une réexpression des gènes fœtaux, à une accumulation de protéines et d'organelles défectueuses et à une altération de la structure des sarcomères (Nakamura *et al.*, 2018). Au niveau des protéines contractiles des cardiomyocytes, l'isoforme β de la chaîne lourde de la myosine est augmentée tandis que l'isoforme α est diminuée, ce qui réduirait la vitesse de contraction du VG (Bernardo *et al.*, 2010). De plus, l'isoforme squelettique de l' α -actine est exprimée à la place de l'isoforme cardiaque, ce qui pourrait aussi altérer la contraction cardiaque (Taegtmeyer *et al.*, 2010).

1.6 - Evaluation diagnostique, pronostique et fonctionnelle des patients après l'IDM

Après l'IDM, les patients sont évalués par des critères morphométriques et fonctionnels permettant de diagnostiquer le RVG et l'IC afin de mieux les prendre en charge. Ces critères sont

INTRODUCTION

répertoriés dans les classifications de l'ACCF/AHA (*American College of Cardiology Foundation/American Heart Association*) (Yancy *et al.*, 2017) et de la NYHA (*New York Heart Association*) (Ponikowski *et al.* 2016) (**Tableau 2**).

Tableau 2: Classifications de l'insuffisance cardiaque (IC)

Stades pronostiques de l'ACCF/AHA		Classes fonctionnelles de la NYHA	
A	Patients à risque d'IC mais sans anomalie structurelle ventriculaire ni symptôme		
B	Anomalie structurelle ventriculaire mais absence de symptôme	I	Aucune limitation de l'activité physique. Les gestes du quotidien ne sont pas limités.
C	Anomalie structurelle ventriculaire avec symptômes anciens ou actuels	II	Confortable au repos. Les gestes importants s'accompagnent d'une dyspnée ou les gestes quotidiens s'accompagnent d'un essoufflement minime
		III	Confortable au repos. Les gestes du quotidien s'accompagnent d'un essoufflement important
		IV	Incapable d'effectuer une activité physique en raison de l'essoufflement. La dyspnée peut être présente au repos.
D	IC réfractaire nécessitant un traitement spécifique		

L'IC est indiquée du moins sévère au plus sévère par du vert, jaune, orange et rouge. ACCF/AHA: *American College of Cardiology Foundation/American Heart Association*; NYHA: *New York Heart Association*.

Le stade ACCF/AHA renseigne sur l'évolution de l'IC, à partir de l'exposition aux facteurs de risques cardiovasculaires et des anomalies structurelles avant et après l'apparition des symptômes (Yancy *et al.*, 2017). La classe NYHA repose sur un interrogatoire subjectif du patient IC et insiste sur ses capacités au repos et à l'effort (Ponikowski *et al.* 2016). Le stade ACCF/AHA et la classe NYHA fournissent des informations complémentaires sur la sévérité de l'IC. Alors que le stade ACCF/AHA est progressif et irréversible, la classe NYHA peut évoluer vers l'aggravation ou l'amélioration (van der Meer *et al.*, 2019). En pratique clinique, ces critères morphométriques et fonctionnels sont associés à des mesures de certains paramètres moléculaires pour décider de la stratégie thérapeutique à adopter.

1.6.1 - Les paramètres électriques et morphométriques cardiaques

En pratique clinique, le premier examen réalisé après l'hospitalisation d'un patient avec suspicion d'IDM est l'électrocardiogramme (ECG) (Thygesen *et al.*, 2019). L'ECG permet de détecter un trouble de la repolarisation du myocarde de type sus-décalage du fragment ST, indiquant une occlusion brutale et complète d'une artère épigardique. L'imagerie cardiaque par

INTRODUCTION

résonance magnétique (IRM) et plus couramment car moins cher, l'échocardiographie permettent de détecter les anomalies de structure et de fonction afin de confirmer le diagnostic de l'IDM (Thygesen *et al.*, 2019). La mesure de la taille de la zone ischémique est accessible en scintigraphie myocardique par IRM. La mesure de l'intensité de l'ischémie est accessible par coronarographie et par tomographie par émission de positons (TEP) après marquage à l'oxygène 15 (^{15}O).

La mesure du volume du VG lorsque qu'il est dilaté à son maximum en fin de diastole (VFD) et lorsqu'il est contracté à son maximum en fin de systole (VFS) est accessible par IRM et par échocardiographie. Historiquement, le RVG après un IDM est défini par une augmentation de 20% du VFD du VG entre les jours qui suivent l'IDM et en général entre 4 à 12 mois après l'IDM lorsque le VG est remodelé (Sutton & Sharpe, 2000). Basée sur cette définition, l'incidence du RVG est de plus de 30% après un IDM antérieur massif (Savoye *et al.*, 2006; Fertin *et al.*, 2010) et de 17% après un IDM non-antérieur (Masci *et al.*, 2011). Malgré l'amélioration des thérapies actuelles et des essais cliniques prometteurs, le RVG reste associé à l'insuffisance cardiaque et à la mortalité cardiovasculaire 10 ans après un IDM antérieur (Cung *et al.*, 2015; Bauters *et al.*, 2017). En opposition avec le RVG, le RVG inverse est défini par une réduction de 10% du volume du VG (VFS). Le RVG inverse est détecté chez 39% des patients 6 mois après un IDM antérieur et est associé à l'absence d'événements délétères 2 ans après l'IDM (Funaro *et al.*, 2009).

La notion de RVG après l'IDM est toujours complétée par d'autres indicateurs de la dysfonction du VG comme l'augmentation du VFS et la réduction de la fraction d'éjection du VG (FEVG). La FEVG est définie par la différence entre le VFD et le VFS du VG normalisée par le VFD du VG (Bulluck *et al.*, 2017; Rodriguez-Palomares *et al.*, 2019). Par ailleurs, les valeurs seuils des paramètres morphométriques utilisées pour définir le RVG après l'IDM sont arbitraires et n'incluent pas toujours les patients avec le plus mauvais pronostic (Bulluck *et al.*, 2017). Une étude récente montre qu'en définissant le RVG après l'IDM par une augmentation de 15% du VFD du VG et une diminution de 3% de la FEVG permet d'identifier les patients avec le pronostic le plus défavorable (Rodriguez-Palomares *et al.*, 2019). L'analyse combinée de différents paramètres morphométriques pour définir le RVG après l'IDM permettrait une meilleure stratification des risques d'IC (Bulluck *et al.*, 2017) (**Figure 9**).

Les patients sans IC ou avec une IC diastolique (défaut de remplissage du cœur en sang) ont une FEVG préservée ($\geq 50\%$) tandis que les patients avec une IC systolique (défaut d'éjection du sang par le cœur), notamment après un IDM, ont une FEVG réduite ($< 40-50\%$) (Ponikowski *et al.*, 2016). En cas de FEVG supérieure à 40%, le diagnostic de l'IC nécessite en pratique clinique d'être validé par la présence d'anomalies fonctionnelles et structurelles comme la dilatation de

l'oreillette gauche et l'hypertrophie du VG (Ponikowski *et al.* 2016). Bien que la FEVG semble discriminer l'IC diastolique et l'IC systolique, la plupart des patients IC présente des dysfonctions à la fois diastoliques et systoliques. Il est donc important d'identifier au mieux l'étiologie de l'IC. De plus, la mesure de la FE étant dépendante de la technique d'imagerie, de la méthode d'analyse et des opérateurs, les termes d'IC à FE préservée ou réduite sont préférés aux termes d'IC à fonction systolique préservée ou réduite.

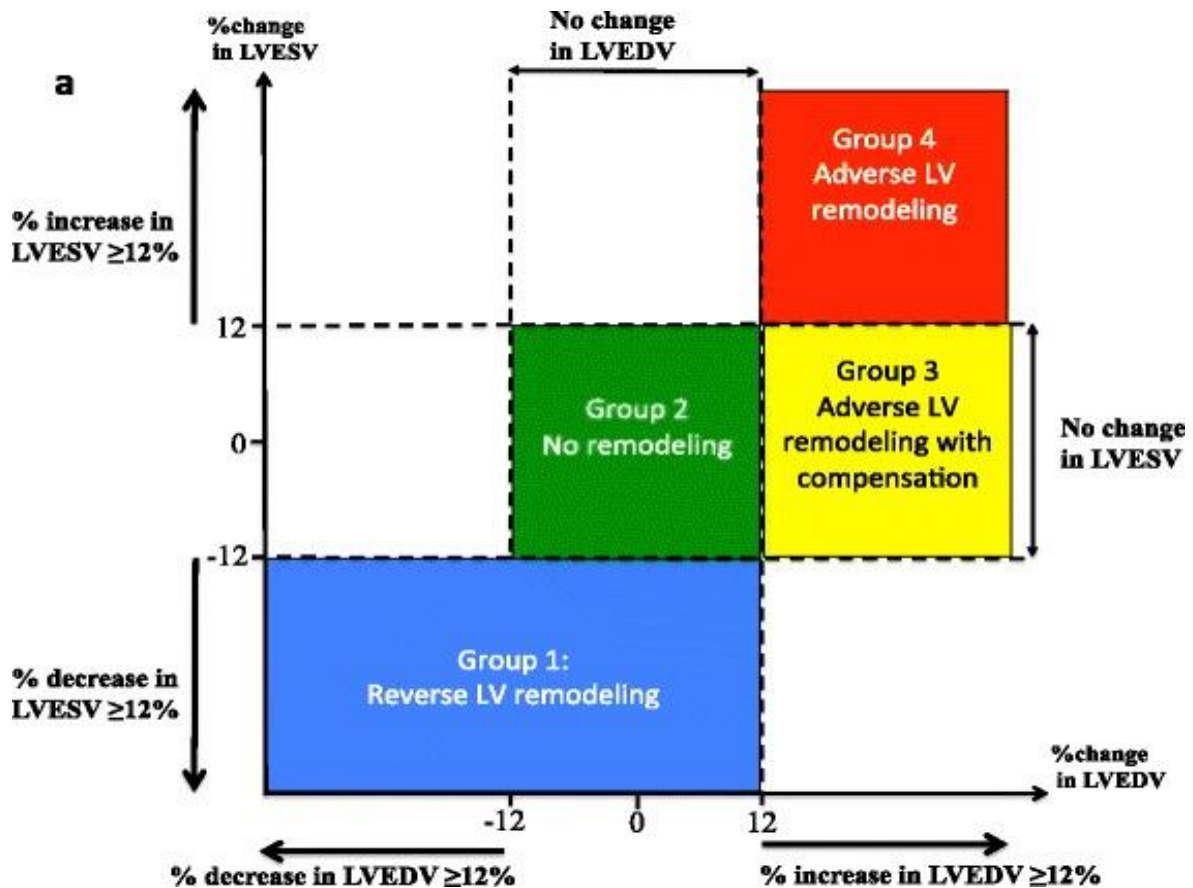


Figure 9: Exemple de différents groupes de remodelage du ventricule gauche (LV) après un infarctus du myocarde (IDM) basée sur le volume final du LV en systole (LVESV) et en diastole (LVEDV) (Bulluck *et al.*, 2017). Dans cette étude menée sur seulement 40 patients après un IDM de type sus-décalage du fragment ST, le remodelage du LV est défini entre 4 jours et 5 mois après l'IDM par des paramètres morphométriques mesurés par résonance magnétique (plus sensible que l'échocardiographie).

1.6.2 - Les paramètres moléculaires circulants

Dans le sang, l'expression de certaines molécules peut être modulée par la présence d'anomalies cardiaques, ce sont des biomarqueurs: leur niveau d'expression peut permettre de détecter ces anomalies de manière non-invasive et aider à établir le diagnostic et/ou le pronostic des patients après un IDM (Figure 10) (Magnussen *et al.*, 2018).

INTRODUCTION

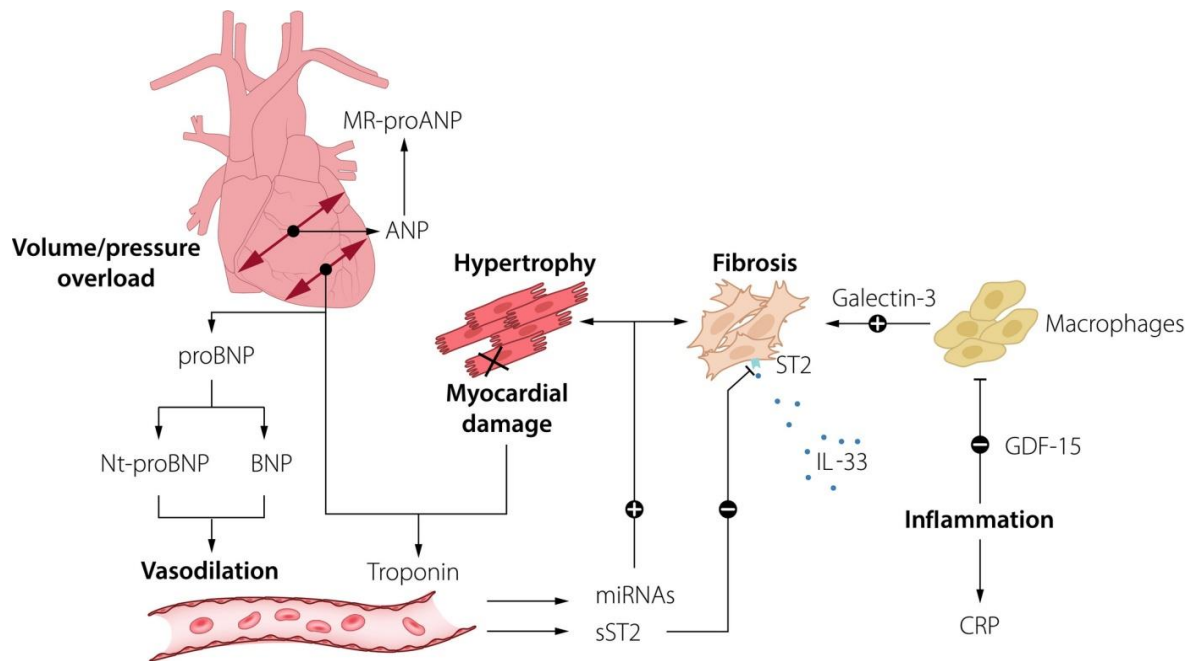


Figure 10: Biomarqueurs des événements cardiaques après un IDM dans la circulation (Magnussen *et al.*, 2018). Peptides natriurétiques atriaux (ANP) et cérébraux (BNP); précurseur du BNP (proBNP) et de l'ANP (proANP); fragment N-terminal issu du proBNP (NT-proBNP); région médiane issue du proANP (MR-proANP); protéine (soluble) de suppression tumorale 2 ((s)ST2); protéine C-Réactive (CRP); facteur 15 de croissance et de différenciation (GDF-15); Interleukine 33 (IL-33).

La libération de peptides natriurétiques atriaux (ANP) et cérébraux (BNP) est stimulée par les oreillettes en réponse aux contraintes d'étirement auriculaire (de Bold *et al.*, 1996). La stimulation de la synthèse de BNP favorise le clivage de sa forme précurseur (Pro-BNP) qui produit le BNP et le fragment N-terminal du proBNP (NT-pro-BNP) (de Bold *et al.*, 1996). Le BNP favorise la vasodilatation, ce qui diminue le travail cardiaque. Le NT-proBNP est inerte mais plus stable dans le plasma que le BNP, 120 heures et 20 minutes respectivement. En pratique clinique, les quantités plasmatiques de BNP et de NT-proBNP sont augmentées chez les patients IC à FEVG réduite ou préservée et sont associées à un mauvais pronostic (Ponikowski *et al.* 2016). L'augmentation plasmatique de BNP est considérée comme un marqueur de l'hypertrophie pathologique car le BNP n'est pas modulé par l'hypertrophie physiologique induite par l'exercice (Buttrick *et al.*, 1994). On peut cependant noter que le degré d'hypertrophie est généralement beaucoup plus faible dans l'adaptation à l'exercice que dans la surcharge volumique après un IDM. L'ANP est quant à lui dégradé trop rapidement dans le sang pour être utilisé en pratique clinique mais le produit issu du clivage de la région médiane de la forme précurseur de l'ANP (MR-proANP) est stable et a été identifié comme un indicateur de l'IC comme le BNP et le NT-proBNP mais sa sensibilité est plus faible (Seronde *et al.*, 2013). Les peptides natriurétiques sont aussi des

INTRODUCTION

indicateurs diagnostiques et pronostiques d'une hypertension ou d'une dysfonction du VD indépendante de la fonction du VG (Magnussen *et al.*, 2018).

Les isoformes cardiaques des troponines (cTn) T et I sont libérées lors de la nécrose cardiomyocytaire proportionnellement à la taille de la zone infarctée et sont stables dans le sang jusqu'à 6 jours après l'IDM (Thygesen *et al.*, 2019). En pratique clinique, les quantités plasmatiques de cTnT et cTnI sont utilisées pour confirmer de manière non-invasive le diagnostic de l'IDM (Thygesen *et al.*, 2019). Le dosage plasmatique des cTn est préféré à celui d'autres indicateurs de la souffrance cardiaque comme l'isoforme cardiaque de la créatine kinase (CK-MB) qui est moins spécifique de l'ischémie et est dégradée plus rapidement dans le sang (Thygesen *et al.*, 2019).

La protéine de suppression tumorale 2 (ST2) est le récepteur de l'interleukine 33 (IL33) et elle est impliquée dans la cardioprotection contre l'athérosclérose (Miller *et al.*, 2008), l'hypertrophie et la fibrose chez la souris (Sanada *et al.*, 2007). ST2 existe sous forme transmembranaire dans les cellules musculaires lisses vasculaires, les cardiomyocytes et les fibroblastes cardiaques et sous forme soluble dans le sang (sST2). Le facteur sST2 inhibe la fixation de IL33 sur ST2, ce qui réduit la cardioprotection (Kakkar *et al.*, 2008). Bien que la libération de sST2 ait d'abord été mise en évidence dans des cardiomyocytes soumis à un stress mécanique (Weinberg *et al.*, 2002), sST2 est produite majoritairement par les tissus extracardiaques en réponse à une inflammation et un stress pro-fibrotique (Pascual-Figal *et al.* 2015). Le facteur sST2 est associé à l'IC mais sa faible spécificité réduit son intérêt diagnostique face aux peptides natriurétiques et aux cTn. Cependant, sST2 permet une meilleure stratification des patients IC à risques (Yancy *et al.*, 2017) et est associé au RVG après l'IDM (Gaggin *et al.*, 2014).

La protéine C-Réactive (CRP), le facteur 15 de croissance et de différenciation (GDF-15) et la galectine 3 sont des biomarqueurs de l'inflammation. CRP est une protéine produite principalement par le foie et libérée lors de l'inflammation qui est activée lors de l'IDM et en cas d'IC pendant les épisodes de décompensation cardiaque (Minami *et al.*, 2017). L'élévation plasmatique de CRP est associée à un mauvais pronostic chez les patients IC sans infection bactérienne ou virale (Lourenco *et al.*, 2010; Kempf *et al.*, 2007). L'élévation plasmatique de GDF-15 est associée avec la FEVG et le NT-proBNP plasmatique mais indique un mauvais pronostic indépendamment de l'IC (Wang *et al.*, 2019). La galectine-3 est produite par les macrophages activés, notamment après l'IDM, et favorise l'activation de la fibrose cardiaque et de l'IC (Magnussen *et al.*, 2018). L'élévation plasmatique de galectine-3 est associée à l'IC avec moins de sensibilité que le NT-proBNP mais sa détection permettrait une meilleure stratification des patients IC à risques (Brouwers *et al.*, 2014)

INTRODUCTION

Les seuils de référence des paramètres moléculaires de l'IDM sont déterminés à partir de populations saines, or ces paramètres peuvent être affectés par plusieurs facteurs. Les niveaux plasmatiques de cTn par exemple sont modulés par le sexe, l'âge, la fonction rénale, la fonction ventriculaire gauche et la présence de troubles inflammatoires majeurs (Romiti *et al.*, 2019). Pour éviter les erreurs d'interprétation, il est nécessaire de combiner les paramètres moléculaires de l'IDM avec d'autres indicateurs complémentaires de l'IC (Magnussen *et al.*, 2018).

La combinaison de différents biomarqueurs s'est révélée indispensable pour le diagnostic et/ou pronostic des patients après un IDM (Magnussen *et al.*, 2018) et pour le suivi de leur réponse thérapeutique et de leur évolution clinique (Egerstedt *et al.*, 2019). Cependant le RVG reste difficile à prédire en pratique clinique. La recherche de nouveaux biomarqueurs pour prédire le RVG après l'IDM pourrait améliorer la stratification des risques chez les patients afin d'identifier ceux qui bénéficieront le plus des différentes thérapies existantes dans le but de réduire l'incidence de l'IC (Ponikowski *et al.* 2016).

II - Recherche d'une signature moléculaire circulante pour prédire le RVG après un IDM

II.1 - Les données omiques et la biologie des systèmes

Le développement des techniques omiques à haut débit permet d'analyser simultanément un grand nombre de cibles sans hypothèse préalable. Les différents types de données omiques comprennent la génomique (polymorphisme nucléotidique des gènes), la transcriptomique (l'expression des ARNs), la protéomique (étude des protéines et de leurs modifications post-traductionnelles), la métabolomique (étude des métabolites) et ses dérivés comme la glycomique, la lipidomique et la fluxomique (étude des glycanes, des lipides et des flux métaboliques respectivement), l'envirome (facteurs environnementaux) et le microbiome (ensemble des bactéries, champignons et autres micro-organismes contenus dans l'organisme) (Joyce *et al.*, 2006, Horgan *et al.*, 2011) (**Figure 11**).

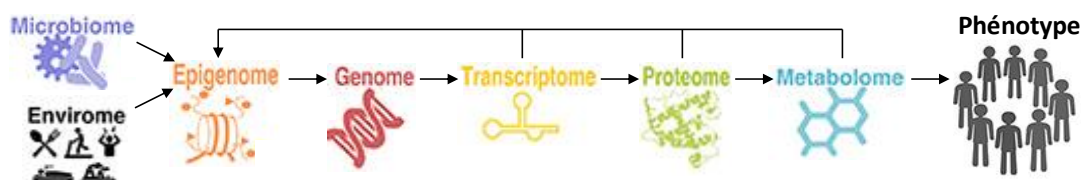


Figure 11: Les données omiques (Horgan *et al.*, 2011)

L'étude des protéines et des métabolites inclut l'analyse de leur expression, leurs interactions, leur fonction et leur structure. Les variables omiques sont régulées par des facteurs épigénétiques comme les microARNs (**Introduction II.3**). En principe, les données omiques sont considérées comme un reflet du phénotype étudié car elles contiennent de nombreuses informations sur la

INTRODUCTION

réponse cellulaire et/ou tissulaire à une exposition et/ou un état pathologique (Horgan *et al.*, 2011). En pratique, chaque approche omique résulte d'un compromis entre quantité de données mesurées et qualité de détection (précision, sensibilité, quantification et identification). Un seul appareil permet de couvrir de manière limitée un type de données omiques qui reflètent alors imparfaitement le phénotype étudié.

La comparaison des données omiques entre 2 conditions, une physiologique et une pathologique par exemple, peut permettre de mettre en évidence de nouvelles voies physiopathologiques et/ou de nouveaux biomarqueurs en rapport avec cette pathologie. Cependant, le sens biologique de ces données omiques est souvent difficile à établir.

Afin de favoriser la compréhension du rôle fonctionnel des molécules dans un phénotype (Joyce *et al.*, 2006), les approches omiques actuelles utilisent la biologie des systèmes qui correspond au développement d'une vision systémique des données omiques pour identifier des signatures moléculaires associées à une pathologie et mettre en évidence de nouvelles stratégies thérapeutiques (Vilne & Schunkert, 2018) (**Figure 12**).

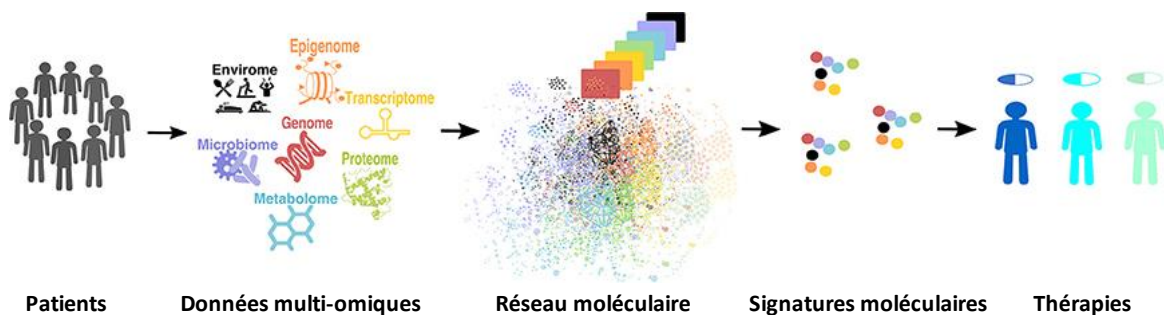


Figure 12: Intégration des données multi-omiques pour identifier des signatures moléculaires associées à une pathologie et mettre en évidence de nouvelles stratégies thérapeutiques (Vilne & Schunkert, 2018)

La plupart des données omiques sont répertoriées et annotées *in silico* dans des bases de données mises à jour régulièrement. Les annotations comprises dans les bases de données omiques comprennent des informations diverses. La base de données *Gene Ontology*, par exemple, contient des annotations moléculaires dérivées de la littérature sur la fonction moléculaire, le compartiment subcellulaire et le processus cellulaire (Ashburner *et al.*, 2000; *The Gene Ontology Consortium*, 2019). D'autres bases de données comme STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) contiennent des données d'interactions entre les molécules (Szklarczyk *et al.*, 2019).

La biologie des systèmes permet de combiner *in silico* les données (multi)omiques issues d'une (ou plusieurs) approche(s) et les annotations disponibles dans des bases de données. La combinaison des données (multi)omiques d'un phénotype avec les annotations disponibles dans

INTRODUCTION

des bases de données permet de prédire l'implication de certaines molécules dans le phénotype étudié et de construire des réseaux d'interactions moléculaires (Azuaje *et al.* 2012). Un réseau d'interactions moléculaires se définit comme un groupe de molécules appelées « nœuds » connectées entre elles par différents types d'interactions appelées « liens » (Azuaje *et al.* 2012). Dans un réseau moléculaire, chaque nœud peut être défini par les annotations disponibles dans les bases de données omiques comme celles de *Gene Ontology* (Ashburner *et al.*, 2000; *The Gene Ontology Consortium*, 2019).

La compréhension d'un réseau d'interactions moléculaires nécessite une combinaison d'approches analytiques. Les tests statistiques univariés comme le test de Student ou de Mann-Whitney permettent d'identifier les variables quantitatives modulées entre 2 phénotypes et au temps étudié. Puisqu'un grand nombre de variables est analysé simultanément, il est nécessaire d'utiliser des méthodes de correction de type FDR (*False Discovery Rate*) pour limiter le risque d'obtenir des modulations faussement significatives. Les analyses statistiques multivariées comme l'analyse de composantes principales et le test de régression peuvent aussi être utilisés pour identifier le nœud ou la combinaison de nœuds le plus associé au phénotype recherché. Les régions du réseau d'interactions moléculaires (nœuds et liens) modulées à un temps donné en termes d'expression ou d'activité par exemple sont appelées « modules actifs ». Les modules actifs, comme les événements moléculaires, sont éphémères et leur évolution dans le temps peut indiquer une association plus forte des nœuds qu'ils comprennent avec le phénotype recherché (Pinet *et al.*, 2017).

Le degré de connectivité de chaque nœud au sein d'un réseau d'interactions moléculaires indique son importance biologique présumée dans le phénotype étudié. Le degré de connectivité d'un nœud peut être estimé par la mesure de la centralité d'intermédiarité qui correspond au nombre de chemins les plus courts passant par ce nœud entre toutes les paires de nœuds possibles (Oldham *et al.*, 2019) (**Figure 13**).

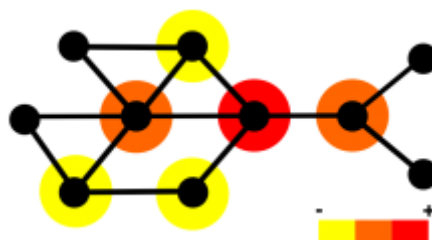


Figure 13: Analyse de la centralité d'intermédiarité dans un réseau d'interactions moléculaires (Oldham *et al.*, 2019). Le nœud rouge a la centralité d'intermédiarité la plus élevée car un grand nombre de plus courts chemins passent par ce nœud.

INTRODUCTION

L'extraction des modules actifs et/ou la priorisation des nœuds par la centralité d'intermédiarité dans un réseau d'interactions moléculaires permettent d'identifier des signatures moléculaires associées au phénotype recherché (Pinet *et al.*, 2017). En effet, les nœuds avec les différences les plus grandes entre les 2 phénotypes sont plus faciles à détecter dans un échantillon biologique et les nœuds avec les plus grandes centralités d'intermédiarité semblent plus représentatifs (spécifiques) du phénotype étudié. Comme les biomarqueurs individuels, une signature moléculaire d'un état pathologique doit être hautement sensible et spécifique et être détectable de manière reproductible, standardisée et peu coûteuse. Une signature moléculaire composée d'un petit nombre de molécules circulantes est préférée à une signature invasive qui est dangereuse pour le patient. Récemment, l'utilisation d'une approche de protéomique à haut débit combiné avec une approche de biologie des systèmes et un modèle statistique a permis d'identifier 6 protéines permettant de prédire le décès précoce des patients avec une IC systolique (Cuvelliez *et al.*, 2019).

II.2 - Les microARNs

II.2.1 - La biogénèse des microARNs

Les microARNs sont des petits ARNs ne codant pour aucune protéine et qui sont composés d'environ 22 nucléotides issus de la transcription par l'ARN polymérase II des régions codantes et plus fréquemment non codantes du génome (de Rie *et al.*, 2017). Les microARNs découverts à travers tous les modèles d'étude sont répertoriés dans des bases de données comme miRBase (Kozomara *et al.*, 2019). Plusieurs microARNs sont parfois transcrits à partir d'un même long transcrit, ce qui implique une transcription parallèle entre ces microARNs qui sont alors considérés comme des familles (Tanzer *et al.*, 2004). La biogénèse des microARNs est schématisée sur la **Figure 14**.

La biogénèse des microARNs commence dans le noyau. Le microARN primaire est maturé par le complexe composé de la RNase Drosha et de DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8*) qui guide Drosha vers le motif nucléotidique GGAC avec une adénosine méthylée en N⁶ pour cliver le microARN primaire en microARN précurseur (Alarcón *et al.*, 2015). Le microARN précurseur est exporté dans le cytoplasme par l'Exportine 5 où il est clivé par la ribonucléase (RNase) Dicer en un duplex de 2 microARNs matures (Denli *et al.*, 2004). La nomenclature d'un microARN mature est déterminée par sa localisation dans le microARN primaire (O'Brien *et al.*, 2018). Le brin issu de l'extrémité 3' du microARN primaire est nommé 3p tandis que le brin issu de l'extrémité 5' est nommé 5p. Le facteur TRBP (*Transactivating response RNA-Binding Protein*) favorise le

INTRODUCTION

recrutement des duplex de microARNs (3p et 5p) au niveau des protéines Argonautes (Ago) (Chendrimada *et al.*, 2005).

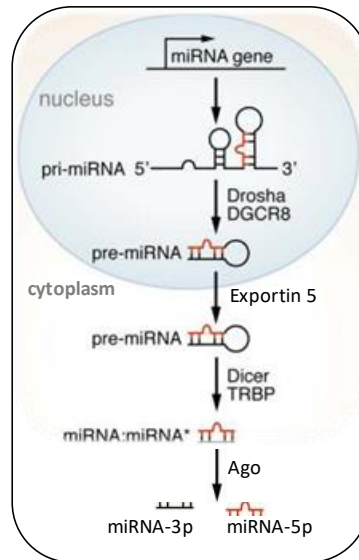


Figure 14: Biogénèse des microARNs (O'Brien *et al.*, 2018). MicroARN primaire (*pri-miRNA*), précurseur (*pre-miRNA*) et mature (*miRNA/miRNA**). Le microARN étoile (*) correspond au brin qui n'est pas retenu dans les protéines Argonautes (Ago) après la déhybridation des brins issus de l'extrémité 3' (3p) ou 5' (5p) du *pri-miRNA*. DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8*); TRBP (*Transactivating response RNA-Binding Protein*).

L'un des brins du duplex microARNs associé à Ago est déshybridé de son brin complémentaire et n'est pas retenu par Ago (Meijer *et al.*, 2014). Le microARN non-retenu par Ago est sensible au clivage par l'endonucléase Ago2 et à la dégradation par la machinerie cellulaire (Meijer *et al.*, 2014); il peut aussi être sécrété hors de la cellule et participer à la communication cellulaire (Bang *et al.*, 2014) (**Introduction II.4**). La proportion de microARNs 3p ou 5p au niveau des protéines Ago varie selon les cellules et l'environnement, elle peut être égale ou inégale (Meijer *et al.*, 2014). La sélection du microARN 3p ou 5p est basée en partie sur leur stabilité thermodynamique; généralement le microARN avec la stabilité en 5' la plus faible (celui avec le moins d'uraciles en 5') est conservé préférentiellement au niveau des protéines Ago (Meijer *et al.*, 2014).

II.2.2 - Les mécanismes d'action des microARNs

Les mécanismes d'action des microARNs dépendent des partenaires auxquelles les microARNs sont complexés (**Figure 15**).

La sélection dans les protéines Ago d'un microARN simple brin permet la formation du complexe miRISC (*miRNA-Induced Silencing Complex*) capable de se lier aux séquences nucléotiques complémentaires (ARN et peut être ADN) du microARN sélectionné (O'Brien *et al.*, 2018). Une complémentarité parfaite (ou presque) entre le complexe miRISC et une séquence

INTRODUCTION

cible induit le clivage de la séquence cible par l'endonucléase Ago2, ce qui peut réduire sa stabilité et favoriser sa dégradation (O'Brien *et al.*, 2018). Une complémentarité partielle (le plus fréquent) entraîne en revanche une interférence stérique entre la séquence cible et ses partenaires (O'Brien *et al.*, 2018).

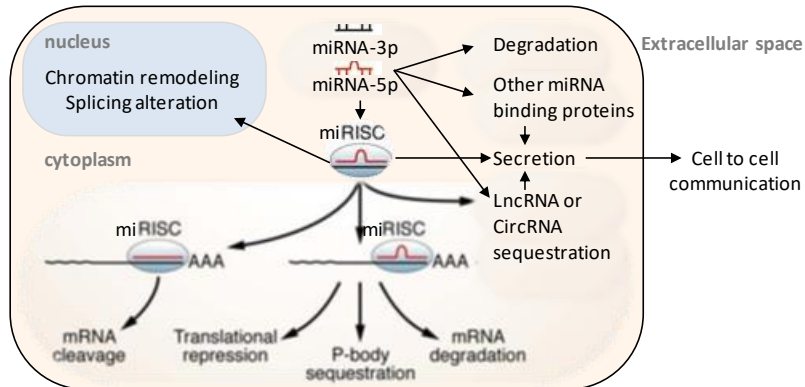


Figure 15: Mécanismes d'action des microARNs (O'Brien *et al.*, 2018). microARN (*miRNA*); miRISC (*miRNA-Induced Silencing Complex*); lncRNA (*long non-coding RNA*); circRNA (*Circular RNA*).

La nature des séquences cibles des complexes miRISC détermine la capacité des complexes miRISC à réguler des mécanismes (patho)physiologiques (O'Brien *et al.*, 2018). Les cibles les plus étudiées du complexe miRISC sont les ARNs messagers. Le clivage ou l'interférence par le complexe miRISC d'une séquence cible située dans la région 3'UTR (*3' UnTranslated Region*) d'un ARN messager empêche le recrutement du complexe d'initiation de la traduction tandis qu'une séquence cible située dans la région codante ou 5'UTR (*5' UnTranslated Region*) d'un ARN messager peut inhiber l'élongation ou la fin de sa traduction. Chez l'Homme, les séquences cibles du complexe miRISC dans les ARN messagers sont dans environ 60% des cas, localisées au niveau de la région 3'UTR (Chi *et al.*, 2009; Clark *et al.*, 2014). L'inhibition complète de la traduction d'un ARN messager par le complexe miRISC implique une interaction dans la région 3'UTR de l'ARN messager tandis qu'une interaction hors de la région 3'UTR de l'ARN messager entraîne des régulations post-transcriptionnelles plus subtiles comme un épissage alternatif (Allo *et al.*, 2014). Certains ARNs messagers comme ceux condensés dans des corps appelés *P-bodies* ne sont pas associés à une activité traductionnelle et la séquestration des complexes miRISC par ces *P-bodies* réduirait leur capacité à réguler d'autres ARNs messagers (Nishi *et al.*, 2015; Thomson *et al.*, 2016). Les complexes miRISC sont aussi capables de se lier à d'autres types d'ARNs comme les longs ARNs non codants et les ARNs circulaires, qui seraient aussi à l'origine d'un mécanisme de séquestration inhibant l'activité anti-traductionnelle du complexe miRISC (Thomson *et al.*, 2016). Les complexes miRISC sont détectés dans le noyau au niveau des sites actifs de transcription mais avec un poids moléculaire (environ 100 kDa) inférieur à celui observé dans le cytoplasme lorsqu'ils sont complexés avec un ARN messager (environ 182 kDa), ce qui suggère que les complexes

INTRODUCTION

miRISC ne sont pas complexé avec des ARNs messagers dans le noyau (Pitchiaya *et al.*, 2017). Certaines études montrent que les complexes miRISC nucléaires peuvent quand même interagir avec l'ADN et moduler la condensation de la chromatine (Xiao *et al.*, 2017), ou altérer les profils d'épissage des ARN messagers néosynthétisés (Allo *et al.*, 2014).

Le complexe miRISC et ses séquences cibles sont détectés dans de multiples compartiments subcellulaires comme le réticulum endoplasmique rugueux (Barman *et al.*, 2015), les granules de stress (Detzer *et al.*, 2011) les *P-bodies* (Nishi *et al.*, 2015), la face trans de l'appareil de Golgi (Kim *et al.*, 2014), les endosomes précoces et tardifs (Bose *et al.*, 2017), les corps multi-vésiculaires (Gibbins *et al.*, 2009), les lysosomes (Gibbins *et al.*, 2009), les mitochondries (Zhang *et al.*, 2014) et le noyau (Gagnon *et al.*, 2014). Enfin, le complexe miRISC et ses séquences cibles sont détectés *in vitro* dans le milieu extracellulaire de différents types cellulaires et en quantité augmentée après un stress environnemental comme la privation en sérum (Wang *et al.*, 2010). Ces études suggèrent que les interactions entre le complexe miRISC et ses séquences cibles peuvent s'effectuer dans des localisations multiples (O'Brien *et al.*, 2018).

Les partenaires protéiques ou nucléotidiques des microARNs sont capables de réguler leur adressage subcellulaire au niveau des VEs ou des *P-bodies* par exemple. La forme non phosphorylée en sérine 387 de la protéine Ago2 est impliquée dans le recrutement des microARNs dans les VEs exprimant la tétraspanine CD63 (*Cluster of Differentiation 63*) et sa phosphorylation en sérine 387 (détectée en cas de cancer du colon) inhibe l'adressage de certains microARNs dans ces VEs en induisant leur séquestration dans les *P-bodies* (McKenzie *et al.*, 2016). Les microARNs peuvent être détectés dans les VEs complexés et non complexés avec Ago2, ce qui suggère l'implication d'autres protéines de liaisons à l'ARN (Shurtleff *et al.*, 2016). Les protéines hnRNPA2B1 (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1) (Villarroya-Beltri *et al.*, 2013) et SYNCRIP (*synaptotagmin-binding cytoplasmic RNA-interacting protein*) (Santangelo *et al.*, 2016) sont impliquées dans le recrutement des microARNs possédant respectivement les motifs nucléotidiques GGAG et GGCU dans les VEs. Les protéines YB-1 (*Y box protein 1*) (Shurtleff *et al.*, 2016) et MVP (*Major Vault Protein*) (Teng *et al.*, 2017) sont aussi impliquées dans le recrutement des microARNs (indépendamment des protéines Ago pour YB-1) dans les petites VEs exprimant CD63 mais aucun motif nucléotidique préférentiel n'a encore été identifié pour ces protéines (Gebert *et al.*, 2019). Les longs ARNs non codants et les ARNs circulaires peuvent eux aussi recruter des microARNs complémentaires et réguler leur adressage subcellulaire et extracellulaire (Gebert *et al.*, 2019). Enfin, les microARNs (3p et 5p) pourraient également être adressés d'une manière indépendante de leur partenaire mais dépendante de leur stabilité en 3': les microARNs avec une extrémité 3' riche en adénine (instables) sont abondants dans les cellules alors que les

INTRODUCTION

microARNs avec une extrémité 3' riche en uracile (stables) sont abondants dans les VEs (Koppers-Lalic *et al.*, 2014).

II.2.3 - Les microARNs et le RVG après l'IDM

La différence d'expression de certains microARNs cellulaires ou circulant entre une condition physiologique et pathologique a été montrée dans le contexte de l'IC après un IDM. De nombreux microARNs sont en cours d'étude pour leurs potentielles utilités comme biomarqueurs circulants et/ou cibles thérapeutiques de la nécrose, la revascularisation du myocarde, la fibrose cardiaque, l'hypertrophie et du RVG défavorable après l'IDM en général (Dutka *et al.*, 2019). Quelques exemples de microARNs étudiés actuellement sont détaillés ci-dessous.

Le miR-208b-3p est un microARN exprimé exclusivement par les cardiomyocytes dont l'intérêt a été montré chez 6 cochons où l'IDM est induit par occlusion pendant 40 min avec un ballon d'angioplastie de l'artère coronaire gauche descendante et chez 25 patients post-IDM de type sus-décalage du fragment ST (Gidlöf *et al.*, 2011). Dans le plasma des cochons, le miR-208b-3p est augmenté significativement dès 20 min après la reperfusion et son pic de concentration survient après 120 min; le miR-208b-3p est ensuite diminué de 50% après 150 min (Gidlöf *et al.*, 2011). Des résultats similaires sont observés chez l'Homme; les concentrations plasmatiques de miR-208b-3p sont 3 000 fois plus élevés que chez patients contrôles 12 h après la survenue des symptômes de l'IDM et ces concentrations plasmatiques restent élevées jusqu'à 3 jours après l'IDM (Gidlöf *et al.*, 2011). Cette étude confirme que la sécrétion et la dégradation des microARNs dans la circulation est dynamique. Dans une autre étude comprenant 826 patients post-IDM et 429 contrôles, les concentrations plasmatiques du miR-208b-3p corrèlent significativement avec la cTnT et la FEVG, ce qui suggère que le miR-208b-3p est à la fois un biomarqueur diagnostic de la nécrose myocardique et un biomarqueur pronostic de la fonction du VG (Zhang *et al.*, 2017). De manière intéressante, les concentrations plasmatiques du miR-208b-3p après l'IDM ont une valeur pronostic du RVG défavorable augmentée en cas de combinaison avec les concentration plasmatique du miR-34a-5p (Lv *et al.*, 2014). D'autres microARNs ont des concentrations plasmatiques associées à la souffrance myocardique après l'IDM. D'après une étude menée sur 90 patients post-MI et 45 individus contrôles, le miR-124-5p augmente après l'IDM et corrèle avec les biomarqueurs cTnI et CK-MB (Guo *et al.*, 2017). De manière intéressante, la concentration plasmatique du miR-124-5p atteint son maximum dès 6 h après les premiers symptômes de l'IDM, ce qui suggère que c'est un biomarqueur précoce de l'IDM (Guo *et al.*, 2017).

Le miR-532-5p est un microARN qui augmente dans le plasma de souris après l'IDM et semble important dans la revascularisation du myocarde (Bayoumi *et al.*, 2017). *In vitro*, des cellules

INTRODUCTION

cardiaques endothéliales de souris sans miR-532-5p acquièrent un phénotype fibroblastique tandis qu'une expression élevée de miR-532-5p inhibe leur transformation en fibroblastes (Bayoumi *et al.*, 2017). *In vivo*, les cellules cardiaques endothéliales de souris déficientes en miR-532-5p ont avec une réponse proliférative réduite et une revascularisation du myocarde plus faible après un IDM induit par ligature de l'artère coronaire comparées aux souris contrôles (Bayoumi *et al.*, 2017). L'une des cibles directes du miR-532-5p est le gène codant pour la sérine protéase 23, un activateur de la transition épithélio-mésenchymateuse, dont l'inhibition par le miR-532-5p réduirait le recrutement des cellules cardiaques endothéliales nécessaire à la néovascularisation du myocarde (Bayoumi *et al.*, 2017)

Les miR-21-5p et miR-21-3p augmentent dans les maladies cardiovasculaires et plus particulièrement en cas de fibrose et d'hypertrophie (Adam *et al.*, 2012). *In vitro*, le miR-21-5p cible *Spry1* (*kinase inhibitor sprouty homolog 1*), ce qui active les MAPKs et favorise l'activation de la fibrose dans les fibroblastes cardiaques (Thum *et al.*, 2008). *In vivo*, le miR-21-5p cible aussi PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), ce qui augmente l'expression de MMP2 et mène à un remodelage de la matrice extracellulaire après un IDM temporaire chez la souris (Roy *et al.*, 2009). Enfin, miR-21-5p a aussi un rôle anti-apoptotique après un stress ischémique comme l'IDM en inhibant PDCD4 (*programmed cell death 4*), un suppresseur de mort cellulaire (Cheng *et al.*, 2009). Le miR-21-3p cible directement l'histone déacetylase-8, la sorbine, la protéine à domaine SH3 2, et PDLIM5 (*PDZ and LIM domain protein 5*), ce qui entraîne l'hypertrophie des cardiomyocytes (Bang *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2015).

Dans une étude de 150 patients suivis à 3-4 jours et à 6 mois après un IDM massif, la valeur pronostic des concentrations plasmatiques de 4 microARNs (miR-16-5p/27a-3p/101-3p/150-5p) mesurées 3 à 4 jours après a été évaluée (Devaux *et al.*, 2013). L'étude a montré que la combinaison des mesures plasmatiques des 4 microARNs permet une meilleure prédiction du RVG menant à une dysfonction systolique après l'IDM que le NT-proBNP seul (Devaux *et al.*, 2013). Parmi les 4 microARNs mesurés, le miR-27a-3p est le plus fortement associé au développement du RVG menant à une dysfonction systolique après l'IDM (Devaux *et al.*, 2013). Dans une seconde étude indépendante de 90 patients post-IDM avec un sus-décalage du fragment ST, une forte corrélation négative de la concentration plasmatique du miR-150-5p avec le RVG après l'IDM a été confirmée (Devaux *et al.*, 2013). Les patients qui développent un RVG 4 mois après l'IDM ont des concentrations plasmatiques de miR-150-5p mesurée à la sortie de l'hôpital deux fois inférieure aux patients sans RVG (Devaux *et al.*, 2013). Le miR-150-5p cible l'inhibiteur de la kinase SRC, ce qui diminue l'activation du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire qui participe à l'angiogénèse et la néovascularisation du myocarde après l'IDM (Desjarlais *et al.*, 2017)

INTRODUCTION

Un dernier exemple de microARNs impliqué dans les mécanismes post-IDM est le miR-125b-5p. *In vitro*, le miR-125b-5p favorise la prolifération et la migration de fibroblastes cardiaque humains et augmente l'expression de l' α -SMA et du collagène de type I et III en ciblant SFRP5 (*secreted frizzled-related protein 5*) (Bie *et al.*, 2016). La transfection des fibroblastes cardiaques humains avec SFRP5 pour augmenter son expression produit l'effet inverse de la transfection par le miR-125b-5p (Bie *et al.*, 2017). Récemment, les mêmes auteurs ont identifié l'ARN circulaire circ_LAS1L comme un régulateur capable de séquestrer miR-125b-5p et de l'empêcher d'atteindre ses cibles, ce qui réduit l'activation de la fibrose dépendante de SFRP5 (Sun *et al.*, 2020).

L'étude des microARNs comme biomarqueurs diagnostic et pronostic du RVG après l'IDM a mis en évidence des pistes prometteuses mais il est nécessaire d'effectuer des essais cliniques sur des plus grands groupes de patients pour confirmer la valeur ajoutée des microARNs par rapport aux biomarqueurs classiques. Certains microARNs offrent des pistes thérapeutiques potentielles contre le RVG défavorable après l'IDM mais leurs nombreuses séquences cibles impliquent des effets indésirables et leur trafic vers un compartiment particulier n'est pas encore maîtrisée.

II.3 - Les transporteurs extracellulaires des microARNs

Contrairement aux ARNs cellulaires, les microARNs extracellulaires (milieux de cultures cellulaires, plasma et urine par exemple) sont très stables: ils résistent à la dégradation à température ambiante jusqu'à 4 jours, et à des conditions extrêmes comme une ébullition, des cycles multiples de congélation-décongélation et des pH faibles ou élevés (Chen *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2008). La présence des microARNs dans la circulation suggère l'existence d'un mécanisme de protection contre la dégradation par les ribonucléases extracellulaires (Mitchell *et al.*, 2008).

Deux populations de microARNs extracellulaires peuvent être détectées dans les liquides biologiques: l'une peut être détectée associée avec des protéines comme Ago2 (Turchinovich *et al.*, 2011) tandis que l'autre peut être détectée dans des vésicules extracellulaires (VEs) (Gallo *et al.*, 2012). L'abondance relative de ces deux populations de microARNs est controversée. Certaines études montrent que les microARNs plasmatiques sont principalement transportés par Ago2 dans la fraction déplétée en VEs comparée au culot de petites VEs obtenu par ultracentrifugation à 110 000 *g* et une filtration à 0.22 μ m (Turchinovich *et al.*, 2011). D'autres études montrent que les microARNs plasmatiques sont transportés majoritairement dans le culot de VEs obtenues par ultracentrifugation à 160 000 *g* (Gallo *et al.*, 2012). Puisque ces études analysent l'expression d'un petit nombre de microARNs, il est possible que l'abondance relative des microARNs dépend du microARN étudié et des facteurs régulant sa sécrétion. Par ailleurs, les

INTRODUCTION

protéines Ago peuvent aussi être transportées dans les VEs (McKenzie *et al.*, 2016). Les autres transporteurs extracellulaires des microARNs comprennent les lipoprotéines à haute densité (HDL) (Vickers *et al.*, 2011) et la nucléophosmine 1 (Wang *et al.*, 2010). En plus de ces mécanismes de sécrétion des microARNs par des transporteurs, les microARNs non-complexés peuvent se déverser occasionnellement hors des cellules en cas de nécrose par exemple. Alors que la formation des VEs est un phénomène actif nécessitant de l'énergie, la libération des microARNs non-complexés ou complexés avec Ago2 semble être un mécanisme passif résultant de l'activité de la cellule et de son intégrité (Turchinovich *et al.*, 2012).

La libération de VEs par les cellules est un mécanisme ubiquitaire et conservé dans l'évolution aussi bien chez les bactéries, que chez les hommes et les plantes (Deatherage *et al.*, 2012; Robinson *et al.*, 2016). Initialement décrits pour éliminer des composants des cellules (Wolf *et al.*, 1967; Johnstone *et al.*, 1987), les VEs sont en fait capables d'échanger des composants (lipides, protéines et acides nucléiques) entre les cellules, ce qui participe aux processus (patho)physiologiques (Yáñez-Mó *et al.*, 2015; Martinez *et al.*, 2017; van Niel *et al.*, 2018; Mathieu *et al.*, 2019).

II.3.1 - La biogénèse des vésicules extracellulaires (VEs)

II.3.1.1 - Les VEs issues de la membrane plasmique

Les VEs issues de la membrane plasmique comprennent les microvésicules et les corps apoptotiques (Martinez *et al.*, 2017). Alors que les corps apoptotiques sont issus de la fragmentation de la cellule lors de l'apoptose (Hristov *et al.*, 2004), les microvésicules peuvent être sécrétées par la cellule indépendamment de l'apoptose (Martinez *et al.*, 2011).

La biogénèse des microvésicules implique un réarrangement moléculaire des lipides et des protéines de la membrane plasmique et une augmentation (ou non) des concentrations calciques cytoplasmiques (van Niel *et al.*, 2018) (**Figure 16**).

Les microdomaines lipidiques et protéiques (cargos) détectés sur la membrane plasmique avant la libération des microvésicules assembleraient la machinerie favorisant la formation des protubérances membranaires (Shen *et al.*, 2011). Certaines protéines cargos des microvésicules, comme les tétraspanines CD9 et CD81 et la GTPase ADP-ribosylation 6 (*ARF6*) ont été identifiées comme régulant le contenu des microvésicules (Yang *et al.*, 2013; Muralidharan-Chari *et al.*, 2009). Les tétraspanines, qui s'accumulent à la membrane des endosomes lors de leur maturation, peuvent également être introduites à la membrane plasmique lors de la fusion avec les endosomes. La structure cristallographique de CD81 est conique, probablement comme les

INTRODUCTION

autres tétraspanines, ce qui favoriserait la courbure de la membrane au niveau des microdomaines riches en tétraspanines (Zimmerman *et al.*, 2016).

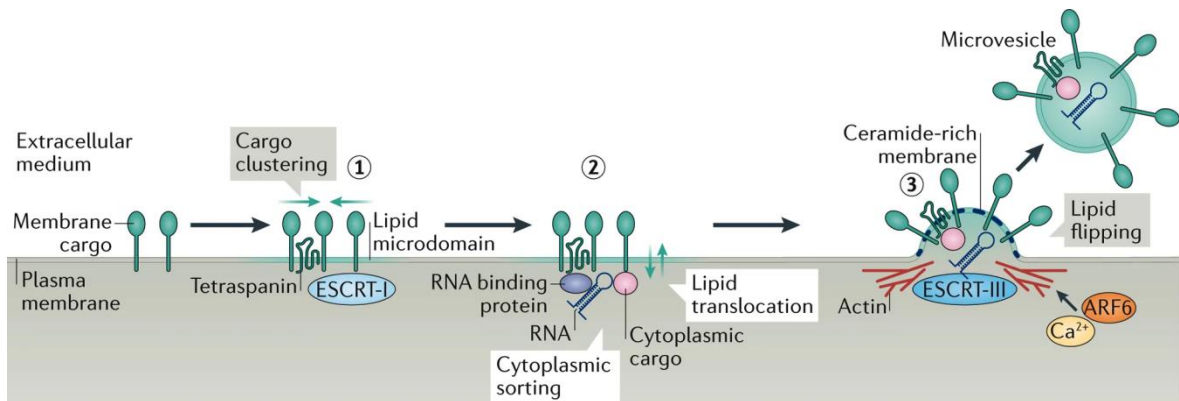


Figure 16: Biogénèse des microvésicules (van Niel *et al.*, 2018). ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*); GTPase ADP-ribosylation 6 (*ARF6*); Ca^{2+} (Calcium).

La formation des protubérances membranaires peut impliquer une augmentation du calcium cytosolique d'origine extracellulaire activant la protéase calpaïne et menant à la dégradation de certaines protéines du cytosquelette comme l'actine (Miyoshi *et al.*, 1996). L'asymétrie de la membrane plasmique et l'activation calcique dépendante des translocases amino-phospholipidiques (flippases floppases et scramblases) favorise l'externalisation des lipides phosphoglycérides amino-phospholipidiques chargés négativement comme les lipides phosphatidylsériques, ce qui mène à un excès de charges négatives et à une déstabilisation localisée de la membrane (Connor *et al.*, 2010). Chez *C. elegans*, la perte d'une flippase conservée nommée TAT-5 (*Phospholipid-transporting ATPase*) entraîne l'exposition extracellulaire d'un autre type de lipides phosphoglycérides nommé phosphatidyléthanolamine normalement orienté vers l'intérieur de la cellule; cette anomalie lipidique favorise la libération des microvésicules dépendante de la machinerie ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*), ce qui témoigne de l'importance de l'organisation des lipides dans la libération de microvésicules (Wehman *et al.*, 2011; Beer *et al.*, 2018). La perte de l'asymétrie des lipides phosphatidylsériques et phosphatidyléthanolamines précède souvent la libération de microvésicules (Hugel *et al.*, 2005).

De manière intéressante, les protrusions membranaires chargées positivement comme les microvillosités des entérocytes exhibant la myosine 1A sont des sites où la libération de microvésicules est favorisée, ce qui témoigne de l'importance de la polarité intracellulaire dans la libération des microvésicules (McConnell *et al.*, 2009).

La libération des microvésicules implique aussi des régulateurs du cytosquelette comme les kinases ROCKs dont l'activation favorise la production des microvésicules (Li *et al.*, 2012). Les kinases ROCKs sont fortement activées dans les cellules cancéreuses en réponse à un stress

INTRODUCTION

hypoxique (effet Warburg), et leur inhibition bloquent la production des microvésicules cancéreuses aussi appelées oncosomes (Wilson et al., 2013).

Le mécanisme de fission entre la protubérance membranaire à l'origine des microvésicules et la membrane plasmique dépend des interactions entre la myosine et l'actine capables de générer des contractions du cytosquelette dépendantes de l'ATP (McConnell *et al.*, 2009). Les GTPases impliquées dans la production d'ATP nécessaire à cette contraction comprennent ARF6 dont l'activation mène à la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine et à la contraction myosine-actine (Muralidharan-Chari *et al.*, 2009). De manière intéressante, les protéines ESCRT comme TSG101 (*tumor susceptibility gene 101*) du complexe ESCRT-1 et l'ATPase VPS4 (*vacuolar protein sorting 4*) qui sont impliquées dans la biogénèse des VEs d'origine endosomale peuvent aussi participer à la fission de certaines microvésicules (Nabhan *et al.*, 2012).

II.3.1.2 - Les VEs issues de la membrane endosomale

Les VEs d'origine endosomale sont générées dans les corps multi-vésiculaires où elles sont appelées vésicules intraluminales, jusqu'à leur libération en cas de fusion des corps multi-vésiculaires avec la membrane plasmique où elles prennent le nom d'exosomes (van Niel *et al.*, 2018). Les exosomes ont la même taille que les vésicules intraluminales (< 150 nm) (Mathieu *et al.*, 2019). Les mécanismes de la biogénèse des vésicules intraluminales sont présentés sur la **Figure 17** (van Niel *et al.*, 2018).

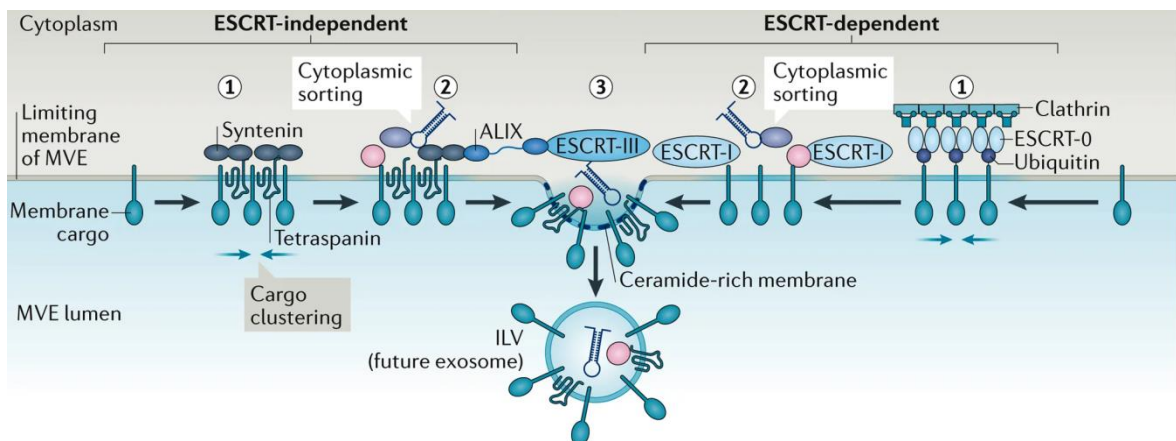


Figure 17: Biogénèse des vésicules intraluminales (ILV) (van Niel et al., 2018). ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*); corps multi-vésiculaires (MVE); ALIX (*ALG-2 interacting protein X*).

La biogénèse des vésicules intraluminales nécessite un réarrangement moléculaire des lipides et des protéines au niveau de microdomaines de la membrane des endosomes en cours de maturation en corps multi-vésiculaires. Les microdomaines des endosomes sont composés de

INTRODUCTION

cargos comme la synténine ou la protéine ALIX (*ALG-2 interacting protein X*) qui déterminent l'implication de la machinerie ESCRT dans la biogénèse des microvésicules (van Niel *et al.*, 2018).

La machinerie ESCRT est activée lorsque les sous-unités ESCRT-0 et ESCRT-1 sont recrutées au niveau des cargos transmembranaires ubiquitinylés des endosomes (Tamai *et al.*, 2010). L'activation de la machinerie ESCRT entraîne le recrutement des sous-complexes ESCRT-2 et ESCRT-3 qui induisent la fission du microdomaine et conduit à la libération des vésicules intraluminales dans le lumen des corps multi-vésiculaires (Tamai *et al.*, 2010). L'inactivation par interférence ARN de composants impliqués dans la machinerie ESCRT a montré que certains composants sont impliqués dans l'efficacité de la sécrétion tandis que d'autres modifient la composition des vésicules intraluminales produites (Colombo *et al.*, 2013).

Les vésicules intraluminales peuvent aussi être générées indépendamment de la machinerie ESCRT lorsque les 4 complexes ESCRT sont retirés (Stuffers *et al.*, 2009). L'un de ces mécanismes est dépendant de la sphingomyélinase neutre de type 2 qui hydrolyse la sphingomyéline en céramides (Trajkovic *et al.*, 2008). Les microdomaines riches en céramides favorisent l'apparition de protubérances membranaires dirigées vers l'intérieur de l'endosome (Goni *et al.*, 2009). Les céramides peuvent aussi être métabolisés en sphingosine-1 phosphate pour activer le récepteur de la sphingosine phosphate 1 dont l'activation peut favoriser la libération des vésicules intraluminales (Kajimoto *et al.*, 2013).

CD81 et probablement les autres tétraspanines accumulées dans la membrane des endosomes participeraient à l'exacerbation de la courbure de la membrane endosomale (Zimmerman *et al.*, 2016). Les tétraspanines comme CD63 régulent la biogénèse des vésicules intraluminales dépendante et indépendante de la machinerie ESCRT et pourraient aussi réguler leur composition (van Niel *et al.*, 2011).

Une fois formées, les vésicules intraluminales peuvent être soit libérées dans le milieu extracellulaire (les exosomes), soit être dégradées en cas de fusion des corps multi-vésiculaires avec les lysosomes ou les autophagosomes (van Niel *et al.*, 2018; Mathieu *et al.*, 2019) (**Figure 18**).

INTRODUCTION

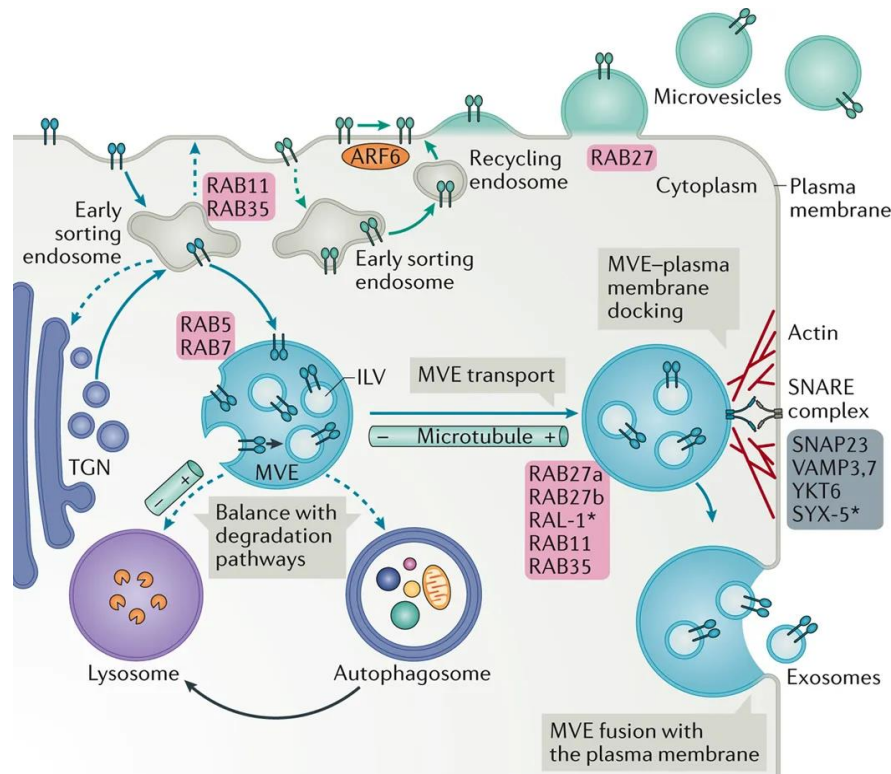


Figure 18: Régulation du trafic intracellulaire des corps multi-vésiculaires (MVE) à l'origine de la libération à la membrane plasmique des vésicules intraluminales (ILV) (van Niel et al., 2018). TGN (*Trans Golgi Network*); RAB (*RAS-related protein GTPases*). SNARE (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*); ARF6 (*ADP-ribosylation factor 6*); RAL-1 (*RAL (Ras-related GTPase homolog 1)*); SNAP23 (*synaptosomal-associated protein 23*); SYX-5 (*syntaxin 5*); VAMPs (*vesicle-associated membrane proteins*). * indique des protéines de *Caenorhabditis elegans*.

En général, le trafic des organelles implique le cytosquelette (actine et microtubules), des éléments moteurs (dynéine, kinésine et myosine) et des activateurs (petites GTPases) (Bonifacio et al., 2004). Les corps multi-vésiculaires se déplacent sur les microtubules (Mittelbrunn et al., 2015). Le recrutement des corps multi-vésiculaires aux lysosomes implique un transport vers l'extrémité négativement chargée des microtubules qui est favorisé par le recrutement de dynéine par la protéine GTPase RAB7 (*RAS-related protein*) (Rocha et al., 2009). En parallèle, RAB7 est aussi impliquée dans le transport des corps multi-vésiculaires vers l'extrémité positivement chargée des microtubules à la membrane plasmique (Baietti et al., 2012). La dualité fonctionnelle de RAB7 semble dépendre de son ubiquitination qui favorise le recrutement des corps multi-vésiculaires aux lysosomes (Mobius et al., 2003).

Les protéines RAB27 et leurs effecteurs respectifs incluant la SYTL4 (*synaptotagmin-like protein 4*) et l'exophiline 5 sont aussi essentiels pour le recrutement des corps multi-vésiculaires à la membrane. RAB27b et ses isoformes favoriseraient l'ancrage et la fusion des corps multi-vésiculaires à la membrane plasmique. RAB27a est impliquée dans le réarrangement du

INTRODUCTION

cytosquelette d'actine, une étape essentielle à la sécrétion des exosomes (Sinha *et al.*, 2016). Certains types cellulaires n'expriment pas toutes les isoformes de RAB27, ce qui montre que les mécanismes de fusion des corps multi-vésiculaires à la membrane diffèrent entre les cellules et peuvent impliquer d'autres effecteurs comme les protéines RAB11 et RAB35 (Hsu *et al.*, 2010). De manière intéressante, RAB11 et RAB35 sont des effecteurs des endosomes précoces, ce qui suggère que la biogénèse des vésicules intraluminales débute avant la formation des corps multi-vésiculaires.

La dernière étape de la sécrétion des exosomes requiert la fusion des corps multi-vésiculaires à la membrane plasmique et peut impliquer les protéines SNARE (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*). Les protéines du complexe SNARE incluant VAMP7 (*vesicle-associated membrane protein 7*), la syntaxine 7, la complexine et la synaptotagmine participent à l'exocytose des lysosomes (Rao *et al.*, 2004) et à la libération des exosomes dans certains types cellulaires (Fader *et al.*, 2009). L'augmentation des concentrations calciques intracellulaires favorise la sécrétion d'exosomes (Savina *et al.*, 2005), notamment via l'activation du complexe SNARE: la synaptotagmine fixe le calcium entrant et déplace la complexine ce qui favorise l'ancrage du corps multi-vésiculaire à la membrane plasmique par le complexe SNARE (Südhof *et al.*, 2013). La protéine SNARE 23 associée aux synaptosomes (SNAP23) est aussi impliquée à la fois dans la libération à la membrane du contenu des lysosomes et des corps multi-vésiculaires (Wei *et al.*, 2017). D'autres protéines SNARE semblent impliquées dans la sécrétion des exosomes comme Ykt6 de *Drosophila* dont l'homologue humain est la synaptobrevine (Gross *et al.*, 2012) et la syntaxine 5 de *C. elegans* (Hyenne *et al.*, 2015).

Plusieurs études ont montré que l'activité lysosomale et de l'autophagie régule la sécrétion des exosomes. L'inhibition de l'activité lysosomale favorise la libération d'exosomes (Villarroya-Beltri *et al.*, 2013) et l'externalisation de protéines défectueuses pour la cellule comme les peptides amyloïdes dans le contexte des maladies neurodégénératives (Eitan *et al.*, 2016). D'autre part, l'acidification progressive des endosomes lors de leur maturation semble favoriser le recrutement des corps multi-vésiculaires vers les lysosomes car l'inhibition de la pompe à proton ATPase V1 réduit l'acidification des corps multi-vésiculaires et augmente la sécrétion d'exosomes (Guo *et al.*, 2017; Edgar *et al.*, 2016). La macro-autophagie permet de livrer les composants défectueux ou inutilisés via les autophagosomes dans les lysosomes pour maintenir l'homéostasie et réduire les dépenses énergétiques inutiles en cas de stress. L'inhibition de la formation de l'autophagosome favorise la sécrétion du contenu des corps multi-vésiculaires (Dias *et al.*, 2016). En cas d'inhibition pharmacologique de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome, le culot des petites VEs obtenues par ultracentrifugation contient plus de protéines associées aux

INTRODUCTION

autophagosomes mais pas plus de protéines associées aux exosomes ce qui suggère cette inhibition favoriserait d'abord la libération extracellulaire du contenu des autophagosomes (Hessvik *et al.*, 2016).

II.3.2 - L'isolement, la purification et la caractérisation des VEs

Une fois sécrétés, les différents sous-types de VEs et de nombreux composants non-vésiculaires partagent les mêmes caractéristiques biophysiques de taille, de densité et d'orientation des membranes, ce qui les rend difficile à distinguer les uns des autres (Mathieu *et al.*, 2019) (**Figure 19**).

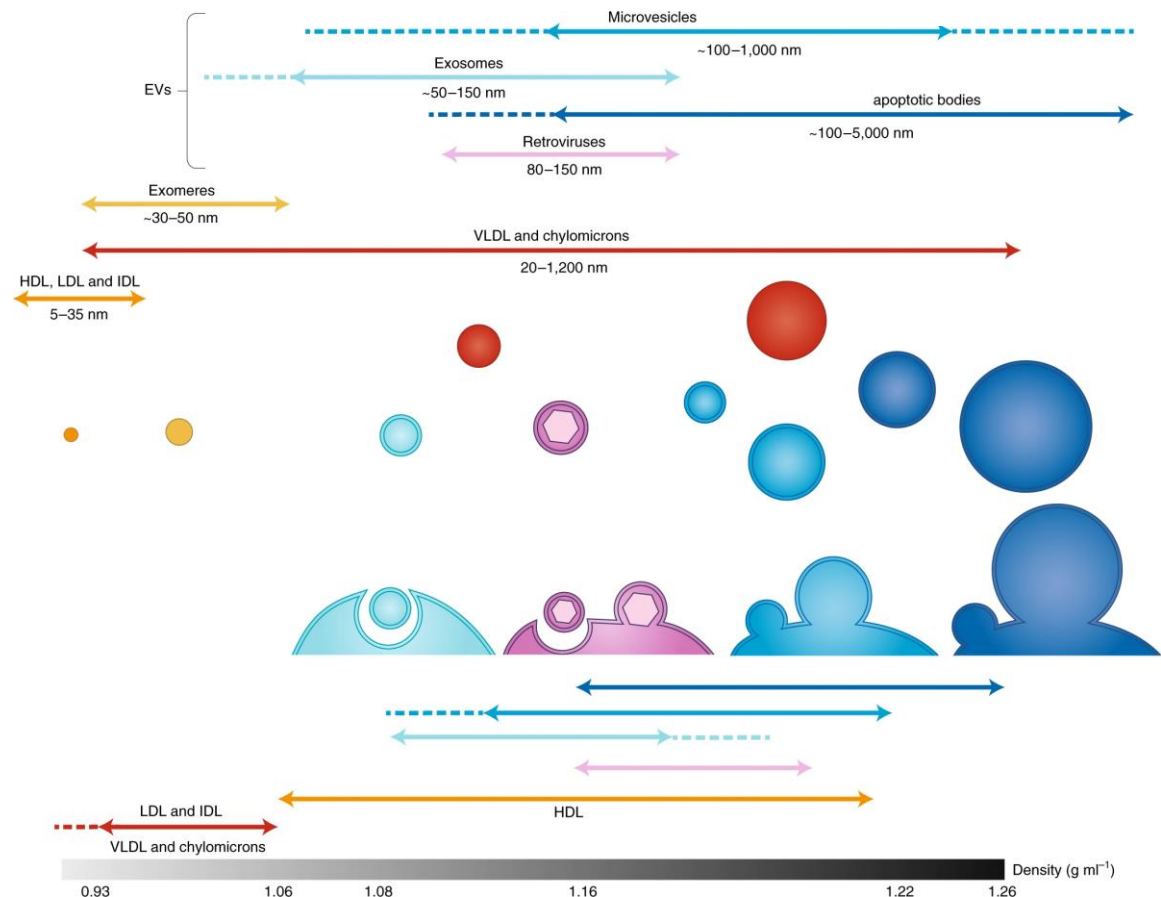


Figure 19: Caractéristiques physiques des différents sous-types de vésicules extracellulaires (EVs) et des particules fréquemment co-isolées (Mathieu *et al.*, 2019). Lipoprotéines à densité haute (HDL), intermédiaire (IDL), faible (LDL), très faible (VLDL) et sécrétées par l'intestin après l'absorption de graisses (chylomicrons).

Les VEs issues des différents mécanismes de biogénèse membranaire et endosomale ne peuvent pas être pleinement séparées en fonction de leur taille ou de leur densité car ces caractéristiques physiques se recouvrent en partie. En effet, des VEs de taille similaire à celle des exosomes ont été observées lors de leur libération à la membrane plasmique (McConnell *et al.*, 2009). La proportion relative de VEs d'origine endosomale est variable selon les cellules et les

INTRODUCTION

conditions utilisées. Les protocoles d'isolation les plus courants permettent d'obtenir des petites VEs d'origine endosomale (exosomes) et non-endosomale (Kowal *et al.*, 2016), ainsi que des composants non-vésiculaires comme les lipoprotéines à densité haute (HDL), intermédiaire (IDL), faible (LDL), très faible (VLDL), et celles sécrétées par l'intestin après l'absorption des graisses (chylomicrons) (Karimi *et al.*, 2018) et les exomères qui sont des particules inférieures à 50 nm découvertes récemment (Kowal *et al.*, 2016). Récemment, les exosomes issus des corps multi-vésiculaires tardifs ont été définis comme des petites VEs exprimant les tétraspanines CD63 (qui s'accumulerait principalement dans les corps multivésiculaires) et CD9/CD81 (qui s'accumuleraient principalement à la membrane plasmique) (Kowal *et al.*, 2016). Cependant, d'après la Société Internationale des VEs (ISEV), cette définition est basée sur une caractérisation de petites VEs issues de cellules dendritiques humaines conditionnées et ne peut pas être appliquée aux exosomes de toutes les cellules (Russell *et al.* 2019). Puisque la majorité des publications sur les VEs concernent leurs potentielles fonctions (Yáñez-Mó *et al.*, 2015) plutôt que leur origine, il est difficile de déterminer le sous type de VEs qui peut être responsable de l'effet décrit.

La purification absolue ou l'isolement de toutes les VEs issues d'un échantillon est irréalisable (Théry *et al.*, 2018). Chaque méthode d'isolement des VEs présente des avantages et des limites (**Tableau 3**) et le choix de la stratégie utilisée résulte d'une balance entre quantité et spécificité des VEs isolées (Chiriaco *et al.*, 2018; Théry *et al.*, 2018).

La centrifugation différentielle sans gradient de densité est la méthode la plus utilisée pour isoler des VEs car elle permet d'obtenir des quantités importantes de matériel (Gardiner *et al.*, 2016). Les principales limites de cette méthode sont l'agrégation des VEs isolées et la contamination par des composants non-VEs (lipoprotéines et agrégats protéiques) (Linares *et al.*, 2015). L'addition d'un gradient de densité d'iodixanol permet de réduire l'agrégation des VEs isolées et d'éliminer les IDL, LDL, VLDL mais pas les HDL. Cette stratégie ajoute un niveau de complexité à l'isolement de VEs car elle est plus longue (24 h versus 5 h) et réduit la quantité de matériel obtenue (Gardiner *et al.*, 2016). La précipitation des VEs par des polymères comme le polyéthylène glycol est la méthode la plus simple et la plus rapide mais elle n'est pas spécifique des VEs (Chiriaco *et al.*, 2018). La séparation des VEs par exclusion de taille (SEC) permet de séparer efficacement les VEs des protéines sécrétées ainsi que les HDL, IDL et LDL mais pas des VLDL (Chiriaco *et al.*, 2018). L'immuno-capture des VEs permet la sélection d'un sous-type de VEs mais le choix de la cible protéique est difficile car elle doit être présente à la membrane des VEs et être absente des composants non-vésiculaires contaminants (Chiriaco *et al.*, 2018). La capture des VEs par EVTRAP (*Extracellular Vesicles Total Recovery and Purification*) est une technique non-

INTRODUCTION

accessible directement (brevetée) qui permet de capturer une large population de VEs ayant une affinité pour les lipides hydrophiles et aromatiques (Wu *et al.*, 2018). La spécificité de la capture EVTRAP n'est pas très connue actuellement (Wu *et al.*, 2018). D'autres méthodes prometteuses d'isolement des VEs sont développées ou en cours de développement comme la filtration à flux tangentiel (Kowal *et al.*, 2016). La combinaison de différentes méthodes d'isolement des VEs semble la meilleure alternative pour obtenir des populations de VEs pures: par exemple il est maintenant recommandé de combiner la centrifugation différentielle en gradient de sucrose avec la SEC pour se débarrasser des contaminants non-vésiculaires mais cette stratégie est techniquement complexe et la quantité obtenue des VEs est très faible (Théry *et al.*, 2018).

Tableau 3: Principes, avantages et limites des principales méthodes d'isolement des vésicules extracellulaires (VEs) (Chiriaco *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018).

Méthode	Principe	Avantages et limites
Centrifugation différentielle avec et sans gradient de densité	Séparation des VEs par taille (grandes à 10 000 20 000 g et petites à 100 000 g), par densité (en cas de gradient de densité) et morphologie.	<ul style="list-style-type: none"> - Fréquemment utilisée; standardisée, enrichissement des VEs dans un culot; accessibilité à différents sous-types de VEs (petites, grandes, denses, légères). - Agrégation des VEs (sans gradient de densité); contamination par des composants non-VEs (lipoprotéines et agrégats protéiques); rendement faible (avec gradient de densité); long (6 h 24 h)
Précipitation par des polymères	Précipitation des VEs par des polymères altérant la solubilité.	<ul style="list-style-type: none"> - Facile; rapide (20 min); peu coûteuse en volume d'échantillon (1 mL). - Co-précipitation de contaminants protéiques et de polymères.
Séparation par exclusion de taille	Séparation des VEs dans un gel de chromatographie de taille.	<ul style="list-style-type: none"> - Peu coûteuse; reproductible; presque pure; préservation de l'intégrité et de l'activité. - Rendement faible; long (1 h/ échantillon).
Immuno-capture	Immuno-capture des VEs par des billes magnétiques conjuguées avec des anticorps dirigés contre des protéines de surface des VEs.	<ul style="list-style-type: none"> - Sensible et spécifique (selon la cible et l'anticorps); pure; accessibilité à différents sous-types de VEs (exprimant la cible à leur surface). - Coûteuse; rendement faible.
Capture EVTRAP (<i>Extracellular Vesicles Total Recovery and Purification</i>)	Capture des VEs par des billes magnétiques conjuguées avec des lipides (hydrophiles et aromatiques).	<ul style="list-style-type: none"> - Peu coûteuse en réactifs et en volumes (20 µL); rapide; permet une analyse (phospho/glyco)protéomique complète. - Peu de données dans la littérature sur les sous-types de VEs capturés et les contaminations possibles.

INTRODUCTION

La caractérisation des VEs isolées est importante pour évaluer leur qualité de séparation avec les composants non-vésiculaires et établir la fonction des différents sous-types de VEs. L'ISEV recommande que chaque préparation de VEs soit caractérisée par (i) des mesures morphométriques (taille et concentration en protéines, lipides et particules) et normalisées (nombre de cellules productrices, masse du tissu, volume du liquide biologique) et (ii) des analyses des composants issus du sous-type de VEs étudié (recherche de marqueurs spécifiques des VEs) et des contaminants non-vésiculaires (Théry *et al.*, 2018).

II.3.3 - Le tropisme, l'absorption et la fonction des VEs

Les VEs peuvent être absorbées par les cellules et y déclencher des changements phénotypiques (Bang *et al.*, 2014). L'absorption des VEs par les cellules requiert leur ancrage à la membrane et l'activation de récepteurs de surface et de voies de signalisation qui mènent à leur internalisation par endocytose ou par fusion avec la membrane (van Niel *et al.*, 2018) (**Figure 20**).

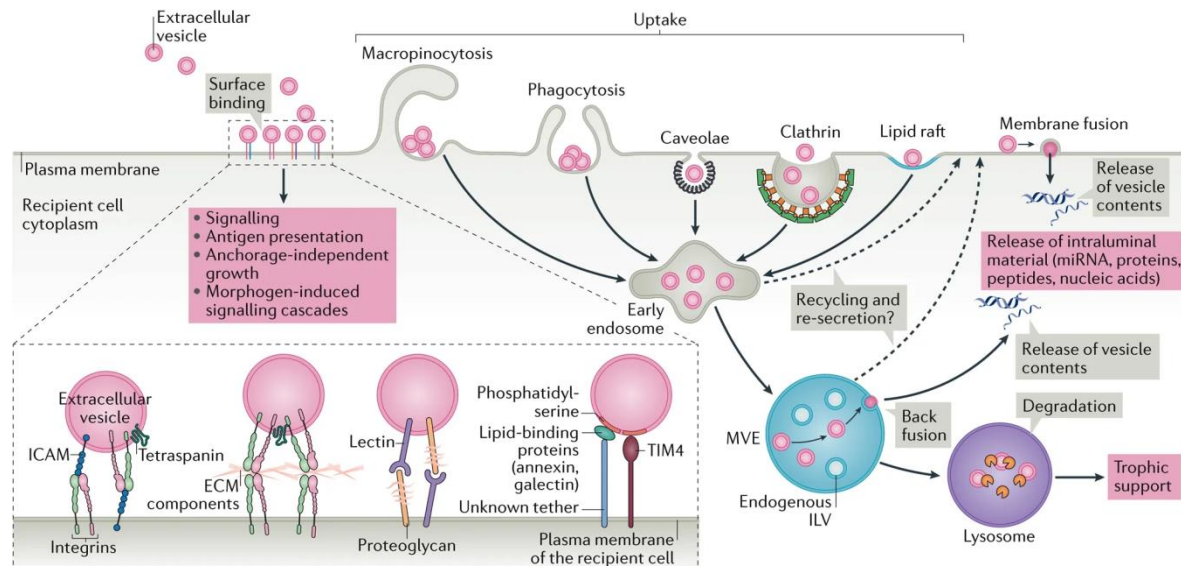


Figure 20: Devenir des vésicules extracellulaires dans les cellules réceptrices (van Niel *et al.*, 2018). Corps multivésiculaires (MVE); vésicules intraluminales (ILV); microARN (miRNA); molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM); matrice extracellulaire (ECM); TIM4 (*T cell immunoglobulin mucin receptor 4*).

Les interactions entre les VEs et les cellules sont diverses et ne sont pas toutes identifiées. Ces interactions sont différentes selon le sous-type de VEs et de cellules mais les mécanismes régulant le tropisme et l'absorption des VEs sont susceptibles d'être partagés entre les sous-types de VEs (Mulcahy *et al.*, 2014).

Le tropisme des VEs dépend nécessairement de l'affinité des protéines exprimées à leur surface avec les récepteurs exprimés à la membrane des cellules. Les VEs peuvent notamment

INTRODUCTION

être absorbées par les cellules qui les ont produites et favoriser une réponse autocrine (Matsumoto *et al.*, 2017).

Plusieurs médiateurs des interactions sont connus comme les intégrines, les tétraspanines, les protéoglycanes comme les héparanes sulfates, les lectines, les lipides et les composants de la matrice extracellulaire. Les intégrines des VEs peuvent interagir avec les molécules d'adhésion intercellulaires (ICAMs) situées à la membrane cellulaire (Morelli *et al.*, 2004). De plus, les intégrines des VEs et des cellules interagissent avec les protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et la lamine, ce qui entraîne leur colocalisation et augmente les chances qu'elles interagissent ensemble (Purushothaman *et al.*, 2016). La composition en intégrines des VEs régule leur tropisme tissulaire: selon elle, les VEs issues de tumeurs favorisent l'apparition de métastases dans le foie ou le poumon (Hoshino *et al.*, 2015). Les tétraspanines des VEs comme CD9 et la tétraspanine 8 peuvent aussi interagir avec les intégrines de la membrane cellulaire (Rana *et al.*, 2012), ce qui favorise leur absorption par certaines cellules (Rana *et al.*, 2011). Les groupements héparanes sulfates situés sur la glypicane 1 et les lectines de la surface des VEs contribuent à l'ancrage des VEs à la membrane plasmique (Melo *et al.*, 2015). Enfin, les lipides portés par les VEs comme les phosphatidylsérines peuvent recruter des protéines comme la galectine 5 ou l'annexine 5 permettant l'ancrage des VEs à la membrane des cellules (van Niel *et al.*, 2018).

Une fois ancrées à la membrane, les VEs peuvent soit y rester, soit être absorbées (Denzer *et al.*, 2000). L'endocytose des VEs peut impliquer les clathrines ou des mécanismes indépendants comme la macropinocytose (Tian *et al.*, 2014) et la phagocytose (Feng *et al.*, 2010). Certaines protéines de la surface des VEs comme CD47 semblent au contraire favoriser leur rétention dans le milieu circulant en inhibant leur capture par les phagocytes (Kamerkar *et al.*, 2017). Les VEs endocytées sont recrutées aux corps multi-vésiculaires et sont la plupart du temps amenées aux lysosomes pour y être dégradées, ce qui offre une source de métabolites alternative à la cellule réceptrice (Tian *et al.*, 2014). Dans certains cas, les VEs endocytées sont fusionnées à la membrane des corps multi-vésiculaires et leur contenu (incluant les microARNs) serait alors déversé dans le cytoplasme (Bissig *et al.*, 2014). Dans d'autres cas, les VEs pourraient directement fusionner avec la membrane de la cellule (Valadi *et al.*, 2007).

Pour finir, de nombreuses fonctions ont été attribuées aux VEs dans diverses pathologies comme les maladies cardiovasculaires (Loyer *et al.*, 2014; Yáñez-Mó *et al.*, 2015; Boulanger *et al.*, 2017). Après un IDM, par exemple, les VEs intracardiaques participent à l'inflammation (Loyer *et al.*, 2018). D'autres études suggèrent que les VEs participeraient au RVG après un IDM et plus particulièrement aux mécanismes de fibrose cardiaque (Ranjan *et al.*, 2019) et d'hypertrophie des

INTRODUCTION

cardiomyocytes notamment via le transport de microARNs vers les cardiomyocytes (Bang *et al.*, 2014; Lyu *et al.*, 2015). Bien que beaucoup d'études décrivent ces fonctions comme étant spécifiques d'un seul sous type de VEs, l'hétérogénéité des origines des VEs (cellules, mécanismes de biogénèse à la membrane), des méthodes d'isolement des VEs et de la diversité des cibles des VEs (tropisme cellulaire et mécanisme d'absorption) indique que la plupart de ces fonctions sont certainement mal-interprétées (Théry *et al.*, 2018).

III - Position du problème

L'IC est un enjeu de santé publique majeur à cause du vieillissement des populations. Les mécanismes physiopathologiques des étiologies menant à l'IC sont méconnus et asymptomatiques. **Les thérapies actuelles manquent d'efficacité car elles traitent les symptômes de l'IC lorsqu'elle est installée souvent irréversiblement.**

L'évaluation diagnostique et pronostique des patients à risque d'IC notamment après un IDM est primordiale pour la prise en charge de ces patients dont le pronostic est souvent sévère. En pratique clinique, cette évaluation repose sur la mesure de paramètres électriques (ECG), morphométriques (VFS, VFD et FEVG), moléculaires (cTn, BNP/NT-proBNP) et fonctionnels (stades ACC/AHA et classes NYHA). Une meilleure stratification des patients à risque est obtenue lorsque ces paramètres sont combinés. Malgré l'amélioration de la prise en charge des patients après un IDM massif antérieur, 30% développent toujours un RVG associé à un mauvais pronostic en terme de ré-hospitalisation pour IC et de décès cardiovasculaires (Savoie et al., 2006; Fertin et al., 2010). Les nouvelles approches omiques et la biologie des systèmes montrent que l'évaluation diagnostique et pronostique des patients après l'IDM est perfectible. **L'identification de signatures moléculaires associées au RVG après l'IDM offre de nouvelles opportunités pour découvrir de nouveaux biomarqueurs diagnostiques et pronostiques après l'IDM et pour mettre en évidence de nouvelles stratégies thérapeutiques.**

Le RVG et ses mécanismes (fibrose, hypertrophie) après l'IDM sont des indicateurs forts de la progression de l'IC. Ces mécanismes physiopathologiques sont associés à des modifications d'expression de microARNs dans le VG et la circulation. Les microARNs sont des régulateurs de l'expression des gènes qui participent au RVG après l'IDM. **L'identification des microARNs modulés par le RVG et ses mécanismes après l'IDM pourrait permettre de prédire le RVG et ses mécanismes et d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques avant la survenue de l'IC.**

Les VEs sont des transporteurs hétérogènes des microARNs circulants ayant une composition qu'ils héritent des cellules qui les produisent. Les différents sous-types de VEs cardiaques impliqués dans le transport des microARNs circulants modulés par le RVG après l'IDM et les mécanismes régulant leur chargement dans les VEs sont méconnus. **L'identification de la composition des sous-types de VEs cardiaques impliquées dans le transport des microARNs circulants pourrait permettre d'étudier le trafic et la fonction de ces microARNs lors du RVG après l'IDM. Enfin, la détection de la signature en microARNs dans les sous-types de VEs cardiaques pourrait permettre de prédire plus spécifiquement le RVG et ses mécanismes après l'IDM.**

IV - Résultats antérieurs

IV.1 - Le réseau d'interactions microARNs-protéines cibles construit à partir des données protéomiques issues des VG des rats post-IDM permet d'identifier 13 microARNs susceptibles de réguler 8 protéines modulées par le RVG après l'IDM.

Par criblage protéomique, l'équipe a identifié 27 protéines différentiellement exprimées (Cieniewski-Bernard *et al.*, 2008) et 30 protéines différentiellement phosphorylées (Dubois *et al.*, 2011), soit 45 protéines différentes modulées dans la zone non-infarciée du VG de rats mâles 2 mois après un IDM induit par ligature permanente de l'artère coronaire gauche comparé au VG de rats mâles sans ligature (Mulder *et al.*, 1997). Parmi les 45 protéines modulées par le RVG après l'IDM, 17 protéines sont impliquées dans la régulation de stress oxydant et du métabolisme (Dubois-Deruy *et al.*, 2017). Les données protéomiques obtenues à partir des VG des rats post-IDM induit par ligature de l'artère coronaire et les données d'interactions entre les microARNs et la région 3'UTR des ARNs messagers disponibles dans la base de données *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) ont été combinées par la biologie des systèmes en un réseau d'interactions microARNs-protéines cibles (Dubois-Deruy *et al.*, 2017) (**Figure 21**).

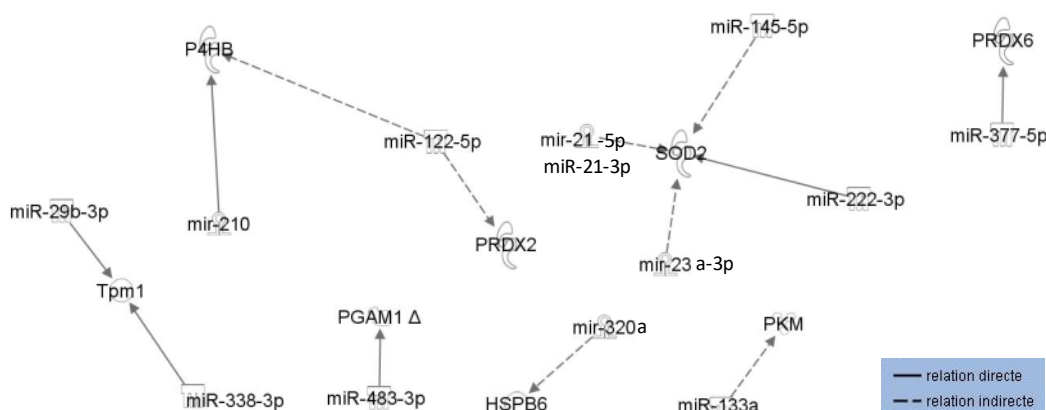


Figure 21: Réseau d'interactions entre les 45 protéines identifiées comme étant modulées dans le VG de rat 2 mois après l'IDM induit par ligature de l'artère coronaire et les microARNs potentiellement capables de les réguler d'après la base de données *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) (Dubois-Deruy *et al.*, 2017). Parmi les 45 protéines, seules 8 ont des interactions avec 13 des microARNs répertoriés dans la base de données IPA. Tpm1 (*Tropomyosin alpha-1 chain*); P4HB (*beta-subunit of prolyl 4-hydroxylase*); phosphoglycérate mutase (PGAM1); peroxirédoxine-2 et -6 (PRDX2 et PRDX6); superoxyde dismutase 2 (SOD2); PKM (*Pyruvate Kinase M1/2*).

Ce réseau d'interactions microARNs-protéines montre que 8 des 45 protéines identifiées pour être modulées par le RVG 2 mois après l'IDM chez le rat sont peut-être régulées (directement ou indirectement) par 13 microARNs différents (Dubois-Deruy *et al.*, 2017). De manière intéressante, ce réseau suggère que 5 des 13 microARNs dont les miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p

peuvent réguler la superoxyde dismutase 2 (SOD2), une enzyme anti oxydante augmentée dans le VG des rats 2 mois après l'IDM (Dubois-Deruy *et al.*, 2017).

Afin de valider les résultats obtenus *in silico*, les expressions des 5 microARNs susceptibles de réguler SOD2 ont été quantifiées dans le VG et le plasma des rats mâles après IDM. Parmi eux, seules les expressions des miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p sont modulées (**Figure 22**)

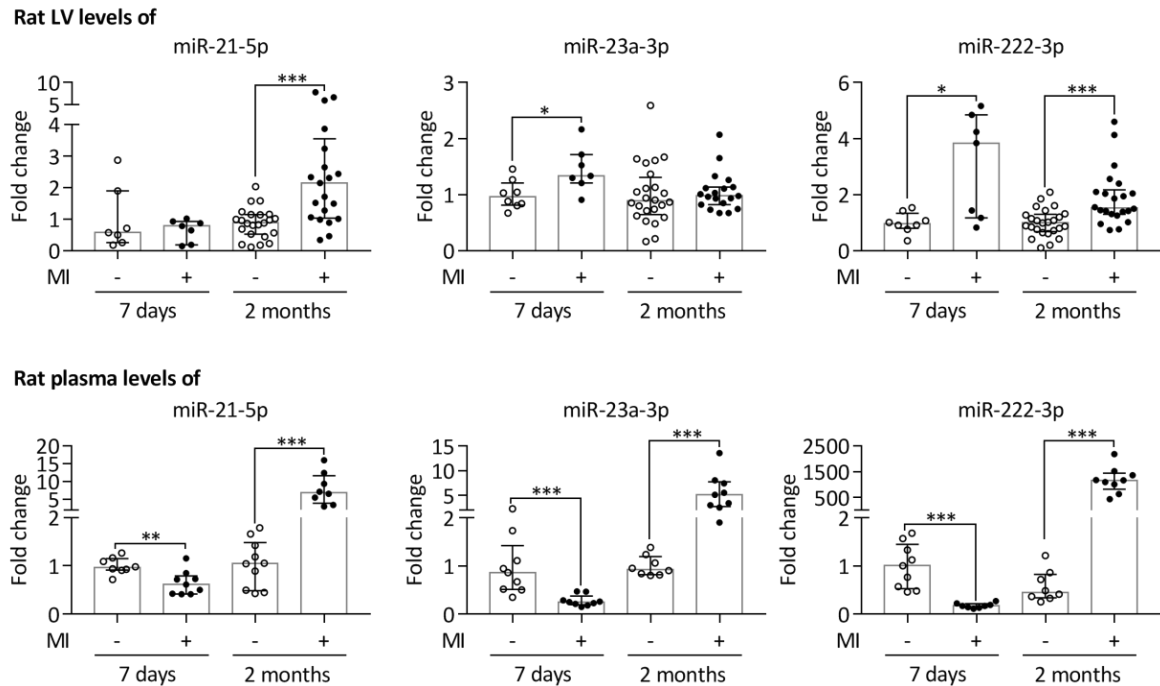


Figure 22: Expression ventriculaire gauche (VG) et plasmatique des miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p chez le rat mâle 7 jours et 2 mois après un infarctus du myocarde (IDM) induit par ligature de l'artère coronaire gauche (+, ronds noirs) ou après une opération contrôlée (-, ronds blancs) (Dubois-Deruy, Cuvelliez, Fieder, Charrier *et al.*, 2017). L'expression des microARNs, quantifiés par RT-qPCR, est normalisée sur l'expression du miR-423-3p dans les VG (n = 7-25) et sur l'expression du Cel-miR-39 dans le plasma (n = 7-10) de rat. Les groupes de données sont présentés en médiane ± Interquartiles et sont comparés par le test de Mann-Whitney: *p < 0.05; **p < 0.01; *p < 0.05..**

Dans les VG des rats mâles post-IDM comparés aux VG des rats mâles contrôles, le miR-23a-3p est augmenté 7 jours après l'IDM, le miR-21-5p est augmenté 2 mois après l'IDM et le miR-222-3p est augmenté 7 jours et 2 mois après l'IDM (**Figure 22**). Dans le plasma des mêmes animaux, les miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p sont diminués 7 jours après l'IDM et augmentés 2 mois après l'IDM (**Figure 22**). Les expressions ventriculaires gauches et plasmatiques des miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p ne sont pas identiques chez les rats 7 jours et 2 mois après l'IDM, ce qui suggère que l'expression plasmatique de ces microARNs ne reflète pas seulement leur expression ventriculaire gauche. **Ce résultat pourrait indiquer que ces 3 microARNs ont d'autres sources que le cœur dans la circulation et que leur sécrétion résulte de mécanismes actifs différents d'une simple diffusion extracellulaire.**

Afin de valider l'association de l'expression plasmatique des miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p avec le RVG après l'IDM chez l'Homme, leur expression plasmatique a été quantifiée chez les patients de l'étude REVE-2 ayant eu un IDM massif, inaugural et antérieur (Fertin *et al*, 2010) (**Matériel et méthodes I.2**). Cette analyse a été effectuée sur les échantillons de plasma prélevés 3-7 jours, 1 mois, 3 mois et un an après l'IDM à partir des patients ayant développé ou non un RVG défini par une différence de VFD entre 3-7 jours et 1 an après l'IDM de 20%. De manière similaire à ce qui est observé chez le rat mâle 7 jours et 2 mois après l'IDM, les expressions des miR-21-5p et miR-222-3p sont détectées diminuées 3-7 jours après l'IDM et augmentées 3 mois après l'IDM; l'expression du miR-23a-3p est quant à elle diminuée 3-7 jours après l'IDM seulement dans le plasma des patients hommes ayant développé un RVG (n = 66) comparé à ceux sans RVG (n = 114) (Dubois-Deruy *et al.*, 2017). **Ces résultats suggèrent que ces 3 microARNs sont des biomarqueurs du RVG après l'IDM et de l'IC. Le stress cellulaire à l'origine de la modulation de leur expression n'est pas encore élucidé.**

IV.2 - Le réseau REVE-2 construit à partir des données multi-omiques issues du plasma des patients post-IDM de l'étude REVE-2 permet d'identifier 24 microARNs susceptibles de réguler des molécules lors du RVG après l'IDM.

D'autre part, l'équipe a mesuré l'expression de 24 variables moléculaires (incluant les miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p) dans les échantillons de plasma prélevés à différents temps des patients de l'étude REVE-2 (Fertin *et al*, 2010; Lamblin *et al*, 2011; Fertin *et al*, 2012; Fertin *et al.*, 2013; Bateurs *et al*, 2013; Eschalié *et al*, 2013; Kumarswamy *et al*, 2014; Dubois-Deruy *et al*, 2017) (**Matériel et méthodes I.2**). Les données générées à partir de la mesure de ces 24 variables et les données d'interactions moléculaires (incluant les interactions entre les microARNs et la région 3'UTR des ARNs messagers) disponibles sur la plateforme EdgeBox (propriété de EdgeLeap) ont été combinées en biologie des systèmes pour construire le réseau REVE-2 qui contient 1310 molécules (Pinet *et al.*, 2017) (**Matériel et méthodes I.3**). Les modules actifs ont été extraits à chaque temps étudiés en utilisant toutes les variables mesurées dans le plasma des patients de l'étude REVE-2 significativement modulées à un temps donné (Pinet *et al.*, 2017). 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 modulées jusqu'à 3 interactions au temps donné (Pinet *et al.*, 2017) (**Figure 23**).

TRAVAUX ANTERIEURS

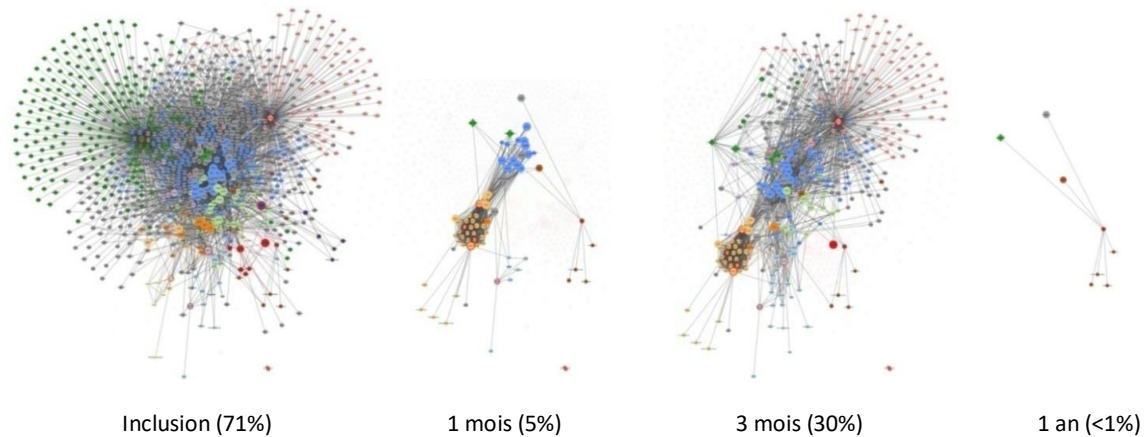


Figure 23: Visualisation des modules actifs du réseau REVE-2 extraits à l'inclusion (entre le 3ème et le 7ème jour), 1 mois, 3 mois et 1 an après l'IDM (Pinet et al., 2017). Les pourcentages indiquent le nombre de nœuds actifs au temps donné par rapport aux 1310 nœuds actifs (dont 24 microARNs) à au moins un des 4 temps du réseau REVE-2. Les 12 couleurs indiquent les 12 mécanismes fonctionnels d'après les annotations de *Gene Ontology* incluant les 24 variables REVE-2 qui sont entourées en rouge. La taille des nœuds est proportionnelle à leur centralité d'intermédiarité dans le réseau REVE-2. Le nœud non connecté au reste du réseau REVE-2 (en bas à droite) aux 3 premiers temps correspond à l'ARN long non codant LIPCAR, une variable REVE-2 pour laquelle aucune interaction n'était connue au moment de la construction du réseau REVE-2.

La visualisation des modules actifs du réseau REVE-2 aux différents temps disponibles montre que la majorité des nœuds (71%) sont actifs entre les 3ème et 7ème jours après l'IDM (Pinet et al., 2017). A ce temps, les mécanismes fonctionnels identifiés *in silico* comprennent l'inflammation, le stress oxydant, la mort cellulaire et le remodelage de la matrice extracellulaire (Pinet et al., 2017). Un mois après l'IDM, la majorité des nœuds du réseau REVE-2 sont inactifs et les 5% de nœuds actifs sont apparentés à des mécanismes de stress oxydant et de contraction musculaire (Pinet et al., 2017). Trois mois après l'IDM, 30% des nœuds sont actifs et les mécanismes apparentés comprennent le remodelage de la matrice extracellulaire et la contraction musculaire (Pinet et al., 2017). Enfin, un an après l'IDM, les nœuds ne semblent plus actifs, ce qui suggère que les mécanismes associés au RVG sont inactifs 1 an après l'IDM (Pinet et al., 2017). Le nombre important de nœuds actifs à l'inclusion des patients et à 3 mois après l'IDM suggère que beaucoup de mécanismes sont actifs à ces temps correspondant respectivement à la phase précoce post-IDM (pour consolider la zone infarctée) et à la phase tardive post-IDM (observée chez les patients qui développent un RVG défavorable après l'IDM). **Parmi les 1310 molécules du réseau REVE-2, 24 microARNs ont été identifiés comme pouvant être impliqués dans le RVG après l'IDM.**

V - Objectifs de thèse

(i) Sélection d'une signature en microARNs associée avec le RVG après l'IDM.

Les microARNs identifiés par les réseaux d'interactions moléculaires construits à partir des données omiques issues des VG des rats post-IDM induit par ligature de l'artère coronaire et des échantillons de plasma des patients post-IDM de l'étude REVE-2 ont été sélectionnés *in silico* et *in vivo* pour leur importance dans le RVG après l'IDM.

(ii) Implication de la fibrose cardiaque et de l'hypertrophie cardiomyocytaire dans la régulation de la signature en microARNs associée avec le RVG après l'IDM.

Les fibroblastes et les cardiomyocytes ventriculaires de rats néonataux ont été utilisés pour étudier 2 mécanismes impliqués dans le RVG post-IDM: la fibrose cardiaque et l'hypertrophie cardiomyocytaire. L'implication de ces 2 mécanismes dans la régulation des microARNs sélectionnés précédemment a été montrée.

(iii) Caractérisation des VEs cardiaques impliquées dans le transport de la signature en microARNs associée avec le RVG après l'IDM.

L'implication des petites VEs, obtenues par ultracentrifugation de milieux de culture conditionnés de fibroblastes cardiaques de rats néonataux et de cardiomyoblastes H9c2, a été montrée dans le transport de la signature en microARNs associée avec le RVG après l'IDM.

La caractérisation morphométrique (NTA, MET) et protéique (marqueurs de la biogénèse des VEs) des petites VEs issues de fibroblastes cardiaques et de cardiomyoblastes H9c2 a montré leur hétérogénéité. La séparation des protéines de ces petites VEs en gel 1D et leur analyse en MALDI TOF/TOF a permis de mettre en évidence des profils protéiques différents selon l'origine cellulaire.

Les VEs intra-ventriculaires et plasmatiques de rats néonataux obtenues par affinité lipidique (EVTRAP) ont été analysées par LC-MS. Parmi les protéines identifiées, les plus abondantes dans les VEs intra-ventriculaires ont été sélectionnées comme marqueurs des VEs intra-ventriculaires. Les petites et grandes VEs obtenues par centrifugation différentielle et les composants non-VEs intra-ventriculaires et plasmatiques obtenus par SEC ont été caractérisés et utilisés pour valider la spécificité des marqueurs identifiés pour leur abondance dans les VEs intra-ventriculaires par rapport aux VEs plasmatiques.

MATERIEL ET METHODES

I – Modèles

I.1 – Ventricules et plasma de rats adultes après un IDM

Le modèle expérimental de rats IC après un IDM (Mulder *et al.*, 1997) est réalisé en collaboration (Inserm U1096, Rouen), dans le respect de la réglementation en vigueur pour les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire (*National Institute of Health*, États-Unis).

Des rats mâles Wistar (Charles River) âgés de 10 semaines sont endormis par injections intrapéritonéales (IP) de sodium méthohexital à 50 mg/kg (anesthésique) et de xylazine à 5 mg/kg (analgésique). L'IDM est induit par ligature permanente de la branche descendante de l'artère coronaire gauche. Les animaux contrôles sont soumis au même protocole expérimental, excepté pour la ligature. Après la chirurgie, les animaux sont traités contre la douleur par IP de xylazine à 50 mg/kg. Pour valider l'induction de l'IC, les paramètres échocardiographiques et morphométriques des animaux sont enregistrés après anesthésie par IP de sodium méthohexital à 50 mg/kg. Sept jours et 2 mois après la chirurgie, les animaux sont euthanasiés par une IP de sodium pentobarbital à 500 mg/kg.

Des échantillons de sang sont prélevés en présence d'EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique) puis centrifugés pendant 15 min à 1600 g afin de séparer le plasma, les cellules du sang et les plaquettes. Le plasma est récupéré puis conservé à -80°C.

Les cœurs sont prélevés et lavés avec le tampon Krebs-Henseleit (120 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 11 mM D-Glucose, 2,5 mM CaCl₂). Les zones nécrosées sont retirées. Le ventricule gauche (VG) est séparé et conservé à -80°C.

I.2 – Etude REVE-2 [REmodelage VEntriculaire 2]

L'étude REVE-2 est une étude multicentrique (Lille, Lens, Roubaix, Béthune, Dunkerque, Boulogne, Saint-Omer et Caen), incluant 246 patients ayant eu un premier IDM antérieur entre 2006 et 2008. L'étude REVE-2, coordonnée par le Pr. C. Bauters (CHRU, Lille), est conçue pour analyser les événements moléculaires du remodelage ventriculaire gauche (RVG) dans le plasma des patients après l'IDM (Fertin *et al.*, 2010). Les critères d'inclusion étaient l'hospitalisation dans les 24 h suivant l'apparition des symptômes et la détection en échocardiographie d'au moins 3 segments akinétiques de la zone infarctée du VG. Les critères d'exclusion étaient un IDM non-antérieur, une maladie chronique non cardiaque, une maladie valvulaire ou des images d'échographie de qualité insuffisante.

MATERIEL ET METHODES

Le protocole de l'étude REVE-2 a été approuvé par le comité d'éthique du Centre Hospitalier de Lille et le consentement écrit de chaque patient a été recueilli. Ce protocole a requis un suivi échocardiographique des patients à la sortie de l'hôpital (entre le 3ème et le 7ème jour), 3 mois et 1 an après l'IDM et des prélèvements sériés de sang en présence d'EDTA à la sortie de l'hôpital (entre le 3ème et le 7ème jour), 1 mois, 3 mois et 1 an après l'IDM. Le plasma a été obtenu comme indiqué précédemment (**Matériel et méthodes I.1**) et a été conservé à -80°C. Le RVG est défini par une augmentation de plus de 20% du volume télédiastolique entre l'inclusion et 1 an après l'IDM. Vingt-quatre variables moléculaires (BNP, CRP, FasL, Galectine-3, HGF, ICTP, MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, P1NP, P3NP, ST2, TIMP1, TIMP2, TIMP4, Troponine, miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-133a, miR-222-3p, miR-423-5p, LIPCAR) ont été quantifiées dans le plasma des patients de l'étude REVE-2 à un ou plusieurs temps (Fertin *et al*, 2010; Lamblin *et al*, 2011; Fertin *et al*, 2012 and 2013; Bauters *et al*, 2013; Eschalié *et al*, 2013; Kumarswamy *et al*, 2014; Dubois-Deruy *et al*, 2017). L'expression de chaque molécule, transformée en Log2, a été comparée entre les patients avec et sans RVG, à chaque temps, par un test de Student bilatéral ($P < 0,05$).

I.3 – Réseau REVE-2

Les données générées à partir de la mesure des 24 variables moléculaires dans les échantillons de plasma des patients de l'étude REVE-2 et les données disponibles sur la plateforme EdgeBox (propriété de EdgeLeap) ont été utilisées pour construire le réseau REVE-2 (Pinet *et al.*, 2017).

Les nœuds du réseau REVE-2 sont (i) les variables REVE-2, (ii) les molécules interagissant directement avec les variables REVE-2 et (iii) les molécules permettant une interaction indirecte avec moins de 3 intermédiaires entre deux variables REVE-2.

Les interactions peu spécifiques entre les nœuds du réseau REVE-2 ont été éliminées en incluant (i) les interactions microARN-cible validées expérimentalement disponibles sur miRTarBase ou prédites par les 3 bases de données Microcosm, miRecords and TargetScan et en excluant (ii) les interactions peu pertinentes biologiquement disponibles sur STRING avec un score inférieur à 800 ou dans la catégorie "*in group*" de WikiPathways.

L'importance des nœuds du réseau REVE-2 a été évaluée par une analyse de la centralité d'intermédiarité. La centralité d'intermédiarité d'un nœud correspond au nombre de chemins les plus courts passant par ce nœud entre toutes les paires de nœuds possibles. 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.

Les nœuds actifs du réseau REVE-2 ont été extraits aux différents temps de prélèvements sanguins en sélectionnant (i) les variables REVE-2 modulées par le RVG ($P < 0,05$), (ii) les molécules

MATERIEL ET METHODES

interagissant directement avec ces variables REVE-2 modulées et (iii) les molécules permettant une interaction indirecte avec moins de 3 intermédiaires entre deux de ces variables REVE-2 modulées.

I.4 – Lignée de cardiomyoblastes H9c2 (CMs-H9c2) de rats embryonnaires

La lignée de cardiomyoblastes H9c2(2-1) (ATCC, CRL-1446) est issue de cardiomyoblastes adhérents et immortalisés de ventricules de rats embryonnaires BDIX (Kimes, 1976). Les cardiomyoblastes H9c2 (CMs-H9c2) ne sont pas contractiles mais prolifératifs. Si la confluence est atteinte, une partie des CMs-H9c2 se différencie en myotubes polynucléés.

Les CMs-H9c2 sont comptés à l'aide d'une cellule de Malassez puis ensemencés à 500 000 cellules par boîte de 57,5 cm² ou à 100 000 cellules par puits de 9,6 cm² et cultivés dans du milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) à 4.5 g/L de glucose supplémenté au GlutaMAX™ (Gibco, 31966-02) avec 10% [v/v] de sérum de veau foetal (SVF) (ATCC, 302020) et 1% [v/v] de pénicilline-streptomycine (PS) (Biosera, XC-A4114) dans un incubateur humide à 5% de CO₂ à 37°C.

Après 48 h, lorsque 70 % de la confluence est atteinte, les CMs-H9c2 sont rincés au PBS 1X (Gibco, 14200) et détachés par l'ajout de 1 mL de Trypsine-EDTA 0.05% [v/v] (Thermo Fisher Scientific, 25300-054) pendant 5 min à 37°C. La réaction est arrêtée par l'ajout de 9 mL de milieu de culture. Les CMs-H9c2 détachés sont précipités par une centrifugation à 1 880 g pendant 10 min et réensemencés. Les CMs-H9c2 sont utilisés après 8 à 15 cycles de détachement-réensemencement, aussi appelés passages, pour induire un stress hypertrophique (**Matériel et méthodes I.7.1**) et pour produire des VEs (**Matériel et méthodes II**).

I.5 – Ventricules et plasma de rats néonataux

Un ou deux jours après la naissance, des rats Wistar (Charles Rivers) sont endormis sur lit de glace (anesthésie par le froid), désinfectés à l'éthanol et sacrifiés par décapitation.

Le sang des animaux est prélevé au niveau du cou de l'animal par capillarité (Sarstedt, 16-444-100) en présence d'EDTA puis centrifugé à 2 000 g pendant 5 min sans frein. Environ 100 µL de plasma par animal est collecté puis clarifié par une centrifugation à 3 000 g pendant 15 min. Le plasma clarifié est conservé à -80°C.

Les cœurs sont prélevés et lavés avec un tampon de conservation (6,8 g/L NaCl, 1 g/L glucose, 0,12 g/L NaH₂PO₄, 0,4 g/L KCl, 0,1 g/L MgSO₄, 4,76 g/L HEPES, pH 7,4). Les ventricules sont séparés et découpés en petits fragments d'environ 2 mm² dans 100 µL de tampon de conservation par animal. Les ventricules coupés issus de deux portées de rats néonataux (environ 24 animaux) et le surnageant riche en VEs infiltrées dans ces ventricules (Loyer et al., 2018) sont séparés par une

centrifugation à 3 000 *g* pendant 15 min et sont conservés à -80°C. Le reste des ventricules coupés est utilisé pour isoler des cardiomyocytes (CMs) et des fibroblastes cardiaques (CFs) (**Matériel et méthodes I.6**).

I.6 – Cultures primaires de CMs et CFs ventriculaires de rats néonataux

I.6.1 – Isolement des CMs et CFs de rats néonataux

Les ventricules coupés de rats néonataux sont pré-digérés pendant 8 min à 37 °C sous agitation dans une solution enzymatique contenant le tampon de conservation, de la collagénase de type II à 0,45 mg/mL (LS004174, Worthington) et de la pancréatine à 0.55 mg/mL (P3292, Sigma-Aldrich). Six autres digestions successives de 15 min à 37°C sous agitation sont ensuite effectuées. Les cellules dissociées du tissu sont séparées de la solution enzymatique par une centrifugation de 800 *g* pendant 7 min et la réaction enzymatique est inhibée par l'ajout de SVF. Les cellules sont séparées par centrifugation pendant 30 min à 1 600 *g* sur un gradient différentiel de Percoll de 58,5% [v/v] et de 40,5% [v/v] (P4937, Sigma-Aldrich). Les CMs sont sédimentés entre les deux gradients de Percoll tandis que les CFs, de par leur faible densité, restent à la surface du Percoll. Les CMs et les CFs sont collectés séparément pour la culture.

I.6.1 – Culture des CMs de rats néonataux

Les CMs sont comptés à l'aide d'une cellule de Malassez puisensemencés à 2 500 000 cellules par boîte de 57,5 cm² et 400 000 cellules par puits de 9,6 cm² préalablement couvertes de collagène à 10% [v/v]. Les CMs sont cultivés dans un incubateur humide à 5% de CO₂ à 37°C dans un milieu de culture qui contient 75% [v/v] de milieu DMEM (D1152, Sigma Aldrich) et 25% [v/v] de Milieu 199 (M4530 Sigma-Aldrich) supplémenté avec 10% [v/v] de sérum de cheval (16050122 Thermo Fisher Scientific), 5% [v/v] de sérum de veau fœtal (SVF) (30.2020, ATCC) et 1% [v/v] de pénicilline-streptomycine (PS) (15140-122, Gibco). Les cellules sont maintenues en culture dans un incubateur humide à 5% de CO₂ à 37°C. Le milieu est renouvelé au bout de 24 h puis toutes les 48 h pour éliminer les débris et les cellules non-adhérentes. Les cardiomyocytes sont utilisés pour induire un stress hypertrophique (**Matériel et méthodes I.7.1**) et pour produire des VEs (**Matériel et méthodes II**) après 5 jours de culture (P0), lorsque 70% [aire/aire] de la confluence est atteinte; leur potentiel prolifératif est alors épuisé et une activité contractile est détectée.

I.6.3 – Culture des CFs de rats néonataux

Les fibroblastes cardiaques sont dénombrés en cellules de Malassez puisensemencés à 2 000 000 cellules par boîte de 57,5 cm², 300 000 cellules par puits de 9,6 cm² et 10 000 cellules par

MATERIEL ET METHODES

puits de 0,64 cm². Les fibroblastes sont cultivés dans un incubateur humide à 5% de CO₂ à 37°C dans le même milieu que celui utilisé pour la culture de cardiomyoblastes H9c2 (**Matériel et méthodes I.4**), changé au bout de 24 h pour éliminer les débris et les cellules non-adhérentes puis renouvelé toutes les 48 h. Lorsque la confluence est atteinte, les fibroblastes cardiaques sont détachés avant d'être réensemencés. Les fibroblastes cardiaques sont utilisés en suspension après l'isolement (T0), après une première mise en culture (P0) et après un passage (P1) pour déterminer la contamination myocytaire et l'état d'activation basal de la fibrose cardiaque. Les fibroblastes P1 ont été utilisés pour induire un stress fibrogénique (**Matériel et méthodes I.7.2**) et pour produire des VEs (**Matériel et méthodes II**).

I.7 – Traitements neuro-hormonaux

I.7.1 – Stimulation de l'hypertrophie des CMs-H9c2 des CMs de rats néonataux

A 60% [aire/aire] de confluence, les cardiomyoblastes H9c2 et les cardiomyocytes de rats néonataux sont rincés au PBS 1X et incubés dans du milieu de culture sans SVF pendant 24 h pour les synchroniser. Les cellules sont ensuite traitées dans du milieu de culture sans SVF avec de la phényléphrine (PE) à une concentration de 20 µM (2838, Tocris Bioscience), avec l'angiotensine II (ANGII) à une concentration de 100 nM (A9525, Sigma Aldrich) et avec l'isoprénaline (ISO) à une concentration de 10 µM (1747, Tocris Bioscience) pendant 24 et 48 h.

I.7.2 – Stimulation de la fibrose cardiaque dans les CFs de rats néonataux

Les fibroblastes cardiaques P1 de rats néonataux, cultivés pendant 48 h dans du milieu avec SVF renouvelé après 24 h, sont rincés au PBS 1X et incubés dans du milieu de culture sans SVF pendant 3 h pour les synchroniser. Les fibroblastes synchronisés sont traités dans du milieu de culture sans SVF avec l'ANGII à une concentration de 2 µM (A9525, Sigma Aldrich) et avec l'ISO à une concentration de 10 µM (1747, Tocris Bioscience) pendant 1 h, 3 h, et 20 h.

II – Production et purification des VEs

II.1 – Conditionnement des CMs-H9c2, des CMs et des CFs de rats néonataux

Les cardiomyoblastes H9c2, les cardiomyocytes et les fibroblastes cardiaques issus de rats néonataux sont conditionnés par rinçage au PBS 1X et incubation dans un volume réduit (5 mL par boîte de 10 cm²) de milieu de culture sans SVF pendant 96 h pour stimuler et concentrer la production de VEs et s'affranchir de la contamination en VEs issue du SVF. Les milieux de culture issus des cellules conditionnées sont collectés et clarifiés des débris cellulaires par une centrifugation à 3 000 g pendant 15 min avant d'être conservés à -20°C.

II.2 – Purifications des VEs

II.2.1 – Centrifugations différentielles

Le milieu de culture issu des cellules conditionnées, la solution de conservation riche en VEs infiltrées dans les ventricules et le plasma de rats néonataux sont décongelés à 4 °C et clarifiés par centrifugation à 3 000 *g* pendant 15 min à 4°C. Les surnageants sont transférés dans des tubes d'ultracentrifugation (342414, Beckman Coulter) complétés si nécessaire avec du PBS 1X filtré à 0.22 µm pour respecter la pression à l'intérieur du tube pendant l'ultracentrifugation. Les surnageants sont centrifugés (ultracentrifugeuse Beckman-XL 70, Rotor 50.2 Ti) à 20 000 *g* puis à 100 000 *g* pendant 70 min à 4 °C avec une accélération maximum et une décélération minimum pour précipiter les pVEs et les gVEs. Les culots obtenus par la centrifugation de 20 000 *g* et de 100 000 *g* sont repris dans 500 µL de PBS 1X filtré à 0.22 µm pour être analysés morphologiquement (**Matériel et méthodes III.2**) ou dans 55 µL de RiPA pour extraire les protéines (**Matériel et méthodes IV**) ou dans un tampon de lyse (SeramiR) pour extraire les ARNs (**Matériel et méthodes V**).

II.2.2 – Chromatographie d'exclusion de taille

La solution de conservation riche en VEs infiltrées dans les ventricules et le plasma des rats néonataux sont décongelés à température ambiante (TA) et centrifugés à nouveau à 3 000 *g* pendant 15 min. Des colonnes de séparation d'exclusion de taille qEVoriginal (iZON) comprenant un filtre de 70 nm sont lavées à TA avec du PBS 1X filtré à 0.22 µm et utilisées pour séparer 500 µL de surnageant. Les fractions de 0.5 mL éluées avec du PBS 1X filtré à 0.22 µm sont collectées et conservées à -80 °C.

II.2.3 – Affinité lipidique (EVtrap)

Les VEs issues de la solution de conservation riche en VEs infiltrées dans les ventricules et du plasma de rats néonataux ont été capturés et analysés par la société Tymora Analytical Operations (West Lafayette, IN). Les échantillons sont décongelés à 4°C et 20 µL sont incubés sous agitation pendant 1 h avec des billes magnétiques "*extracellular vesicles total recovery and purification*" (EVTRAP, Tymora Analytical). Les billes EVtrap, modifiées par des groupements hydrophiles et lipophiles ayant une affinité pour les lipides des VEs sont séparées magnétiquement du reste de l'échantillon, lavées au PBS 1X et séchées. Les VEs capturées par EVtraps sont éluées avec une solution de lyse (12 mM acide désoxycholique, 12 mM sodium lauroyl sarcosinate, 10 mM Tris[2-carboxyethyl] phosphine-HCl, 40 mM chloroacétamide, et 1%

[v/v] de cocktail d'inhibiteurs de phosphatase 100X (Millipore-Sigma) dans 50 mM Tris-HCl, pH 8.5).

III – Caractérisation de la morphologie des cellules et des VEs

III.1 – Morphologie des cellules

III.1.1 – Microscopie confocale à fluorescence des cellules

Les cellules mises en culture sur des lamelles de verre sont rincées 2 fois au PBS 1X (P3563, Sigma Aldrich) et fixées pendant 15 min à TA dans une solution de PBS 1X contenant du paraformaldéhyde (43368, Alfa Aesar) à 4% [v/v]. Les cellules sont lavées au PBS 1X 3 fois pendant 5 min et conservées à 4°C. Les cellules sont perméabilisées avec du Triton 100X (882905, Hopkin Williams) à 0.1% [v/v] pendant 20 min à TA et rincées 5 fois au PBS 1X. Les cellules sont saturées à l'albumine de sérum bovin à 1% [m/v] (PM-T1726, Biosera) pendant 2 h à TA et incubées avec l'anticorps primaire dirigé contre l' α -actinine (ab81265) dilué à 1/100 dans du PBS 1X pendant la nuit à 4°C. Les étapes suivantes sont effectuées à l'abri de la lumière. Les cellules sont lavées au PBS 1X 3 fois pendant 10 min à TA et incubées avec l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à un fluorochrome rouge à 555 nm (A21469, Invitrogen) dilué à 1/300 dans du PBS 1X pendant 2 h à TA. Les cellules sont rincées au PBS 1X à TA et incubées avec la solution de Hoechst à 1 μ g/mL (H3569, Fisher Scientific) pendant 10 min à TA. Les cellules sont lavées au PBS 1X 3 fois pendant 10 min à TA. Les cellules, incubées dans du glycérol à 90% [v/v] (G7757, Sigma Aldrich), sont serties entre lame et lamelle avec du vernis à ongle et conservées à 4°C.

Les cellules marquées sont analysées à l'aide d'un microscope confocal ZEISS LSM 710 équipé d'une diode UV et de 3 lasers dans le visible (un laser argon multi-raies à 458 nm, 477 nm, 488 nm, et 514 nm et deux lasers hélium-néon à 543 nm et 633 nm). L'utilisation du laser argon multi-raies à 458 nm permet de visualiser les noyaux des cellules colorés au Hoechst. Le laser argon multi-raies à 488 nm est utilisé pour observer les protéines via la détection du fluorochrome Alexa 488 et le laser hélium-néon à 543 nm permet de visualiser les protéines via l'Alexa 555.

III.3.2 – Suivi en temps réel de la prolifération/adhésion des CFs

Les fibroblastes cardiaques de rats néonataux P1 sontensemencés dans des puits de 0,64 cm² couverts à 80% d'électrodes en or (00300600840, ACEA Biosciences) à partir desquelles un courant alternatif de faible voltage (20 mV) est généré dans le milieu de culture d'une électrode à une autre par un système iCELLingence (00380601000, ACEA Biosciences). La résistance électrique des fibroblastes cardiaques P1 adhérents (RCell) est enregistrée par une unité de contrôle (00380601430, ACEA Biosciences) équipée du logiciel RTCA Lite (00310100210, ACEA Biosciences)

et est exprimée à chaque temps en index cellulaire (ICell) défini par l'équation: $ICell = (R_{Cell} - R_m) / R_m$ où R_m correspond à la résistance électrique du milieu sans les cellules.

Deux cents microlitres de milieu de culture de fibroblastes cardiaques avec SVF sont ajoutés dans chaque puits pour mesurer la résistance normale et calibrer l'appareil. Après l'ensemencement des fibroblastes cardiaques P1, le volume final de milieu de culture avec SVF est complété jusqu'à 500 μ L par puits. Les E-Plates L8 (2 par expérience) sont incubées à 37°C et 5% de CO₂ et l'indice cellulaire est enregistré toutes les 2 min jusqu'à la fin de l'expérience. La confluence des fibroblastes cardiaques P1 est vérifiée ponctuellement en microscopie optique (Nikon Eclipse TS100) dans la zone dépourvue d'électrodes. Pour faciliter l'analyse statistique, les fibroblastes cardiaques P1 issus de 2 préparations différentes ont été analysés sur la même expérience et chaque condition a été répliquée 2 à 3 fois. L'expérience est ensuite répétée une fois.

III.2– Morphologie des VEs

III.2.1 – Analyse du suivi individuel des particules (NTA)

Les VEs non-purifiées et purifiées contenues dans du PBS 1X filtré à 0.22 μ m sont analysées avec un NanoSight (NS300, Malvern Technologies) équipé d'un laser à 488 nm et d'une caméra sCMOS (*scientific complementary metal–oxide–semiconductor*) en collaboration avec le Dr Colin (U1172, Lille). Les échantillons sont injectés avec un débit constant de 20 μ L/min à travers le laser et 5 vidéos de 60 secondes avec plus de 200 points détectés sont réalisées avec un niveau de caméra à 14 et un seuil de détection de 4. L'appareil est lavé par injection de 3 mL de PBS 1x filtré à 0.22 μ m et l'absence de signal est vérifiée avant l'ajout d'un nouvel échantillon. Les vidéos sont enregistrées et analysées avec le logiciel NTA version 3.2 (Malvern Technologies) et celles pour lesquelles des vibrations ou des signaux aspécifiques ont été détectés sont exclues de l'analyse. Pour comparer la concentration des particules détectées à partir de différents échantillons, une normalisation sur le nombre de cellules ou sur le nombre d'animaux est effectuée. Pour comparer la distribution de tailles des particules détectées dans des échantillons différents, le nombre de particules par taille de chaque échantillon est divisé par le nombre total de particules détectées dans chaque échantillon.

III.2.2– Analyse en microscopie électronique à transmission (MET)

Les VEs non-purifiées et purifiées contenues dans du PBS 1X filtré à 0.22 μ m sont analysées en microscopie électronique à transmission (MET) par la plateforme BICeL (Lille). Cinq microlitres de VEs non-purifiées et purifiées dans du PBS 1X filtré à 0.22 μ m sont déposés sur une grille de

Cuivre de 400 Mesh couverte d'un film de Formvar-carbone à propriété hydrophile et lipophile pendant 5 min à TA. La grille est séchée puis, 10 µL d'acide phosphotungstique (19500, EMS) sont ajoutés sur la grille pendant 5 min à TA pour colorer négativement les structures biologiques. La grille est séchée et observée à 80 kV avec un MET (Hitachi H7500) équipé d'une caméra numérique (AMT).

IV –Caractérisation des protéines des cellules et des VEs

IV.1 – Extraction des protéines

IV.1.1 – Protéines solubles en RIPA

Les échantillons (cellules, VEs non-purifiées et purifiées) sont lysés mécaniquement à l'aide du tampon de radioimmunoprécipitation (RIPA) 1X (50 mM Tris base (pH 7,4), 150 mM NaCl, 100 mM sodium orthovanadate, 1% [v/v] NP40, 1% [m/v] SDS, 0,1% [v/v] sodium desoxycholate, 1% [m/v] antiproteases complete (Roche Diagnostics) et 1% [v/v] antiphosphatases (phosphatase inhibitor cocktail 2 et 3, Sigma Aldrich). Pour augmenter leur lyse, les VEs non purifiées et purifiées sont ensuite soniquées à 72 W pendant 10 secondes. Les lysats sont incubés pendant 1 h sous agitation à 4°C puis centrifugés à 12 000 g pendant 15 min à 4°C. Les surnageants contenant les protéines solubles en RIPA sont conservés à -20°C.

IV.1.2 – Protéines insolubles en RIPA et solubles en urée

Les culots issus de la centrifugation à 12 000 g pendant 15 min à 4°C des fibroblastes cardiaques lysés au RIPA contenant les protéines insolubles en RIPA et les débris membranaires sont resuspendus dans du tampon urée (5 M urée (Sigma-Aldrich), 2 M thiourée (Sigma-Aldrich), 50 mM DTT (Bio-Rad), 0,1% [m/v] SDS, dans du PBS pH 7.4). Les lysats sont ensuite soniqués à 72 W pendant 10 secondes et sont centrifugés à 12 000 g pendant 15 min à 4°C. Les surnageants contenant les protéines solubles en urée mais insolubles en RIPA sont conservés à -20°C.

IV.1.3 – Dosage des protéines

Les extraits protéiques issus des VEs non purifiées et purifiées sont quantifiés par colorimétrie selon la méthode de l'acide bicinchoninique (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific). En présence de protéines, les ions Cu^{2+} sont réduits en ions Cu^+ . Les ions Cu^+ sont chélatés par 2 molécules de BCA, produisant un complexe pourpre dont l'absorbance à 562 nm est proportionnelle à la quantité de protéines. Une gamme d'albumine de sérum bovin (BSA) à concentration connue a été réalisée afin de détecter les protéines dans des concentrations comprises entre 0.5 µg/mL et 1.5 mg/mL.

MATERIEL ET METHODES

Les extraits protéiques issus des cellules sont quantifiés par colorimétrie selon la méthode de Bradford (Biorad protein assay). En présence de protéines, le bleu de Coomassie prend sa forme anionique pour se lier aux résidus arginine, tyrosine, tryptophane, histidine et phénylalanine des protéines produisant un complexe bleu dont l'absorbance à 595 nm est proportionnelle à la quantité de protéines. Sans protéines, le bleu de Coomassie a une forme libre, cationique et de couleur rouge absorbant à 470 nm. Une gamme de BSA à concentration connue a été réalisée afin de détecter les protéines dans des concentrations comprises entre 1 µg/mL et 20 µg/mL.

IV.2 – Western blot

IV.2.1–Séparation en gel 1D, transfert sur une membrane et détection des protéines totales

Les extraits protéiques sont prélevés en quantité protéique équivalente : 20 µg pour les protéines solubles en RIPA et 10 µg pour les protéines insolubles en RIPA et solubles en urée. Les échantillons sont dilués dans du tampon Laemmli (62,5 mM Tris HCl pH 6.8, 2% [m/v] dodécylsulfate de sodium (SDS), 25% [v/v] Glycérol, 0,01 % [m/v] bleu de bromophénol, 5% [v/v] β-mercaptoéthanol) et sont dénaturés pendant 10 min à 95 °C.

Les échantillons sont déposés dans un gel de polyacrylamide (de 7 à 10% [m/v] selon le poids moléculaire de la protéine d'intérêt) en présence de SDS (SDS-PAGE). Les échantillons et un marqueur de poids moléculaire sont séparés par électrophorèse à 120 mV en présence du tampon de migration (250 mM Tris Base, 1,9 M glycine, 35 mM SDS) jusqu'à la sortie du bleu de bromophénol. La technologie "*stain free*" (2553132, Biorad) permet de détecter quantitativement les protéines dans le gel après exposition aux UVs pour valider l'homogénéité de la quantité de protéines déposées. Les protéines sont ensuite transférées grâce au système de transfert Trans-Blot Turbo™ (Biorad) pendant 10 min à 1,3 A et 25 mV sur une membrane en nitrocellulose (170-4158, Bio-Rad). Sans la technologie "*stain free*", l'homogénéité de la quantité de protéines déposées et la qualité du transfert sont estimées par une coloration des protéines sur la membrane au rouge Ponceau (0.1% [m/v] rouge Ponceau, 5% [v/v] acide acétique).

IV.2.2 – Immunodétection et quantification d'une protéine

Les membranes sont saturées dans une solution TBS-tween (0,1 M Tris HCl pH 7,4, 0,1% [v/v] tween, 150 mM NaCl) avec 5% [m/v] de lait pour éviter les liaisons non-spécifiques des anticorps avec des protéines. Les membranes sont ensuite incubées sous agitation successivement avec l'anticorps primaire (**Tableau 4**) pendant 1 nuit à 4°C, puis avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort et dirigé contre l'isotype de l'anticorps primaire (anti-lapin (LNA934V/AG, GE Healthcare), anti-souris (LNA931V/AG, GE Healthcare et anti-chèvre (SC-2020, Santa Cruz), à

MATERIEL ET METHODES

1/5000 pendant 1 h à TA. Trois étapes de lavage au TBS-tween 0,1% [v/v] sous agitation pendant 10 min à TA sont réalisées pour éliminer les anticorps non fixés.

Tableau 4: Anticorps utilisés en *western blot*

Protéine	Région cible	Poids moléculaire	Dilution	Clonalité	Fournisseur	Référence
α-actinin	750 - 850 aa	103 kDa	1/500	Monoclonal	Abcam	ab81265
α-SMA	Extrémité N-term	42 kDa	1/4000	Monoclonal	Abcam	ab32595
Albumin	Toute la protéine	68 kDa	1/1000	Monoclonal	Invitrogen	MA532531
Akt	Extrémité C-term	60 kDa	1/1000	Polyclonal	Cell Signaling	9272
P-Akt	Ser473	60 kDa	1/1000	Polyclonal	Cell Signaling	9271
cTnT	Inconnue	40 kDa	1/500	Monoclonal	Santa Cruz	sc-20025
CD63	Inconnue	26 kDa	1/200	Monoclonal	Abcam	ab108950
CD63	Domaine extracellulaire	26 kDa 30-60 kDa (formes glycosylées)	1/200	Polyclonal	Santa Cruz	sc-25183
CD81	90 - 210 aa	26 kDa	1/1000	Monoclonal	Santa Cruz	sc-166039
CD9	Val178	22, 24, 35 kDa	1/1000	Monoclonal	Cell Signaling	D3H4P
Col1	Inconnue	130 kDa	1/1000	Polyclonal	Gene Tex	GTX102997
Col3	Extrémité C-term	139 kDa	1/500	Polyclonal	Gene Tex	GTX102997
Desmin	500 aa - C-term	53 kDa	1/10000	Monoclonal	Abcam	ab32362
Fibrinogen-β	Extrémité C-term	56 kDa	1/1000	Polyclonal	Santa Cruz	sc-18029
LDB3	1 - 283 aa	32 kDa 78-80 kDa	1/1000	Polyclonal	Proteintech	11004-1-AP
MVP	544 - 893 aa	99 kDa	1/2500	Polyclonal	Proteintech	16478-1-AP
SMM	Chaîne lourde	200 kDa (Monomère) 400 kDa (dimère)	1/2000	Monoclonal	DAKO	M8421
YB-1	166 - 265 aa	24, 36, 42 kDa	1/1000	Polyclonal	Sigma Aldrich	HPA040304

Les membranes sont incubées pendant 5 min à l'abri de la lumière avec les réactifs de chimioluminescence renforcée du kit Clarity™ (Bio-Rad). Ces réactifs contiennent du luminol, dont l'oxydation, catalysée par la peroxydase de raifort, est à l'origine d'un signal de chimioluminescence sur la membrane détectée par la caméra ChemiDoc™XRS (Bio-Rad). Le poids moléculaire correspondant au signal de chimioluminescence obtenu permet d'estimer la spécificité du signal pour la protéine détectée. L'intensité du signal spécifique correspondant à l'expression de la protéine d'intérêt est quantifiée par densitométrie avec le logiciel ImageLab™ (Bio-Rad) et est normalisée par rapport à la quantité de protéines détectées dans le gel par la technologie "stain free" ou par la quantité de protéines détectées sur la membrane par la coloration au rouge Ponceau.

IV.3 – Analyses protéomiques

IV.3.1 – Séparation des protéines en gel 1D et MALDI-TOF/TOF

IV.3.1.1 - Coloration des protéines au bleu de Coomassie colloïdal

Pour fixer les protéines séparées dans le gel, le gel est incubé 2 fois avec une solution contenant 50% [v/v] d'éthanol (Merck Millipore, 100983) et 2% [v/v] d'acide orthophosphorique (Merck Millipore, 100573) pendant 1 h sous agitation à TA. Le gel est lavé dans une solution contenant 2% [v/v] d'acide orthophosphorique (Merck Millipore, 100573) pendant 1 h sous agitation à TA puis est incubé dans une solution de prétrempage contenant du sulfate d'ammonium à 15% [m/v] (Merck Millipore, 101217), de l'éthanol à 17% [v/v] (Merck Millipore, 100983) et de l'acide orthophosphorique à 2% [v/v] (Merck Millipore, 100573) pendant 20 min sous agitation à TA. Le gel est ensuite incubé avec la solution de coloration constituée de la solution de prétrempage et du bleu de Coomassie colloïdal G250 à 0.1% [m/v] (Thermo Fisher Scientific, 20279) pendant 3 jours sous agitation à TA. Le colorant non fixé aux protéines est éliminé par 2 rinçages dans l'eau ultra pure.

IV.3.1.2 - Digestion des protéines à la trypsine

Les protéines fixées dans le gel et visibles après la coloration au bleu de Coomassie colloïdal sont excisées et décolorées par 3 lavages dans du bicarbonate d'ammonium à 50 mM (Merck Millipore, 101131) pendant 15 min sous agitation à TA. Les fragments de gel sont lavés avec de l'acétonitrile à 50% [v/v] (Merck Millipore, 100030) dans du bicarbonate d'ammonium à 100 mM. Les protéines sont réduites et alkylées par incubations successives avec du dithiothréitol à 1.5% [m/v] (Merck Millipore, 111474) dans du bicarbonate d'ammonium à 50 mM (Merck Millipore, 101131) pendant 30 min à 56 °C et avec du iodoacétamide 10,2% [m/v] (Merck Millipore, 804744) dans du bicarbonate d'ammonium à 50 mM (Merck Millipore, 101131) pendant 30 min à TA à l'obscurité. Après lavage dans du bicarbonate d'ammonium à 50 mM (Merck Millipore, 101131), les fragments de gel sont déshydratés par incubation dans de l'acétonitrile (Merck Millipore, 100030) pendant 10 min à TA. Le solvant est éliminé par évaporation. Les protéines sont digérées en présence d'agent de surface ProteasMAX à 0.025% [v/v] (V2071, Promega) dans du bicarbonate d'ammonium à 50 mM (Merck Millipore, 101131) à l'aide de la trypsine à 8 µg/mL (V5280, Promega) pendant 12 h à 37°C.

IV.3.1.3 - Extraction des peptides

Les fragments de gel sont acidifiés avec l'ajout d'acide trifluoroacétique à 0.1% [v/v] (Merck Millipore, 108178). Après 10 min, le surnageant contenant les peptides hydrophiles élués sont

collectés. Les gels sont incubés avec de l'acétonitrile à 50% [v/v] (Merck Millipore, 100030) et de l'acide trifluoroacétique à 0.1% [v/v] pendant 10 min sous agitation à TA et les peptides hydrophobes élués sont mélangés avec les peptides hydrophiles précédemment collectés. Les extraits peptidiques sont ensuite séchés et dessalés à l'aide de cônes ZIP-Tip C18 (Merck Millipore) selon les instructions du fournisseur et élués dans 3 µL d'acide trifluoroacétique à 0.1% [v/v] avec de l'acétonitrile à 50% [v/v]. Les extraits peptidiques dessalés sont conservés à -80°C.

IV.3.1.4 - Analyse en MALDI-TOF/TOF

Les extraits peptidiques dessalés sont mélangés avec une solution de matrice contenant de l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique à 5 mg/mL dans de l'acide trifluoroacétique à 0.1% [v/v] avec de l'acétonitrile à 50% [v/v]. Un extrait peptidique dessalé de BSA à 0.5 µg/mL est utilisé pour la calibration. L'analyse en MALDI-TOF est effectuée avec un spectromètre de masse Voyager DE STR (PerSeptive Biosystems) équipé avec laser à nitrogène émettant à 337.1 nm avec un délai d'extraction de 125 ms qui confère aux ions avec un temps de vol plus long une énergie plus élevée qui leur permet d'atteindre le détecteur en même temps que les ions plus rapides. Les spectres MS sont acquis avec environ 300 excitations au laser à 20 000 V par échantillon. En cas de faible nombre de peptides détectés, un spectre MS/MS est obtenu après fragmentation par collision avec un gaz inerte (l'argon).

IV.3.1.4 - Identification des protéines par empreinte massique

Les empreintes massiques obtenues sont comparées à la base de données Uniprot datant de septembre 2017 avec le moteur de recherche MASCOT v2.6.0.242 (Matrix Science). Les critères de recherches incluent une carbamidométhylation des résidus cystéines (+57.0214 Da), une modification variable de l'oxydation (+15.9949 Da) des résidus méthionines et de l'acétylation (+42.011 Da) de l'extrémité amine des protéines. Les empreintes massiques sont analysées par recherche des peptides théoriquement produits après la digestion à la trypsine en autorisant un maximum de 2 clivages manqués par peptide analysé. Le taux de fausses découvertes (FDR) de peptides et de protéines est fixé à 0.01%. Toutes les identifications de peptides et de protéines sont groupées et les identifications redondantes sont éliminées. Seuls les peptides et les protéines uniques sont conservés.

IV.3.2 – Séparation des protéines par chromatographie en phase liquide et LC-MS

IV.3.2.1 - Préparation des échantillons

Les protéines des VEs capturées par EVtrap sont réduites et alkylées par le Tris[2-carboxyethyl] phosphine-HCl et le chloroacétamide pendant 10 min à 95°C. Les échantillons sont dilués au 1/5 [v/v] dans du bicarbonate d'ammonium à 50 mM et digérés à l'endoprotéinase Lys-C à 1% [m/m] d'enzymes sur protéines (Wako) pendant 3 h à 37 °C, hydrolysant les protéines après l'extrémité C-terminale des résidus lysine. La trypsine à 2% [m/m] d'enzymes sur protéines, est ensuite ajoutée pour une digestion pendant la nuit à 37°C. Pour éliminer les agents de surfaces, les échantillons sont acidifiés avec l'ajout d'acide trifluoroacétique à 1% [v/v] et un volume d'acétate d'éthyle. Les échantillons sont vortexés pendant 2 min puis centrifugés à 16 000 g pendant 2 min. La phase organique (au-dessus) est jetée avant de collecter la phase aqueuse. Cette étape est répétée une fois. Les échantillons sont ensuite séchés et dessalés à l'aide de cônes Top-Tip C18 (Glygen) selon les instructions du fournisseur. Les échantillons sont séchés et conservés à -80°C.

IV.3.2.2 - Analyse en LC-MS/MS

Les échantillons sont resuspendus dans 4,8 µL d'acide formique avec de l'acétonitrile à 3% [v/v] et 4 µL sont injectés dans un chromatographe EASY-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific). Les peptides sont séparés sur une colonne de 45 cm contenant de la résine C18 (2.2 µm, 100 Å; Michrom Bioresources). Pour séparer les échantillons, un tampon de phase mobile contenant de l'acide formique à 0,1% [v/v] dans de l'eau ultra pure (A) et un tampon d'élution contenant 0,1% [v/v] d'acide formique à 80% [v/v] d'acétonitrile (B) sont injectés pendant 60 min avec un gradient linéaire de 6-30% de B/A avec un débit de 250 nL/min. Le chromatographe Easy-nLC 1000 est couplé avec un spectrophotomètre de masse hybride à trappe d'ions LTQ-Orbitrap Velos Pro (Thermo Fisher Scientific). Le spectrophotomètre de masse acquiert d'abord un spectre massique (MS) des peptides ionisés allant d'un rapport masse/charge (m/z) de 300 à 1 500 m/z puis un spectre MS/MS est obtenu sur les fragments des 10 peptides les plus intenses capturés par la trappe d'ions et fragmentés par collision avec un gaz inerte (l'argon).

IV.3.2.3 - Identification des protéines par empreinte massique

Les empreintes massiques obtenues sont comparées à la base de données Uniprot avec une version téléchargée en février 2019 en utilisant le moteur de recherche Byonic (Protein Metrics) intégré dans le logiciel Proteome Discoverer v2.2 (Thermo Fisher Scientific). La tolérance de masse initiale est fixée à 10 ppm, la tolérance de masse finale est fixée à 6 ppm et la tolérance de la trappe d'ions MS/MS est fixée à 0,6 Da. Les critères de recherche incluent une

carbamidométhylation des résidus cystéines (+57.0214 Da), une modification variable de l'oxydation (+15.9949 Da) des résidus méthionines et de l'acétylation (+42.011 Da) de l'extrémité amine des protéines. Les empreintes massiques sont analysées par recherche des peptides théoriquement produits après la digestion à la trypsine en autorisant un maximum de 2 clivages manqués par peptide analysé. Le FDR de peptides et de protéines est fixé à 0.01%. Toutes les identifications de peptides et de protéines sont groupées et les identifications redondantes sont éliminées. Seuls les peptides et les protéines uniques sont conservés.

IV.3.2.4 – Quantification des protéines identifiées sans marquage

Les peptides sont quantifiés sans marquage à l'aide du logiciel Proteome Discoverer v2.2 (Thermo Fisher Scientific). Les intensités des pics MS correspondant aux peptides ionisés sont extraites (tolérance de masse initiale de 10 ppm, nombre minimum de pics isotopiques de 2, longueur de pic de 0.2 min) et une intensité protéique est obtenue. Les intensités de toutes les protéines détectées sont additionnées et le ratio sur cette somme d'intensité est utilisé pour comparer l'abondance des protéines entre les échantillons.

IV.3.2.5 – Analyse statistique des protéines identifiées

L'abondance des protéines identifiées entre les échantillons est analysée à l'aide du logiciel Perseus v1.6.5 (<https://maxquant.net/perseus/>). Les protéines non-détectées dans au moins 3/4 des échantillons d'un groupe sont exclues. Les abondances protéiques sont transformées en Log2. Les valeurs manquantes sont substituées par des valeurs de faible abondance. Les données sont comparées par un test de Student bilatéral ($P < 0,05$) en utilisant la correction de Benjamini-Hochberg. Les différences d'abondances (en Log2) et les valeurs de P sont visualisées par un nuage de points (volcano plot).

V – Caractérisation des ARNs

V.1 – Extraction des ARNs

V.1.1 – ARNs des tissus

Les ARNs de tissu cardiaque de rat sont extraits selon la méthode du Trizol (T9424, Sigma Aldrich). Environ 60 mg de VG sont broyés à l'aide d'un homogénéiseur Ultra-Turrax dans 2 mL de "TRI Reagent" (T9424, Sigma Aldrich). Un volume égal de chloroforme (34854, Sigma Aldrich) est ajouté. Une centrifugation à 12 000 g pendant 12 min permet de séparer le mélange en deux phases. La phase supérieure contenant les ARNs est collectée et un volume identique d'isopropanol (190764, Sigma Aldrich) est ajouté pendant 24 h à -20°C . Une centrifugation à

MATERIEL ET METHODES

13 000 g pendant 30 min est effectuée et le culot d'ARNs est lavé à l'éthanol 70% avant d'être séché à 4°C pendant 2 h. Enfin, les ARNs sont repris dans 40 µL d'eau sans RNase et sont incubés à 85°C pendant 5 min afin de les solubiliser. Les ARNs obtenus sont conservés à -80°C.

V.1.2 – ARNs du plasma

Les ARNs de plasma de rat sont extraits avec le kit "*RNeasy Plus*" (217184, Qiagen). Un volume de 50 µL de plasma de rat est lysé avec 250 µL de tampon RLT pendant 5 min à TA. Le microARN synthétique Cel-miR-39 à la concentration de 5 nM/µL (219610, Qiagen) est ajouté à la préparation comme contrôle quantitatif. Cinquante µL de chloroforme (34854, Sigma Aldrich) sont mélangés à la préparation. Après une centrifugation de 12 000 g pendant 15 min à 4 °C, les ARNs contenus dans la phase aqueuse sont capturés sur une colonne d'affinité avant d'être élués avec de l'eau sans RNase. Les ARNs obtenus sont conservés à -80°C.

V.1.3 – ARNs des cellules

Les ARNs de cellules de rat sont extraits avec le kit "*RNeasy Plus*" (74136, Qiagen). Les cellules sont lavées au PBS 1X puis lysées avec 350 µL de tampon RLT. L'ADN génomique est éliminé du lysat par passage sur colonne. L'ARN total est capturé sur colonne d'affinité avant d'être élué avec de l'eau sans RNase. L'échantillon d'ARN obtenu est conservé à -80°C.

V.1.4 – ARNs des VEs

L'extraction des ARNs à partir des VEs est réalisée selon les instructions du kit "*SeraMir*" (RA806A-1, System Biosciences). Le microARN synthétique Cel-miR-39 à la concentration de 5 nM/µL (219610, Qiagen) est ajouté à la préparation comme contrôle quantitatif. Le culot de VEs est repris dans 100 µL de tampon de lyse du kit puis l'ARN est purifié sur colonne d'affinité. L'échantillon d'ARN obtenu est conservé à -80°C.

V.2– Quantification et analyse de l'intégrité des ARNs

La concentration et la pureté des ARN extraits sont évaluées avec un spectrophotomètre NanoVue (GE Healthcare). La qualité des échantillons est estimée grâce à leur "*RNA Integrity Number*" (RIN), mesuré grâce à une puce à ARN Pico6000 (Agilent) sur le Bioanalyzer 2100 (Agilent). Pour une analyse fiable des ARNm en PCR quantitative (qPCR), les échantillons avec un RIN supérieur ou égal à 7 ont été utilisés.

MATERIEL ET METHODES

V.3 – Rétrotranscription des ARNs messagers et des microARNs en ADNc

Les ARNs (100 et 500 ng) sont rétrotranscrits en ADNc complémentaires (ADNc) selon le kit miScript II RT (218161, Qiagen). Le mix réactionnel est incubé pendant 60 min à 37°C, puis 5 min à 95°C et est refroidi immédiatement à 4°C. L'ADN rétrotranscrit est conservé à -20°C.

V.4– Amplification des ADNc par qPCR

Les séquences d'ADNc d'intérêt présentées dans le **tableau 5** sont amplifiées selon les instructions du kit QuantiTect® SYBR® Green PCR (218073, Qiagen).

Tableau 5: Amorces utilisées en qPCR

Séquence cible	Amorces	Hybridation
miR-21-5p	Rn_miR-21-2 (MS00013216, Qiagen)	55°C
miR-23a-3p	Rn_miR-23a-1 (MS00033327, Qiagen)	55°C
miR-222-3p	Rn_miR-222-1 (MS00008169, Qiagen)	55°C
miR-26b-5p	Rn_miR-26b_1 (MS00000140, Qiagen)	55°C
miR-17-5p	Rn_miR-17-5p_1 (MS00013118, Qiagen)	55°C
miR-335-5p	Rn_miR-335_2 (MS00043414, Qiagen)	55°C
miR-375-3p	Rn_miR-375_2 (MS00033516, Qiagen)	55°C
miR-423-3p	Rn_miR-423_1 (MS00013615, Qiagen)	55°C
RNU6-2	Hs_RNU6-2_11 (MS00033740, Qiagen)	55°C
Cel-miR-39	Ce_miR-39_1 (MS00019789, Qiagen)	55°C
<i>Connective tissue growth factor</i> (CTGF)	5'- TGT AAA CAC CCC AGC GAA GAA -3' 5'- CTG AGT TGC CAT TTC CTT GGA -3'	59°C
<i>α-smooth muscle actin</i> (α-SMA)	5'- ACT ACT GCC GAG CGT GAG AT -3' 5'- CTT CTC CAG GGA GGA AGA GG -3'	55°C
<i>Type I procollagen</i> (proCol1)	5'- TGA CCC CTG CGA CCC ACA -3' 5'- TAC ACC GAC CCA CCG AAG ACA CAG -3'	48°C
Hypoxanthine phospho-ribosyltransférase (HPRT)	5'- ATG GGA GGC CAT CAC ATT GT -3' 5'- TGT AAT CCA GCA GGT CAG CAA -3'	55°C

Une gamme d'ADNc avec 7 dilutions au 1/2 est réalisée pour chaque couple d'amorces. La réaction d'amplification est considérée quantitative lorsque l'efficacité de doublement est de 100±10%. Des témoins négatifs, sans ADNc, sont aussi analysés pour vérifier l'absence de contamination des réactifs par des ADNc extérieurs. La réaction est effectuée avec un équipement

PCR Stratagene Mx30050 (Agilent). Le profil thermique utilisé avec le logiciel MxPro est: 15 min de dénaturation à 95°C ; puis 35 cycles de 10 sec de dénaturation à 95°C, 1 min d'hybridation à la température indiquée dans la table 2, 1 min d'élongation à 72°C. La mesure de la température de dissociation entre l'amorce et l'ADNc permet de déterminer la spécificité de chaque amplification. Pour cela un cycle final correspondant à 1 min de dénaturation à 94°C, 30 sec d'hybridation à 55°C et 30 sec de dénaturation à 95°C a été ajouté. La quantité d'ARNs cibles est évaluée dans un échantillon par la différence de son intensité seuil (Ct) avec le Ct d'un ARN normalisateur (ΔCt), appliquée dans la formule $2^{-(\Delta Ct)}$.

VI – Analyse statistique

La distribution des données de chacun des groupes a été évaluée par le test de normalité d'Agostino-Pearson. Pour comparer deux groupes de données, le test paramétrique de Student est utilisé si les valeurs (>15) suivent une distribution gaussienne ; sinon, le test non-paramétrique de Mann-Whitney est réalisé. Pour comparer plus de deux groupes, le test non-paramétrique d'analyse de la variance Kruskal-Wallis avec le test de comparaison multiple de Dunn est employé. Pour les corrélations, le test de Spearman est réalisé. Une variation est considérée comme significative lorsque la p-value des tests statistiques est inférieure ou égale à une valeur seuil P. Le degré de significativité est représenté par un nombre d'étoiles : *P < 0.05, **P < 0.01, ***P<0.001.

RESULTATS

I - Sélection d'une signature en microARNs associée avec le RVG après l'IDM.

I.1 - Analyse des 13 microARNs identifiées dans le réseau d'interactions microARNs-protéines cibles construit à partir des données protéomiques issues des VG des rats post-IDM

Le réseau d'interactions microARNs-protéines cibles construit à partir des données protéomiques issues des VG des rats post-IDM et des interactions microARNs-protéines cibles prédites par *Ingenuity Pathway Analysis* (Qiagen) a permis d'identifier 13 microARNs susceptibles de réguler 8 des 45 protéines modulées par le RVG après l'IDM (Dubois-Deruy *et al.*, 2017). Les 13 microARNs identifiés par ce réseau ont été analysés *in silico* pour leur association avec l'IC dans la littérature, et *in vivo* pour leur expression dans le VG et le plasma de rats post-IDM ainsi que dans le plasma des patients post-IDM de l'étude REVE-2 afin de sélectionner les microARNs les plus associés avec le RVG après l'IDM (Figure 24).

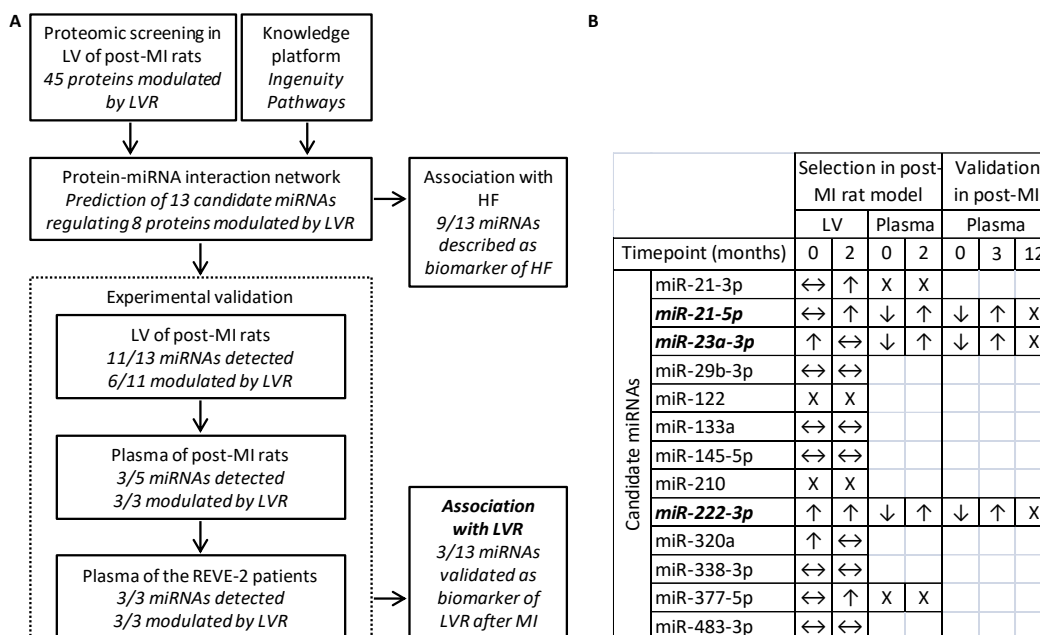


Figure 24: Identification et sélection des miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p pour leur association *in vivo* avec le remodelage ventriculaire gauche (RVG) après l'infarctus du myocarde (IDM) (Charrier *et al.* 2019). (A) Processus de sélection par (B) validation expérimentale des 13 microARNs identifiés à partir du réseau d'interactions microARNs-protéines cibles construit à partir des données protéomiques issues des VG des rats post-IDM et des interactions microARNs-protéines cibles prédites par *Ingenuity Pathway Analysis* (Qiagen). La quantification des microARNs candidats après l'IDM dans le VG et le plasma des rats à 7 jours (temps 0) et 2 mois (temps 2), et dans le plasma des patients de l'étude REVE- 2 à l'inclusion (temps 0), 3 mois (temps 3) et un an (temps 12) a été publiée (Dubois-Deruy *et al.*, 2017). ↑ et ↓ indiquent respectivement une augmentation et une diminution significative (P<0,05) entre les animaux post-IDM et contrôles, ou les patients avec et sans RVG. ↔ indique une absence de modulation. X indique une absence de détection. Les microARNs sélectionnés pour leur association avec le RVG après l'IDM sont indiqués en gras italique. LVR (*left ventricular remodeling*); MI (*myocardial infarction*); HF (*heart failure*).

RESULTATS

Neuf des 13 microARNs prédits par IPA sont décrits comme étant associés à 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), ce qui suggère que les 13 microARNs sont impliqués dans les mécanismes physiopathologiques de l'IC.

Pour valider expérimentalement l'association des 13 microARNs prédits par IPA avec le RVG post-IDM, les 13 microARNs ont été quantifiés dans le VG à 7 jours et 2 mois après l'IDM. Sept microARNs n'ont pas été détectés (miR-122 et miR-210) ou ne sont pas modulés dans les VG des rats post-IDM comparés aux contrôles (miR-29b-3p, miR-133a, miR-145-5p, miR-338-3p et miR-483-3p), ce qui suggère que ces 7 microARNs ne sont pas associés au RVG après l'IDM. Six microARNs ont été validés comme étant surexprimés dans les VG des rats 7 jours après l'IDM comparés aux contrôles (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), ce qui suggère que ces 6 microARNs sont impliqués dans le RVG après l'IDM. Ces 6 microARNs ont ensuite été quantifiés dans le plasma des mêmes animaux. Trois des 6 microARNs sélectionnés ne sont pas détectés (miR-21-3p et miR-377-5p) ou ont une efficacité d'amplification par qPCR non-quantitative (miR-320a) dans le plasma des rats et ont été exclus des analyses ultérieures. Trois autres microARNs sont diminués 7 jours après l'IDM et augmentés 2 mois après l'IDM dans le plasma des rats post-IDM comparés aux témoins: les miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p. Dans le plasma des patients post-IDM de l'étude REVE-2, ces 3 microARNs (miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p) ont un profil d'expression similaire à celui détecté chez les rats 7 jours et 2 mois après l'IDM: ils sont significativement diminués à l'inclusion et augmentés à 3 mois après l'IDM chez les patients hommes présentant un RVG comparés aux patients sans RVG, mais pas chez les femmes, ce qui valide leur rôle potentiel de biomarqueurs du RVG après IDM chez le rat mâle et chez le patient homme (Dubois-Deruy *et al.*, 2017).

1.2 - Analyse des 24 microARNs identifiés dans le réseau REVE-2.

Le réseau REVE-2 construit à partir des données multi-omiques issues des échantillons de plasma des patients post-IDM de l'étude REVE-2 a permis d'identifier 24 microARNs susceptibles d'être impliqués dans le RVG après l'IDM (Pinet *et al.*, 2017). Les 24 microARNs identifiés dans le réseau REVE-2 ont été analysés *in silico* pour leur association avec l'IC dans la littérature, leur activité dans le réseau REVE-2 aux temps associés au RVG (1 mois, 3 mois et 1 an après l'IDM) et leur importance dans le réseau REVE-2 par rapport à leur centralité d'intermédiarité (**Figure 25**).

RESULTATS

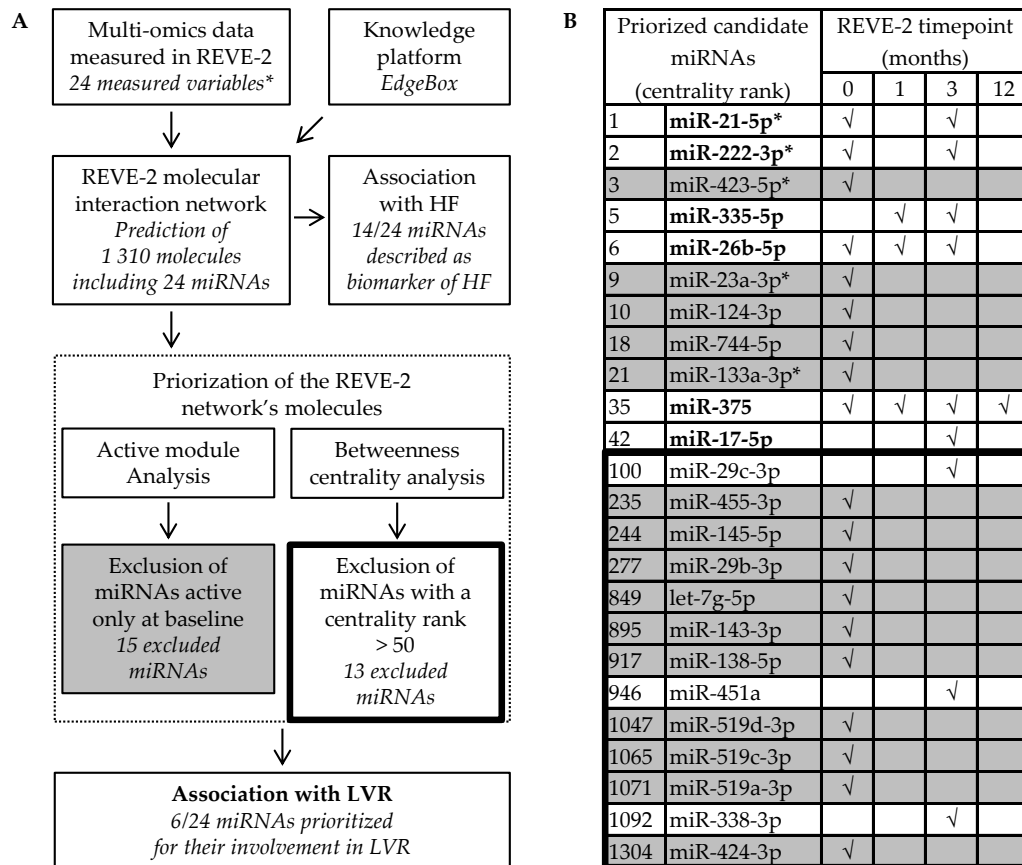


Figure 25: Identification et sélection *in silico* des miR-21-5p, miR-222-3p, miR-335-5p, miR-26b-5p, miR-375 et miR-17-5p pour leur association avec le remodelage ventriculaire gauche (RVG) après l'infarctus du myocarde (IDM). (A) Processus de sélection par (B) priorisation *in silico* des 24 microARNs du réseau REVE-2. √ indique que le microARN est actif au temps post-IDM 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. LVR (*left ventricular remodeling*); HF (*heart failure*).

Quatorze des 24 microARNs du réseau REVE-2 sont 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), ce qui suggère que les 24 microARNs peuvent être impliqués dans les mécanismes physiopathologiques de l'IC.

Les microARNs ont été sélectionnés *in silico* selon 2 critères: (i) 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; (ii) 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

RESULTATS

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). La sélection des miR-21-5p et miR-222-3p à la fois à partir du réseau protéines-microARNs de rat post-IDM (**Résultat I.1**) et du réseau REVE-2 montre que ces 2 microARNs semblent être important dans le RVG.

I.3 - Fonction des cibles des miR-21-5p, miR-222-3p, miR-335-5p, miR-26b- 5p, miR-23a-3p, miR-375 et miR-17-5p

Les fonctions *Gene Ontology* des cibles expérimentalement validées disponibles dans la base de données *miRecords* en 2019 des miR-21-5p, miR-222-3p, miR-335-5p, miR-26b- 5p, miR-23a-3p, miR-375 et miR-17-5p sont présentées dans la **Figure 26**.

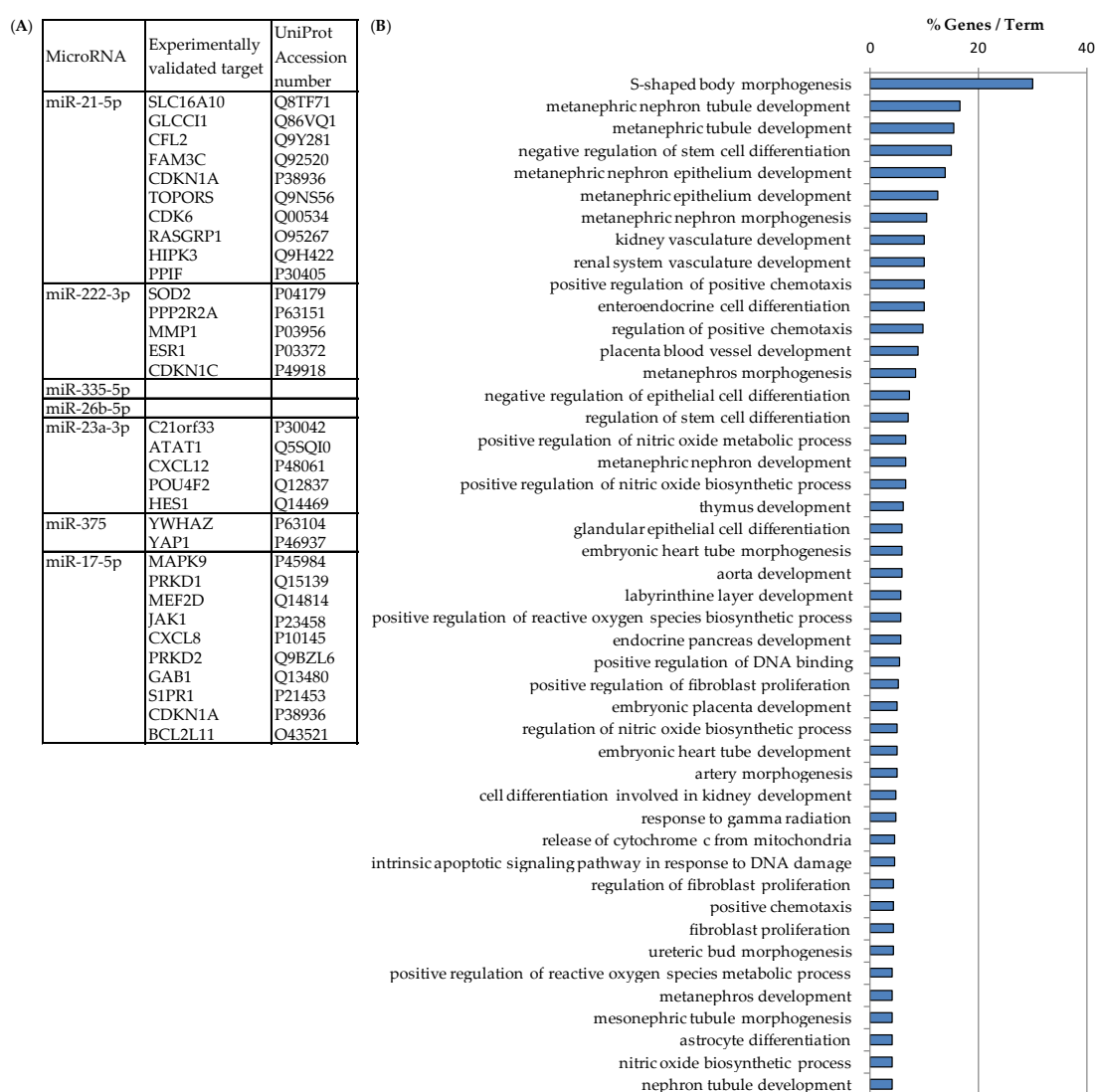


Figure 26: Les cibles des miR-21-5p, miR-222-3p, miR-335-5p, miR-26b- 5p, miR-23a-3p, miR-375 et miR-17-5p sont associées à des mécanismes du RVG après l'IDM. (A) Les cibles des microARNs ont été prédites par la base de données *miRecords*. Aucune cible n'a été décrite pour les miR-335-5p et miR-26b-5p. (B) Les processus biologiques des cibles des microARNs ont été prédits grâce aux applications *ClueGo* et *CluePedia* de *Cytoscape* ($P < 0.05$).

RESULTATS

Les miR-21-5p, miR-222-3p, miR-23a-3p, miR-375 et miR-17-5p ont 31 cibles expérimentalement validées disponibles dans la base de données *miRecords* et les miR-335-5p et miR-26b-5p n'en ont aucune. Les fonctions *Gene Ontology* les plus représentées de ces 31 protéines cibles sont impliquées dans des mécanismes associés au RVG, comme la prolifération des fibroblastes, la régulation du métabolisme des ROS, les voies de signalisation intrinsèques de l'apoptose et le développement embryonnaire du cœur. Ces résultats suggèrent que les 5 microARNs participent à la régulation des mécanismes associés au RVG post-IDM.

II - Implication de la fibrose cardiaque et de l'hypertrophie cardiomyocytaire dans la régulation de la signature en microARNs associée avec le RVG après l'IDM.

II.1 - Association de la signature en microARNs associée avec le RVG après l'IDM avec la fibrose

Puisque les miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p ont été validés pour être associés avec le RVG post-IDM précoce (après 7 jours) et tardif (après 2 mois) dans le VG des rats mâles (Dubois-Deruy *et al.*, 2017), la même approche a été utilisée pour les 4 nouveaux microARNs sélectionnés à partir du réseau REVE-2 (miR-17-5p, miR-26b-5p, miR-335-5p et miR-375-3p). Ils ont été quantifiés dans le VG des rats mâles 7 jours et 2 mois après l'IDM (**Figure 27**).

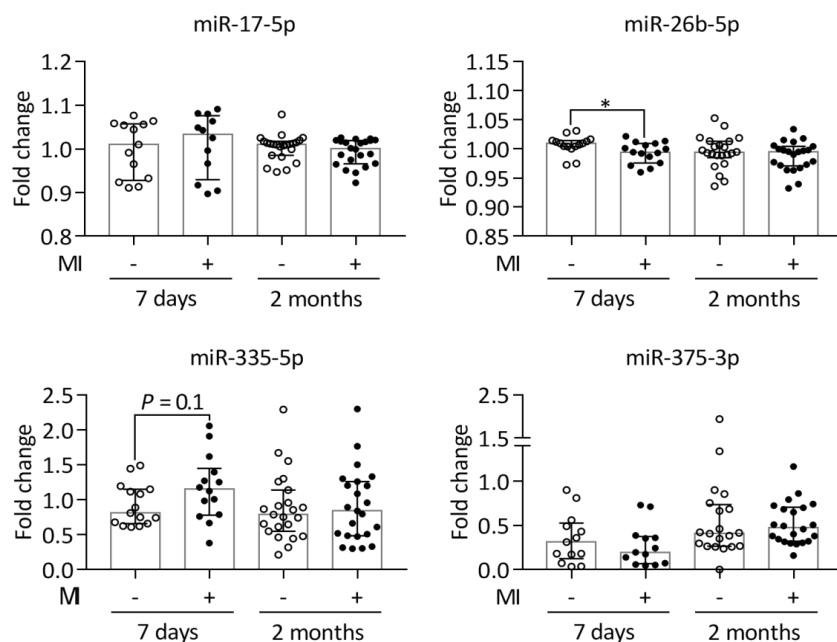


Figure 27: Expression des miR-17-5p, miR-26b-5p, miR-335-5p et miR-375-3p dans le ventricule gauche de rats mâles 7 jours et 2 mois après un infarctus du myocarde (MI) induit par ligature de l'artère coronaire gauche (+, ronds noirs) ou après une opération contrôlée (-, cercles). L'expression des microARNs, quantifiés par RT-qPCR, est normalisée sur l'expression du miR-423-3p dans les VG de rats 7 jours (n = 7) et 2 mois (n = 25) après l'IDM. Les groupes de données sont présentés en médiane ± Interquartiles et sont comparés par le test de Mann-Whitney: * $P < 0.05$.

Dans les VG des rats mâles après l'IDM comparés aux VG des rats mâles contrôles, le miR-26b-5p est diminué ($\times 0.99$, $P = 0.04$) 7 jours après l'IDM; une faible tendance à l'augmentation du miR-

RESULTATS

335-5p ($x1.39$, $P = 0.1$) est détectée 7 jours après l'IDM et les miR-17-5p et miR-375-3p ne sont pas modulés. L'activité du miR-26-5p suggérée dans le réseau REVE-2 au temps précoce (inclusion) et plus tardif (1 et 3 mois) après l'IDM a été confirmée en termes de différence d'expression au temps précoce (7 jours) après l'IDM chez le rat. Le miR-26b-5p semble donc impliqué dans la régulation des mécanismes précoces associés au RVG après l'IDM. Au final, 4 des 7 microARNs sélectionnés pour leur association avec le RVG après l'IDM sont significativement modulés dans le VG des rats après l'IDM: les miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-222-3p et miR-26b-5p, mais le mécanisme cellulaire à l'origine de leur modulation reste inconnu.

Les rats post-IDM par ligature de l'artère coronaire gauche développent une fibrose endomyocardique caractérisée par une accumulation excessive de matrice extracellulaire qui participe à la rigidification du myocarde (Mulder *et al.*, 1997; Stefanon *et al.*, 2013). L'activation de la fibrose cardiaque en réponse aux contraintes mécaniques et chimiques après l'IDM est déclenchée au niveau transcriptionnel (ARNs messagers) puis traductionnel (protéines) par l'augmentation de l'expression des gènes pro-fibrotiques comme CTGF, α -SMA et proCol1. L'augmentation de CTGF favorise l'activation pro-fibrotique des CFs en stimulant leur prolifération (Alfaro *et al.*, 2013; Dorn *et al.*, 2018). L'augmentation de l' α -SMA favorise le remodelage du cytosquelette des CFs caractéristique des myofibroblastique et réduit leur prolifération (Shinde *et al.*, 2017). L'augmentation de proCol1 témoigne de la différenciation en myofibroblastes et de la production accrue de Col1, le composant principal de la matrice fibreuse (Humeres & Frangogiannis, 2019).

Afin de déterminer l'implication de la fibrose cardiaque dans la modulation de la signature en microARNs associée avec le RVG, les ARNs messagers de CTGF, de l' α -SMA et de proCol1 ont été quantifiés dans la zone non-infarctée du VG des rats mâles après un IDM (**Figure 28**).

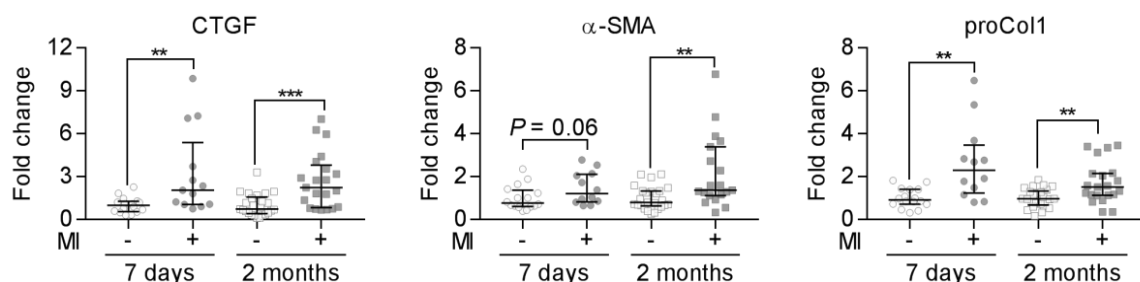


Figure 28: Expression de 3 gènes de la fibrose cardiaque dans les ventricules gauches (VG) de rats après un infarctus du myocarde (+, en gris) ou une opération contrôlée (-, en blanc). Les ARNs messagers de CTGF (connective tissue growth factor), de l'actine α du muscle lisse (α -SMA) et de procollagène de type I (proCol1) ont été quantifiés dans les VG de rats 7 jours ($n = 7$) et 2 mois ($n = 25$) après l'IDM par RT-qPCR et exprimés en fold change par rapport aux rats contrôles après normalisation avec HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase). Les groupes de données sont présentés en médiane \pm Interquartiles et sont comparés par le test de Mann-Whitney: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

RESULTATS

Dans la zone non-infarctée du VG des rats mâles après l'IDM comparés aux contrôles, les ARNs messagers de CTGF, α -SMA et proCol1 sont augmentés 7 jours ($\times 3.2$, $P < 0.005$; $\times 1.5$, $P = 0.06$; $\times 2.6$, $P < 0.005$; respectivement) et 2 mois ($\times 2.7$, $P < 0.001$; $\times 2.1$, $P = 0.005$; $\times 1.7$, $P = 0.005$) après l'IDM, ce qui confirme que la fibrose cardiaque y est activée au niveau transcriptionnel. Dans la zone non-infarctée du VG des rats mâles après l'IDM, l'activation de la fibrose cardiaque pourrait participer à la modulation de la signature en microARNs associée avec le RVG après l'IDM.

II.2 - Caractérisation phénotypique des fibroblastes cardiaques (CFs) mis en culture et analyse de l'expression de la signature en microARNs.

Pour vérifier si l'activation transcriptionnelle et/ou traductionnelle de la fibrose cardiaque dans les CFs participe à la modulation de la signature en microARNs associée au RVG après l'IDM, le phénotype des CFs de rats néonataux mis en culture a été caractérisé (**Figure 29**).

Les CFs T0 sont en suspension tandis que les CFs P0, P0# et P1 sont adhérents au support plastique (**Figure 29A**). Parmi les CFs adhérents, les CFs P0# sont confluents à 40% tandis que les CFs P0 et P1 sont confluents à 80% (**Figure 29A**). Dans ces conditions, les CFs ont des interactions mécaniques différentes avec leur environnement qui pourraient affecter leur phénotype.

Les ARNs de CTGF, α -SMA et proCol1 sont augmentés à P0 et P1 comparés à T0 (**Figure 29B**), suggérant que la fibrose cardiaque est activée au niveau transcriptionnel par les contraintes mécaniques de la mise en culture. La détection de quantité protéique moins élevée de α -SMA et de Col1 dans les CFs en à T0 comparée à P0 et P1 (**Figure 29C**) suggèrent que la fibrose cardiaque est aussi activée au niveau traductionnel par la mise en culture.

La détection des protéines myocytaires SMM et desmine dans les CFs T0 (**Figure 29C**) indique que l'isolement des CFs ne permet pas d'éliminer efficacement tous les CMs par le gradient de Percoll mais leur diminution dans les CFs P0 et P1 comparés aux CFs T0 montre que les proportions de CMs deviennent négligeables dans les CFs P0 et P1 comparés aux CFs T0. De manière intéressante, l'activation progressive des CFs en myofibroblastes et la diminution graduelle du nombre de CMs suggérés par la caractérisation des CFs *in vitro* se rapprochent des événements cellulaires détectés dans le myocarde après l'IDM.

RESULTATS

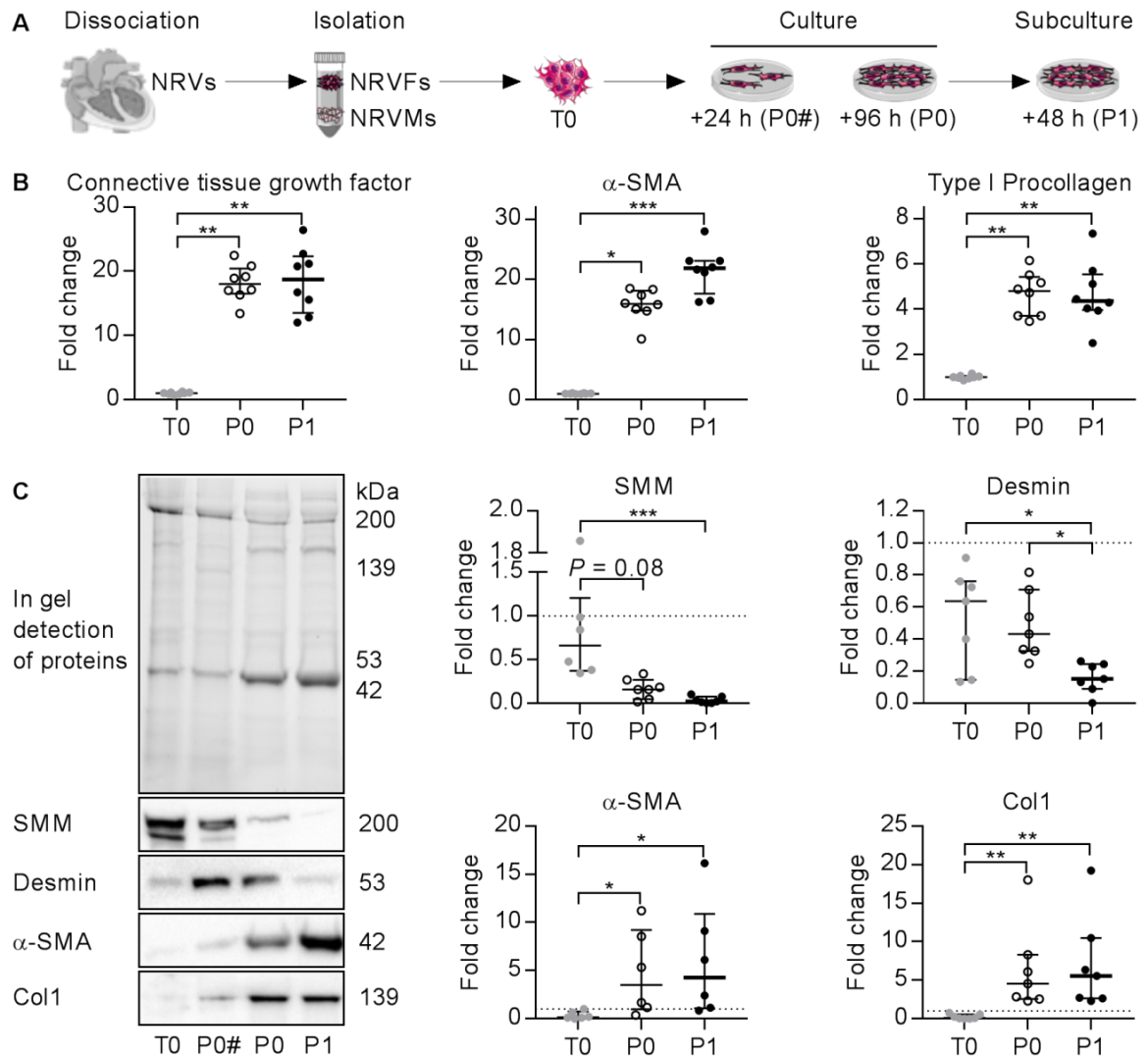


Figure 29: Les fibroblastes cardiaques de rats néonataux (NRVFs) perdent graduellement leur contamination myocytaire (NRVMs) et acquièrent progressivement un phénotype de myofibroblastes cardiaques *in vitro*. (A) Processus d'isolement et de culture des NRVFs (en rouge) après l'isolement (T0), après 24 h (P0#) et 96 h (P0) de culture, à 40% et 80% de confluence respectivement, et après 48 h de sous-culture (P1) à 80% de confluence. (B) Les ARN messagers de CTGF (*connective tissue growth factor*), de l'actine α du muscle lisse (α -SMA) et du procollagène de type I (proCol1) ont été quantifiés dans les CFs T0 (en gris), P0 (en blanc) et P1 (en noir) par RT-qPCR et exprimés en *fold change* par rapport à T0 après normalisation avec HPRT (hypoxanthine phospho-ribosyltransférase). Les ARNs messagers n'ont pas été quantifiés à P0# car HPRT y est augmentée. (C) Détections représentatives des protéines à la fois insolubles dans le RIPA et solubles dans l'urée dans le gel par la technologie *stain free* et de la SMM (*slow muscle myosin*), la desmine, l' α -SMA et du collagène de type I (Col1) par *western blot*. Les poids moléculaires sont indiqués en kiloDalton (kDa). Les protéines détectées ont été quantifiées par densitométrie et exprimées en *fold change* par rapport à P0# (ligne pointillée) après normalisation avec les protéines détectées par la technologie *stain free*. Les groupes de données (n = 5-8) sont présentés en médiane \pm Interquartiles et sont comparés par le test de Kruskal-Wallis avec la comparaison multiple de Dunn: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.05$.

RESULTATS

Afin de vérifier si la signature en microARNs associée au RVG après l'IDM est modulée par l'activation transcriptionnelle et traductionnelle de la fibrose cardiaque et/ou par la diminution du nombre de CMs *in vitro*, leur expression a été quantifiée dans les CFs de rats néonataux aux temps T0, P0 et P1 (**Figure 30**).

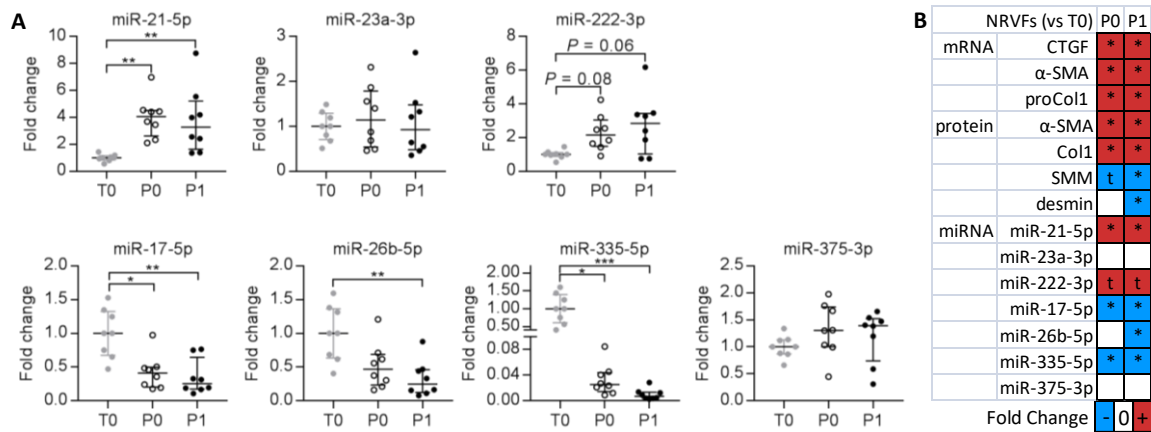


Figure 30: Expression des 7 microARNs associés au RVG après l'IDM dans les fibroblastes cardiaques (CFs) de rats néonataux *in vitro*. (A) Les 7 microARNs ont été quantifiés dans les CFs après l'isolement (T0, en gris), après 96 h (P0, en blanc) de culture et après 48 h de sous-culture (P1, en noir) par RT-qPCR et exprimés en *fold change* par rapport à T0 après normalisation avec HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase). Les groupes de données (n = 8) sont présentés en médiane ± Interquartiles et sont comparés par le test de Kruskal-Wallis avec la comparaison multiple de Dunn: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.05$. (B) Tableau récapitulatif des augmentations (rouge) et diminutions (bleu) significatives (*) et tendanciennes (t, $P \leq 0.08$) d'expression des ARNs messagers (CTGF, *connective tissue growth factor*; actine α du muscle lisse, α -SMA; et du procollagène de type I, proCol1) et des protéines (forme phosphorylée de la protéine Akt sur la sérine 473, P-Akt; α -SMA et de Col) impliquées dans la fibrose cardiaque et d'expression des 7 microARNs dans les CFs P0 versus les CFs T0 et les CFs P1 versus les CFs T0.

Dans les CFs de rats néonataux, les miR-21-5p et miR-222-3p sont augmentés à P0 et P1 comparés à T0; les miR-17-5p, miR-26b-5p et miR-335-5p sont diminués à P0 et P1 comparés à T0; les miR-23a-3p et miR-375-3p ne sont pas modulés entre T0, P0 et P1 (**Figure 30A**), ce qui suggère que 5 des 7 microARNs analysés sont sensibles à l'activation de la fibrose cardiaque dans les CFs (**Figure 30B**) et/ou à la diminution du nombre de CMs.

Pour identifier les voies de signalisation pouvant être ciblées par les 5 microARNs modulés dans les CFs *in vitro*, les voies de la base de données KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) significativement enrichies ($P < 0.05$) en gènes cibles des 5 microARNs expérimentalement validés disponibles dans la base de données TarBase ont été analysées *in silico* (**Figure 31**).

RESULTATS

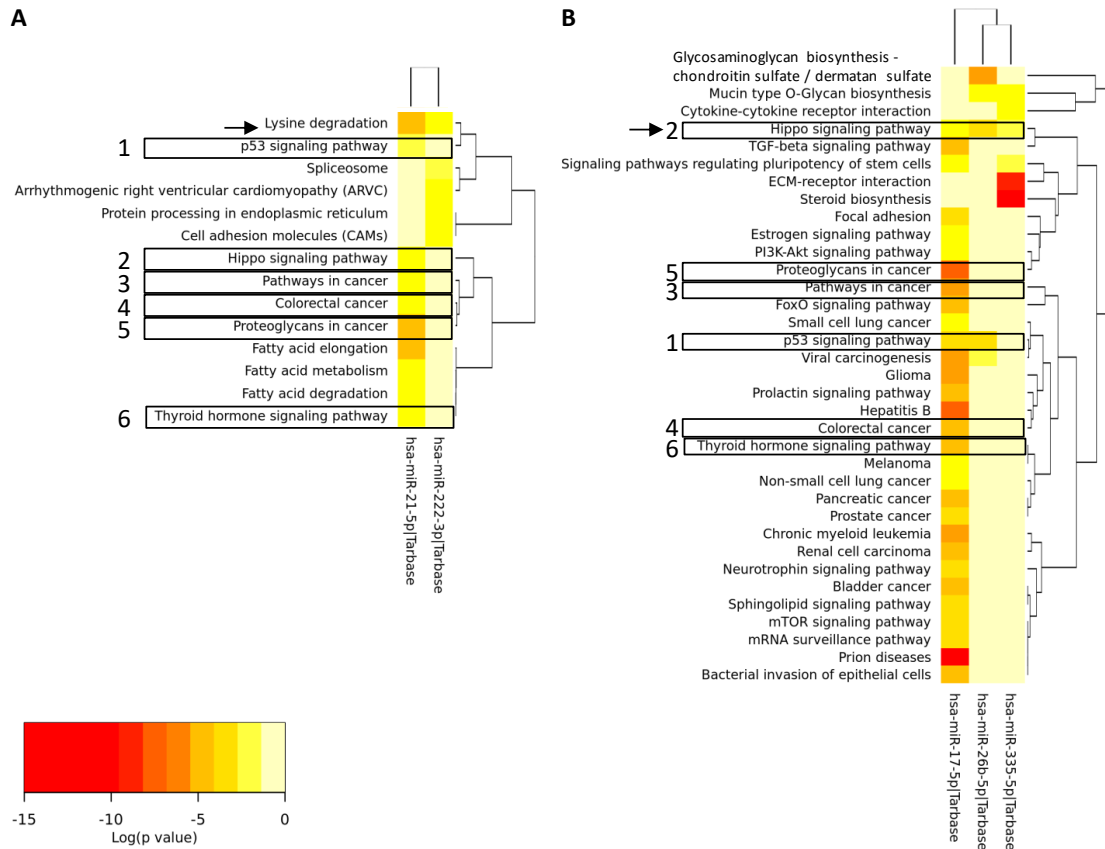


Figure 31: Analyse de l'enrichissement des voies KEGG parmi les gènes cibles (A) miR-21-5p et miR-222-3p et (B) des miR-17-5p, miR-26b-5p et miR-335-5p. Les cibles des microARNs expérimentalement validées disponibles dans la base de données TarBase v7.0 ont été analysées par DIANA-miRPath v3.0 en recherchant les voies KEGG significativement ($P < 0.05$) ciblées par au moins un microARN ("*pathway union*") avec le mode "*false discovery rate correction*" et "*conservative statistics*". Les voies KEGG de couleur rouge sont plus significativement enrichies que les valeurs orange et jaunes. Les dendrogrammes horizontaux et verticaux indiquent la proximité des cibles entre les microARNs et entre les voies KEEG respectivement. Les 6 voies KEGGs communes aux 2 analyses sont encadrées. Les voies significativement ciblées ($P < 0.05$) par tous les microARNs d'une analyse ("*pathways intersection*") sont indiquées par une flèche.

Les miR-21-5p et miR-222-3p ciblent 14 voies KEGG dont une voie KEGG commune: la voie de dégradation des lysines ("*lysine degradation*") (**Figure 31A**). Après l'IDM, l'expression de la lysine oxydase (LOX) augmente dans la zone adjacente à la zone infarctée (Nagaraju *et al.*, 2017), ce qui favorise l'oxydation des résidus lysine des fibres de collagène. Les fibres de collagènes oxydées s'entremêlent, ce qui consolide la cicatrice, et deviennent plus résistantes à la dégradation protéolytique (Rodríguez *et al.*, 2019). L'augmentation des miR-21-5p et miR-222-3p dans les CFs activés et dans la zone non-infarctée du VG des rats post-IDM suggère leur implication dans la régulation du remodelage de la matrice extracellulaire lors de la fibrose cardiaque. La voie KEGG associée aux molécules d'adhésion ("*cell adhesion molecules*"), ciblée par le miR-222-3p, pourrait entraîner une perte d'adhésion, ce qui favoriserait l'activation mécanique de la fibrose cardiaque (Saucerman *et al.*, 2018).

RESULTATS

Les miR-17-5p, miR-26b-5p et miR-335-5p ciblent 35 voies KEGG, dont une voie KEGG commune: la voie de signalisation HIPPO ("*HIPPO signaling pathways*") (**Figure 31B**). L'activation de la voie HIPPO serait responsable du maintien des fibroblastes cardiaques à l'état quiescent et son inactivation en cas de stress favorise leur différenciation en myofibroblastes cardiaques (Xiao *et al.*, 2018). La diminution des miR-17-5p, miR-26b-5p et miR-335-5p dans les CFs activés et dans la zone non-infarctée du VG des rats post-IDM pour le miR-26b-5p pourrait favoriser l'inhibition de la voie HIPPO et lever l'inactivation de fibrose cardiaque dans les CFs. Parmi les autres voies KEGG mises en évidence, la voie KEGG associée aux adhésions focales ("*focal adhesion*") ciblée par le miR-17-5p et celle associée aux interactions récepteur-matrice extracellulaire ("*ECM-receptor interaction*") ciblée par le miR-335-5p, sont également connues pour leur implication dans l'activation mécanique de la fibrose cardiaque (Saucerman *et al.*, 2018). De manière intéressante, la voie HIPPO est également ciblée par le miR-21-5p (**Figure 31A**), ce qui témoigne de son importance dans l'activation de la fibrose cardiaque dans les CFs *in vitro*.

Ces résultats suggèrent que les voies KEGG identifiées comme la voie de dégradation des lysines ciblée par les miR-21-5p et miR-222-3p et la voie HIPPO ciblée par les 5 microARNs pourraient être importantes dans l'activation de la fibrose cardiaque dans les CFs *in vitro*.

II.3 - Caractérisation phénotypique des fibroblastes cardiaques (CFs) stimulés à l'isoprénaline (ISO) et à l'angiotensine II (ANGII) et analyse de l'expression de la signature en microARNs

Après l'IDM, l'activation des systèmes béta-adrénergique et rénine-angiotensine-aldostérone, dont les agonistes respectifs comprennent l'isoprénaline (ISO) et l'angiotensine II (ANGII), participe à l'augmentation de la fibrose cardiaque. Afin de vérifier l'implication de ces systèmes dans la modulation des 5 microARNs modulés dans les CFs *in vitro*, les CFs P1 myofibroblastiques de rats néonataux, ayant une contamination négligeable en CMs comparée aux CFs T0 et P0, ont été stimulés soit à l'ISO et soit à l'ANGII et leur phénotype myofibroblastique a été caractérisé.

Puisque l'activation des CFs peut impliquer une modulation de leur adhésion/prolifération, les CFs P1 ont d'abord été suivis en temps réel par impédancemétrie afin d'optimiser les densités cellulaires d'ensemencement nécessaires à leur prolifération après 48 h et la période de privation en sérum nécessaire à leur survie (**Figure 32**).

RESULTATS

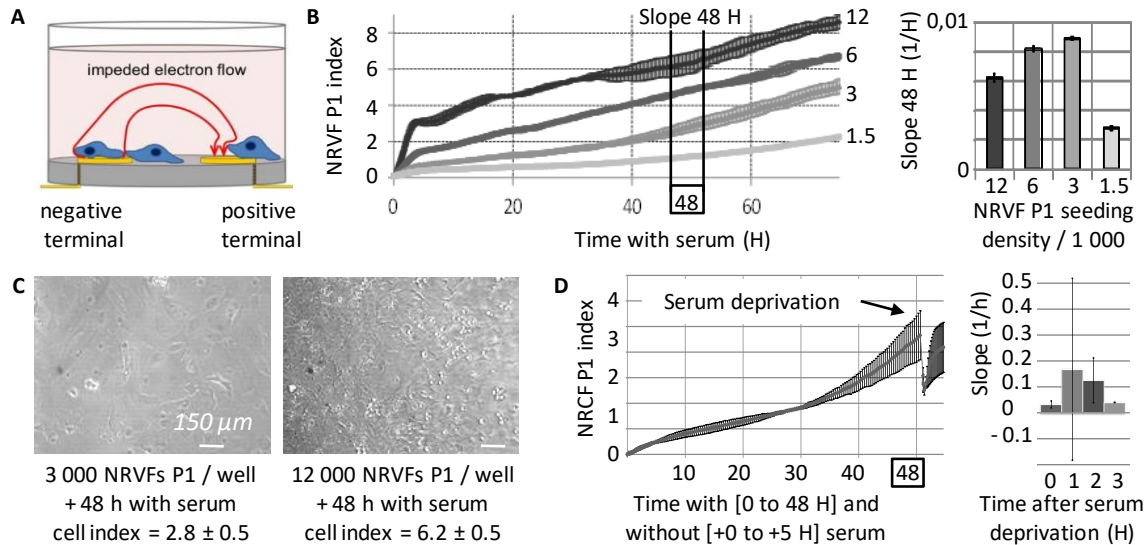


Figure 32: Identification des conditions optimales de sous-culture (P1) des fibroblastes ventriculaires de rats néonataux (NRVFs). (A) Principe et (B) analyse du suivi en temps réel pendant 70 h de NRVFs P1 ensemencés avec 4 densités cellulaires au temps de culture 0 h et estimation de leur vitesse proliférative après 48 h par mesure de la pente. (C) Observation des NRVFs P1 ensemencés à 3 000 et 12 000 cellules / puits respectivement après 48 h de culture. (D) Analyse du suivi en temps réel pendant 60 h de NRVFs P1 ensemencés avec 3 000 NRVFs / puits en présence de sérum pendant 48 h puis sans sérum. Leur vitesse proliférative a été estimée après 0 h, 1 h, 2 h et 3 h de privation en sérum par mesure de la pente de l'indice cellulaire. Les groupes de données (n = 2) sont présentés en moyenne \pm SD.

L'impédancemétrie des CFs P1 ensemencés dans des puits recouverts d'électrodes permet de suivre en temps réel leur adhésion/prolifération (Figure 32A). L'analyse du suivi en temps réel de l'adhésion/prolifération des CFs P1 montre que l'indice cellulaire augmente avec la densité d'ensemencement, ce qui témoigne que cet indice reflète aussi la quantité de CFs (Figure 32B). L'indice cellulaire augmente pendant les 70 h de l'expérience avec une augmentation plus rapide dans les 3 h suivant l'ensemencement (Figure 32B) ce qui témoigne que cet indice reflète l'adhésion puis la prolifération des CFs P1. A 48 h de culture, la vitesse proliférative des CFs P1 semble maximale (0,09 indice cellulaire par h) pour une densité d'ensemencement supérieure à 3000 CFs P1/puits (Figure 32B). La visualisation des CFs P1 après 48 h de culture montre qu'avec une densité cellulaire d'ensemencement de 12 000 cellules / puits, une partie des cellules flotte (Figure 32C), ce qui suggère une viabilité cellulaire plus faible qu'avec une densité cellulaire d'ensemencement de 3 000 cellules / puits, qui sera donc utilisée par la suite pour déterminer la période de privation en sérum. Après 48 h de culture en présence de sérum, une chute brutale de l'indice cellulaire est observée après la privation en sérum (Figure 32D), ce qui montre que la privation en sérum provoque une diminution de l'adhésion/prolifération des CFs P1 à leur support probablement liée à une rétraction mécanique des cellules après le stress. L'évolution de l'indice cellulaire (pente) des CFs P1 privés en sérum se stabilise après 3 h (Figure 32D), ce qui

RESULTATS

suggère que cette période de privation en sérum suffit à uniformiser l'adhésion/prolifération des CFs P1 sans provoquer de mortalité cellulaire.

Les conditions de culture optimisées précédemment pour maximiser la prolifération et la survie des CFs P1 *in vitro* ont été utilisées pour étudier l'effet de la stimulation à l'ISO, en utilisant une dose pro-fibrotique de 10 μ M (Sun *et al.*, 2015). L'impédancemétrie des CFs P1 avant et après le traitement à l'ISO a été suivie en temps réel pour identifier les temps de traitement nécessaires pour induire une différence de prolifération/adhésion des CFs caractéristique d'une activation de la fibrose cardiaque (**Figure 33**).

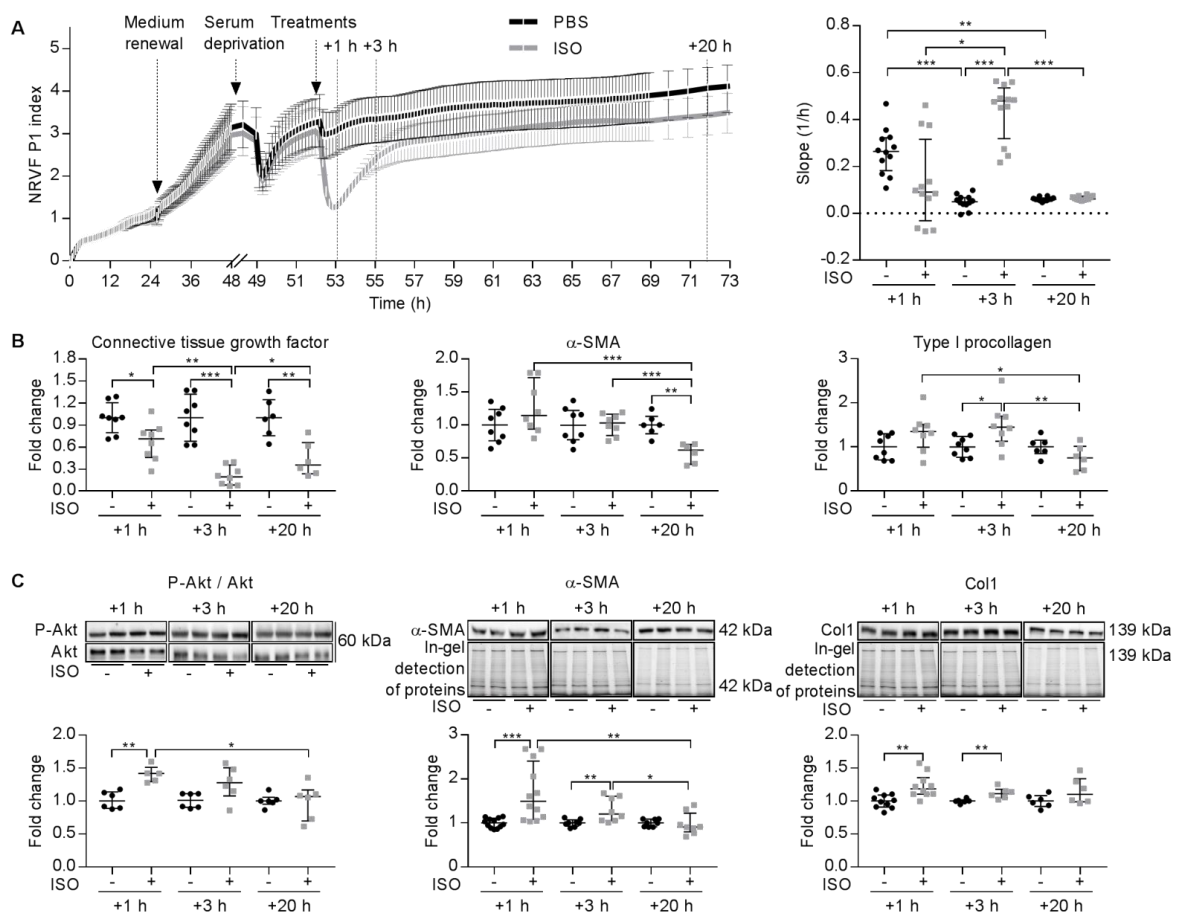


Figure 33: Identification d'une fenêtre d'activation différentielle de la fibrose entre les fibroblastes ventriculaires de rats néonataux (NRVFs) sous-cultivés (P1) stimulés par l'isoprénaline à 10 μ M (ISO, en gris) et non-stimulés (PBS, en noir). (A) Suivi en temps réel de la prolifération/adhésion des NRVFs P1 (n = 12). Les temps de changement de milieu, de privation en sérum et de traitements, 24 h, 48 h, 52 h après l'ensemencement respectivement, ainsi que les différents temps de traitement sélectionnés (+1 h, +3 h et +20 h) sont indiqués sur le graphique de gauche. Les coefficients de pente des courbes aux temps de traitements sélectionnés sont indiqués sur le graphique de droite. Les pentes d'indice cellulaire sont comparées par le test de Kruskal-Wallis avec la comparaison multiple de Dunn: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.05$. (B) Les ARN messagers (n = 6-8) de CTGF (*connective tissue growth factor*), de l'actine α du muscle lisse (α -SMA) et du procollagène de type I ont été quantifiés par RT-qPCR et exprimés en *fold change* par rapport à la moyenne des CFs P1 contrôles (PBS) de chaque temps après normalisation avec HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransférase). (C) Détections représentatives des protéines

RESULTATS

solubles dans le RIPA dans le gel par la technologie *stain free* et de *western blots*. L'expression de la forme phosphorylée de la protéine Akt sur la sérine 473 (P-Akt) est normalisée sur l'expression de Akt (n = 6), et les expressions protéiques de l' α -SMA et du collagène de type I (Col1) (n = 8-12) sont normalisées sur les protéines détectées par la technologie *stain free*. Les protéines sont exprimées en *fold change* par rapport à la moyenne des CFs P1 contrôles (PBS) de chaque temps. Les expressions des ARNs messagers et des protéines ont été comparées par le test de Mann-Whitney: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.05$. Les groupes de données sont présentés en médiane \pm Interquartiles.

L'analyse du suivi en temps réel de l'adhésion/prolifération des CFs P1 montre que les CFs P1 cultivés en présence de sérum pendant 48 h et sans sérum pendant 3 h suivent une évolution identique avant les traitements (**Figure 33A**). Après le traitement, l'adhésion/prolifération des CFs P1 traités à l'ISO est régulée négativement pendant 5 h par rapport aux CFs P1 contrôles (**Figure 33A**); 1 h après les traitements, les indices des CFs P1 traités à l'ISO ont des valeurs plus faibles et des pentes similaires aux indices des CFs P1 contrôles (**Figure 33A**), suggérant que l'adhésion/prolifération des CFs P1 est diminuée à son maximum 1 h après le traitement à l'ISO; 3 h après les traitements, les indices des CFs P1 traités à l'ISO ont des pentes significativement plus élevées que les indices des CFs P1 contrôles (**Figure 33A**), suggérant que l'adhésion/prolifération des CFs P1 est augmentée 3 h après le traitement à l'ISO; 20 h après, les indices des CFs P1 traités à l'ISO et des CFs P1 contrôles ont des valeurs et des pentes à nouveau similaires (**Figure 33A**), suggérant que l'ISO ne module plus l'adhésion/prolifération des CFs P1. Ces résultats suggèrent que la stimulation du système bêta-adrénergique des CFs P1 avec l'ISO provoque des modulations transitoires de leur phénotype morphologique entre 0 h et 5 h de traitement; ces modulations semblent maximales après 1 h en terme d'indice cellulaire et après 3 h en terme de pente; après 20 h aucune modulation de l'adhésion/prolifération des CFs P1 n'est détectée (**Figure 33A**). Comparés aux données disponibles dans la littérature, les temps de traitements de l'ISO mis en évidence par l'analyse du suivi en temps réel des CFs P1 semblent insuffisamment longs pour entraîner des différences de production de nouvelles protéines mais pourraient être suffisants pour induire des modifications post-traductionnelles impliquées dans l'activation de la fibrose cardiaque, comme la phosphorylation de la protéine Akt sur sa sérine 473 (P-Akt) (Zhang et al., 2017).

Pour valider la modulation du phénotype des CFs P1 entre 1 h, 3 h et 20 h après le traitement à l'ISO, les CFs P1 ont été caractérisés au niveau transcriptionnel (CTGF, α -SMA et proCol1) et traductionnel (P-Akt, α -SMA et Col1)(**Figure 33B et 33C**). Au niveau transcriptionnel, les CFs P1 traités à l'ISO pendant 1 h, 3 h et 20 h expriment moins CTGF que les CFs P1 contrôles et cette diminution est maximale après 3h de traitement à l'ISO (**Figure 33B**); les CFs P1 traités à l'ISO pendant 20 h expriment moins α -SMA que les CFs P1 contrôles et que les CFs P1 traités à l'ISO

RESULTATS

pendant 1 h et 3 h (**Figure 33B**); les CFs P1 traités à l'ISO pendant 3 h expriment plus la proCol1 que les CFs P1 contrôles et que les CFs P1 traités à l'ISO pendant 20 h (**Figure 33B**); les CFs P1 traités à l'ISO pendant 20 h expriment moins la proCol1 que les CFs P1 traités à l'ISO pendant 1 h et 3 h (**Figure 33B**). Ces résultats montrent que la stimulation du système bêta-adrénergique des CFs P1 favorise l'augmentation transcriptionnelle de proCol1 après 3 h de traitement à l'ISO et la diminution transcriptionnelle de CTGF, α -SMA et proCol1 après 20 h de traitement à l'ISO, ce qui suggère une désactivation transcriptionnelle de la fibrose cardiaque dans les CFs P1 traités à l'ISO pendant 20 h. Au niveau traductionnel, les CFs P1 traités à l'ISO pendant 1 h et 3 h expriment plus la forme phosphorylée de Akt sur sa sérine 473 (P-Akt), α -SMA et Col1 que les CFs P1 contrôles (**Figure 33C**), ce qui suggère que l'ISO favorise l'activation traductionnelle de la fibrose cardiaque après 1 h et 3 h de traitement. Les CFs P1 traités à l'ISO pendant 20 h ont des expressions protéiques de P-Akt et α -SMA réduites comparés aux CFs P1 traités à l'ISO pendant 1 h et 3 h pour l' α -SMA (**Figure 33C**), ce qui suggère une inactivation traductionnelle de la fibrose cardiaque dans les CFs P1 traités à l'ISO pendant 20 h.

La diminution de l'adhésion/prolifération des CFs traités à l'ISO pendant 1 h et 3h comparés aux CFs contrôles est associée à une diminution transcriptionnelle de CTGF mais pas de α -SMA et proCol1 et une augmentation traductionnelle des 3 gènes de la fibrose cardiaque étudiée, ce qui confirme que le traitement à l'ISO module précocement le phénotype myofibroblastique des CFs P1. L'absence de modulation de l'adhésion/prolifération des CFs traités à l'ISO pendant 20 h comparés aux CFs contrôles est associée à une inactivation traductionnelle et une désactivation transcriptionnelle des gènes de la fibrose cardiaque. Ces résultats témoignent que l'impédancemétrie permet de détecter dans les CFs P1 traités à l'ISO les modulations traductionnelles mais pas transcriptionnelles des gènes activés lors de la fibrose cardiaque. La correspondance entre le profil d'adhésion/prolifération et le profil protéique des gènes de la fibrose des CFs P1 traités à l'ISO témoigne de l'intérêt de l'impédancemétrie pour identifier des temps de traitements associés à des modulations du phénotype myofibroblastique.

Afin de déterminer si le phénotype myofibroblastique des CFs P1 est aussi modulé par une stimulation pro-fibrotique par l'ANGII à 100 nM (Pedram *et al.*, 2016), les CFs P1 stimulés ou non (PBS) ont été caractérisés par impédancemétrie et par analyse de l'activation transcriptionnelle et traductionnelle de la fibrose cardiaque (**Figure 34**).

RESULTATS

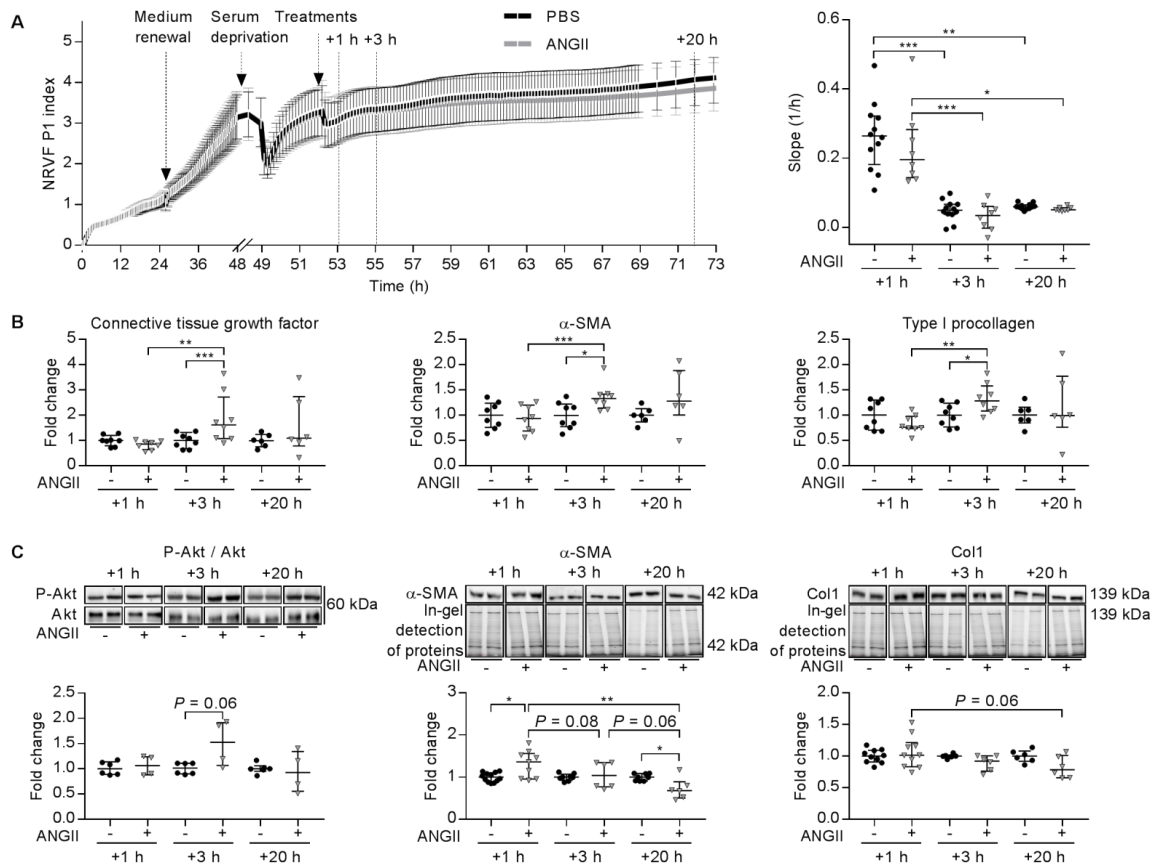


Figure 34: Identification d'une fenêtre d'activation différentielle de la fibrose entre les fibroblastes ventriculaires de rats néonataux (NRVFs) sous-cultivés (P1) stimulés par l'angiotensine II à 100 nM (ANGII, en gris) et non-stimulés (PBS, en noir). (A) Suivi en temps réel de la prolifération/adhésion des NRVFs P1 (n = 8). Les temps de changement de milieu, de privation en sérum et de traitements, 24 h, 48 h, 52 h après l'ensemencement, respectivement, ainsi que les différents temps de traitements sélectionnés (+1 h, +3 h et +20 h) sont indiqués sur le graphique de gauche. Les coefficients de pente des courbes aux temps de traitements sélectionnés sont indiqués sur le graphique de droite. Les pentes d'indice cellulaire sont comparées par le test de Kruskal-Wallis avec la comparaison multiple de Dunn: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.05$. (B) Les ARNs messagers (n = 6-8) de CTGF (*connective tissue growth factor*), de l'actine α du muscle lisse (α -SMA) et du procollagène de type I ont été quantifiés par RT-qPCR et exprimés en *fold change* par rapport à la moyenne des CFs P1 contrôles (PBS) de chaque temps après normalisation avec HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransférase). (C) Détections représentatives des protéines solubles dans le RIPA dans le gel par la technologie *stain free* et de *western blots*. L'expression de la forme phosphorylée de la protéine Akt sur la sérine 473 (P-Akt) est normalisée sur l'expression de Akt (n = 6), et les expressions protéiques de l' α -SMA et du collagène de type I (Col1) (n = 8-12) sont normalisées sur les protéines détectées par la technologie *stain free*. Les protéines sont exprimées en *fold change* rapport à la moyenne des CFs P1 contrôles (PBS) de chaque temps. Les expressions des ARNs messagers et des protéines ont été comparées par le test de Mann-Whitney: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.05$. Les groupes de données sont présentés en médiane \pm Interquartiles.

L'analyse du suivi en temps réel de l'adhésion/prolifération des CFs P1 montre que les CFs P1 cultivés en présence de sérum pendant 48 h et sans sérum pendant 3 h suivent une évolution identique avant et après les traitements à l'ANGII comparés au PBS (Figure 34A), ce qui suggère

RESULTATS

que la stimulation du système rénine-angiotensine-aldostérone des CFs P1 avec l'ANGII ne provoque aucune modulation de leur adhésion/prolifération entre 0 h et 73 h de traitement.

Puisque l'ANGII est décrite pour induire une activation transcriptionnelle et traductionnelle de la fibrose cardiaque dans les CFs (Pedram *et al.*, 2016), l'état d'activation de la fibrose cardiaque dans les CFs P1 a quand même été évalué 1 h, 3 h et 20 h après les traitements à l'ANGII comparés au PBS (**Figure 34B et 34C**). Au niveau transcriptionnel, les CFs P1 traités à l'ANGII pendant 3 h expriment plus CTGF, α -SMA et proCol1 que les CFs P1 contrôles et les CFs P1 traités à l'ANGII pendant 1 h (**Figure 34B**), ce qui suggère une activation transcriptionnelle de la fibrose cardiaque après 3 h de traitement à l'ANGII. Au niveau traductionnel, les CFs P1 traités à l'ANGII pendant 1 h expriment plus l' α -SMA mais pas plus de P-Akt et de Col1 que les CFs P1 contrôles (**Figure 34C**); les CFs P1 traités à l'ANGII pendant 3 h expriment plus P-Akt que les CFs P1 contrôles (**Figure 34C**); les CFs P1 traités à l'ANGII pendant 20 h expriment moins l' α -SMA que les CFs P1 contrôles et que les CFs P1 traités à l'ANGII pendant 1 h et 3 h (**Figure 34C**); les CFs P1 traités à l'ANGII pendant 20 h expriment aussi moins la proCol1 que les CFs P1 traités à l'ANGII pendant 1 h (**Figure 34C**). Ces résultats suggèrent une activation transcriptionnelle partielle de la fibrose cardiaque dans les CFs P1 traités pendant 1 h et 3 h à l'ANGII comparés aux CFs P1 contrôles et une désactivation traductionnelle partielle de la fibrose cardiaque dans les CFs P1 traités pendant 20 h à l'ANGII comparés aux CFs P1 contrôles et traités à l'ANGII pendant 1 h et 3 h.

Les modulations transcriptionnelles et traductionnelles de la fibrose cardiaque dans CFs P1 traités à l'ANGII comparés aux CFs P1 contrôles (PBS) ne sont pas associées à des modulations de leur adhésion/prolifération. La désactivation traductionnelle (hors P-Akt) mais pas transcriptionnelle de la fibrose cardiaque des CFs P1 traités à l'ISO pendant 20 h comparés aux CFs P1 contrôles n'est pas associée à des modulations de leur adhésion/prolifération. Ces résultats suggèrent que l'activation/désactivation de la fibrose cardiaque dans les CFs P1 traités à l'ANGII n'est pas associée à des modifications morphologiques suffisantes pour être détectées par impédancemétrie.

Pour finir, la caractérisation des CFs P1 traités à l'ISO ou à l'ANGII comparés aux CFs P1 contrôles (PBS) montre que les 2 traitements ont des effets pro- et anti-fibrotiques différents selon le temps de traitement et impliquent des voies de signalisation différentes en fonction du traitement. La désactivation transcriptionnelle et/ou traductionnelle de la fibrose cardiaque observée après 20 h de traitement à l'ISO et à l'ANGII ne permet pas de retrouver les niveaux d'expression des gènes pro-fibrotiques détectés dans les CFs T0, ce qui peut suggérer que les CFs P1 traités à l'ISO et à l'ANGII présentent toujours un phénotype myofibroblastique.

RESULTATS

Afin de vérifier si l'activation/inactivation/désactivation de la fibrose cardiaque induite par l'ISO ou l'ANGII régule l'expression des 5 microARNs modulés dans les CFs de rats néonataux entre T0, P0 et P1, leur expression a été quantifiée dans les CFs P1 traités à l'ISO ou à l'ANGII comparés aux CFs P1 contrôles (PBS) (**Figure 35**).

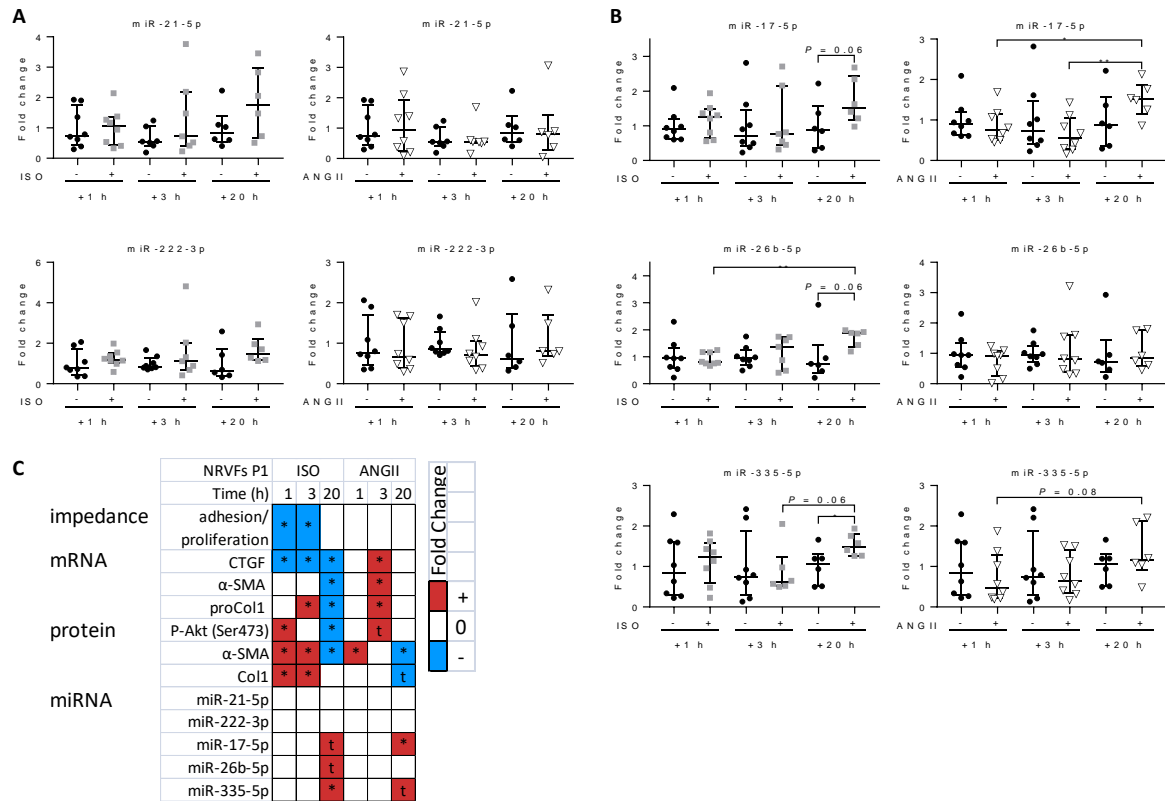


Figure 35: Expression des (A) miR-21-5p, miR-222-3p et des (B) miR-17-5p, miR-26b-5p et miR-335-5p dans les fibroblastes cardiaques sous-cultivés de rats néonataux (NRVFs P1) traités à l'isoprénaline à 10 μ M (ISO, "+", carrés gris), à l'angiotensine II à 100 nM (ANGII, "+", triangles blanc) comparés aux NRVFs P1 contrôles (PBS, "-", ronds noir). Les microARNs ont été quantifiés dans les NRVFs P1 par RT-qPCR et exprimés en *fold change* par rapport aux NRVFs P1 traités au PBS de chaque temps de traitement (+1 h, +3 h et +20 h) après normalisation avec RNU6.2. Les expressions des microARNs ont été comparés par le test de Mann-Whitney: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Les groupes de données ($n = 6-8$) sont présentés en médiane \pm Interquartiles. (C) Tableau récapitulatif des augmentations (rouge) et diminutions (bleu) significatives (*) et tendanciels (t, $P \leq 0.08$) d'impédances (adhésion/prolifération), d'expression d'ARNs messagers (CTGF, *connective tissue growth factor*; actine α du muscle lisse, α -SMA; et du procollagène de type I, proCol1) et de protéines (forme phosphorylée de la protéine Akt sur la sérine 473, P-Akt; α -SMA et de Col) impliquées dans la fibrose cardiaque et d'expression des 5 microARNs dans les NRVFs P1 traités à l'ISO, à l'ANGII comparés au NRVFs contrôles et au NRVFs P1 traités à différents temps.

Les miR-21-5p et miR-222-3p ne sont pas modulés dans les CFs P1 traités à l'ISO et à l'ANGII pendant 1 h, 3 h et 20 h comparés aux CFs P1 contrôles (**Figure 35A**), ce qui suggère que la régulation de l'expression de ces microARNs n'est pas dépendante des voies de signalisation déclenchées par l'ISO et l'ANGII dans les CFs P1.

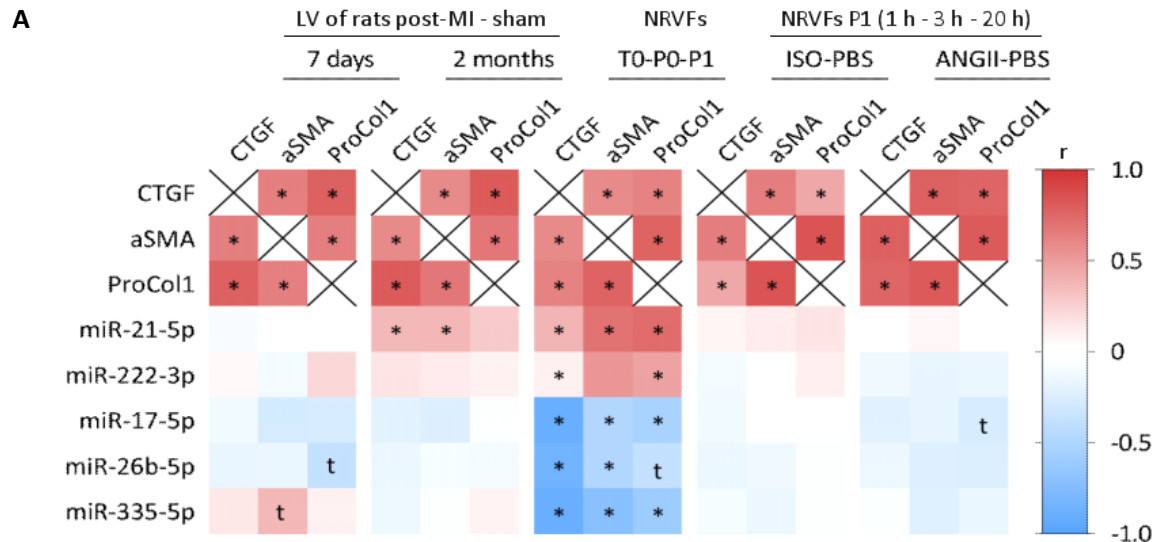
RESULTATS

Les miR-17-5p, miR-26b-5p et miR-335-5p augmentent dans les CFs P1 traités à l'ISO pendant 20 h mais pas pendant 1 h et 3 h comparés aux CFs P1 contrôles (**Figure 35B**); les miR-26b-5p et miR-335-5p sont aussi plus exprimés dans les CFs traités à l'ISO pendant 20 h que dans les CFs traités à l'ISO pendant 1 h et 3 h, respectivement (**Figure 35B**). Ces résultats montrent que la désactivation transcriptionnelle et traductionnelle de la fibrose cardiaque détectée dans les CFs P1 après 20 h de traitement à l'ISO est associée à l'augmentation des miR-17-5p, miR-26b-5p et miR-335-5p (**Figure 35C**). Les miR-17-5p et miR-335-5p mais pas le miR-26b-5p augmentent aussi dans les CFs P1 traités à l'ANGII pendant 20 h mais pas pendant 1 h et 3 h comparés aux CFs P1 contrôles et/ou aux CFs P1 traités à l'ANGII pendant 1h (**Figure 35B**). Ces résultats montrent que l'inactivation transcriptionnelle et la désactivation traductionnelle de la fibrose cardiaque détectées dans les CFs P1 après 20 h de traitement à l'ANGII sont associées à l'augmentation des miR-17-5p et miR-335-5p mais pas du miR-26b-5p (**Figure 35C**), ce qui montre que la régulation du miR-26b-5p implique des voies de signalisation dépendantes de la stimulation à l'ISO et indépendantes de la stimulation à l'ANGII. De manière intéressante, l'activation transcriptionnelle et traductionnelle des gènes de la fibrose mise en évidence entre les CFs T0, P0 et P1, au contraire, est associée à la diminution des miR-17-5p, miR-26b-5p et miR-335-5p (**Figure 35**), ce qui confirme l'implication de la modulation phénotypique des CFs lors de fibrose cardiaque dans la régulation de ces 3 microARNs.

II.4 - Implication des 5 microARNs dans la régulation des gènes de la fibrose cardiaque

Puisque les microARNs peuvent réguler l'expression des ARNs messagers, les corrélations négatives et positives entre leurs expressions peuvent indiquer une interaction directe et indirecte, respectivement. Afin de déterminer l'association des 5 microARNs modulés par la fibrose cardiaque avec la régulation des gènes de la fibrose, les rangs d'expression des 5 microARNs ont été comparés aux rangs d'expression dans les mêmes échantillons issues de VG de rats, de CFs T0-P0-P1 et de CFs P1 traités ou non soit à l'ISO et soit à l'ANGII de 3 ARNs messagers associés à l'activation de la fibrose cardiaque (CTGF, α -SMA et proCol1) (**Figure 36**).

RESULTATS



B Position 529-535 of COL1A2 3' UTR
 Position 331-337 of COL5A1 3' UTR
 Position 367-374 of COL10A1 3' UTR
 Position 722-729 of COL19A1 3' UTR
 Position 41-47 of COL22A1 3' UTR

(*Rattus norvegicus*) rno-miR-26b-5p

Position 503-510 of COL1A2 3' UTR
 Position 393-399 of COL5A1 3' UTR
 Position 469-476 of COL10A1 3' UTR
 Position 1978-1985 of COL19A1 3' UTR
 Position 41-47 of COL22A1 3' UTR

(*Homo Sapiens*) hsa-miR-26b-5p

5' ...AGUAGUAUUUCAGACACUUGAAG...
 5' ...UUUUAAAAAAAAUUCAACUUGAAG...
 5' ...UUAUAUUACUUUAAAAUCUUGAA...
 5' ...GGCACCAACAU AUGCUACUUGAA...
 5' ...CUAUGGAUUUCUGAA--ACUUGAAC...

3' UGGAUAGGACUUA AUGAACUU

5' ...UAAUAGUAUUUCAGAUACUUGAA...
 5' ...UUUUUCUAAAUUCA----ACUUGAAG...
 5' ...UUUGUAGAACU UAAAAUCUUGAA...
 5' ...CCACUCAU AUUAAUU UACUUGAA...
 5' ...CAGUGGAUUUCUGAA--ACUUGAAC...

3' UGGAUAGGACUUA AUGAACUU

Figure 36: Association de l'expression des miR-21-5p et miR-222-3p, des miR-17-5p, miR-26b-5p et miR-335-5p avec l'expression de 3 gènes de la fibrose cardiaque dans les ventricules gauches (LV) de rats et dans les fibroblastes ventriculaires de rats néonataux (NRVFs). (A) Les corrélations (r) positives (rouge) et négatives (bleu) de Spearman entre l'expression des 5 microARNs et l'expression des 3 gènes de la fibrose (CTGF, *connective tissue growth factor*; actine α du muscle lisse, α -SMA; et du procollagène de type I, proCol1) sont indiqués sur une *heat map* dans laquelle les corrélations significatives ($P < 0.05$) sont indiquées par une *, et les tendances ($P < 0.06$) sont indiquées par un t. Les corrélations ont été effectuées dans les LV de rats 7 jours et 2 mois après l'infarctus du myocarde (MI) et une opération contrôle (sham) et dans les NRVFs après l'isolement (T0), après 96 h (P0) de culture et après 48 h de sous-culture (P1) avec ou sans traitement à l'isoprénaline 10 μ M (ISO) et à l'angiotensine II (ANGII) après normalisation avec HPRT et/ou miR-423-3p (B) Alignement des séquences nucléotidiques de rat et d'homme ciblées par le miR-26b-5p présentes dans la région 3'UTR de 5 ARNs messagers codant pour 5 types de collagène disponibles sur miRTarBase v7.2.

Dans la zone non infarctée de VG de rats 2 mois après l'IDM et l'opération contrôle, l'expression du miR-21-5p corrèle positivement avec celle de CTGF ($r = 0.36$, $P = 0.014$) et de l' α -SMA ($r = 0.37$, $P = 0.015$) (Figure 36A). L'expression de l' α -SMA dans le VG de rat corrèle aussi positivement avec

RESULTATS

l'expression du miR-335-5p ($r = 0.37$, $P = 0.053$) 7 jours après l'IDM et avec l'expression du miR-23a-3p ($r = 0.37$, $P = 0.02$) 2 mois après l'IDM et l'opération contrôle (**Figure 36A**). Ces résultats suggèrent que le miR-335-5p favorise l'activation précoce et le miR-21-5p favorise l'activation tardive de la fibrose cardiaque après l'IDM. Enfin, l'expression du miR-26b-5p semble corrélérer négativement avec celle de proCol1 ($r = -0.37$, $P = 0.051$) dans la zone non-infarctée de VG de rats 7 jours après l'IDM et l'opération contrôle (**Figure 36A**), ce qui suggère que ce microARN pourrait inhiber directement la production de Col1 et la fibrose cardiaque.

Dans les CFs issus des 3 différents temps de culture (T0, P0 et P1), comme dans le VG des rats mâles après l'IDM, les 3 ARNs messagers de la fibrose étudiés corrélaient positivement entre eux et avec les miR-21-5p et miR-222-3p (**Figure 36A**), ce qui suggère que ces 2 microARNs sont profibrotiques mais ne ciblent pas directement les 3 ARNs messagers de la fibrose étudiés. Les miR-17-5p et miR-26b-5p corrélaient négativement avec un ou plusieurs ARNs messagers de la fibrose (**Figure 36A**), ce qui suggère que ces 2 microARNs sont anti-fibrotiques et ciblent peut-être directement les 3 gènes de la fibrose étudiés. De manière intéressante, comme dans les VG de rats mâles 7 jours après l'IDM, le miR-26b-5p corréla négativement avec proCol1 ($r = -0.39$, $P = 0.062$) (**Figure 36A**), ce qui témoigne de son importance dans la régulation de la fibrose cardiaque. Chez le rat et l'Homme, le miR-26b-5p est complémentaire de la région 3'UTR d'ARN messager de 5 types de collagènes différents incluant proCol1 (COL1A2) (**Figure 36B**), ce qui confirme que le miR-26b-5p peut inhiber directement la production de collagènes associée à la fibrose cardiaque.

Dans les CFs P1 traités ou non à l'ISO ou à l'ANGII, comme dans les CFs issus des 3 différents temps de culture (T0, P0 et P1) et dans le VG des rats mâles après l'IDM, les 3 ARNs messagers de la fibrose étudiés corrélaient positivement et significativement entre eux mais pas avec les 5 microARNs de manière significative, sans doute car les modulations de l'expression des gènes détectées entre les CFs traités à l'ISO ou à l'ANGII et les CFs non-traités sont plus faibles que celles détectées entre les rats après l'IDM et les rats contrôles; et aussi entre les CFs T0 et les CFs P1. Cependant, le miR-21-5p mais pas le miR-222-3p garde un profil de corrélations positives avec les 3 gènes de la fibrose étudiés bien que non significatif dans les CFs traités à l'ISO ou à l'ANGII et non traités. Les miR-17-5p et miR-26b-5p gardent aussi un profil de corrélations négatives avec les 3 gènes de la fibrose étudiés bien que non significatif dans les CFs traités à l'ISO ou à l'ANGII et non traités; une tendance à la significativité est toutefois détectée pour la corrélation négative entre le miR-17-5p et proCol1 dans les CFs traités à l'ANGII et non traités mais pas dans les CFs traités à l'ISO, ce qui suggère que l'association négative du miR-17-5p avec la fibrose cardiaque dépend de l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone.

RESULTATS

Ces résultats montrent que les modulations d'expression des 5 microARNs dans les CFs pourraient participer à la régulation de l'expression des gènes de la fibrose cardiaque. Plus particulièrement, le criblage des microARNs associés à la fibrose cardiaque a permis d'identifier le miR-26b-5p comme un régulateur direct potentiel de la production de collagènes pendant la fibrose cardiaque.

II.5 - Association de la signature en microARNs avec l'hypertrophie des cardiomyocytes

Afin de vérifier si la signature en microARNs, modulée par le RVG après l'IDM et la fibrose cardiaque, est aussi modulée par l'hypertrophie des CMs *in vitro*, l'expression des miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p a été quantifiée dans les CMs de rats néonataux hypertrophiés (**Figure 37**).

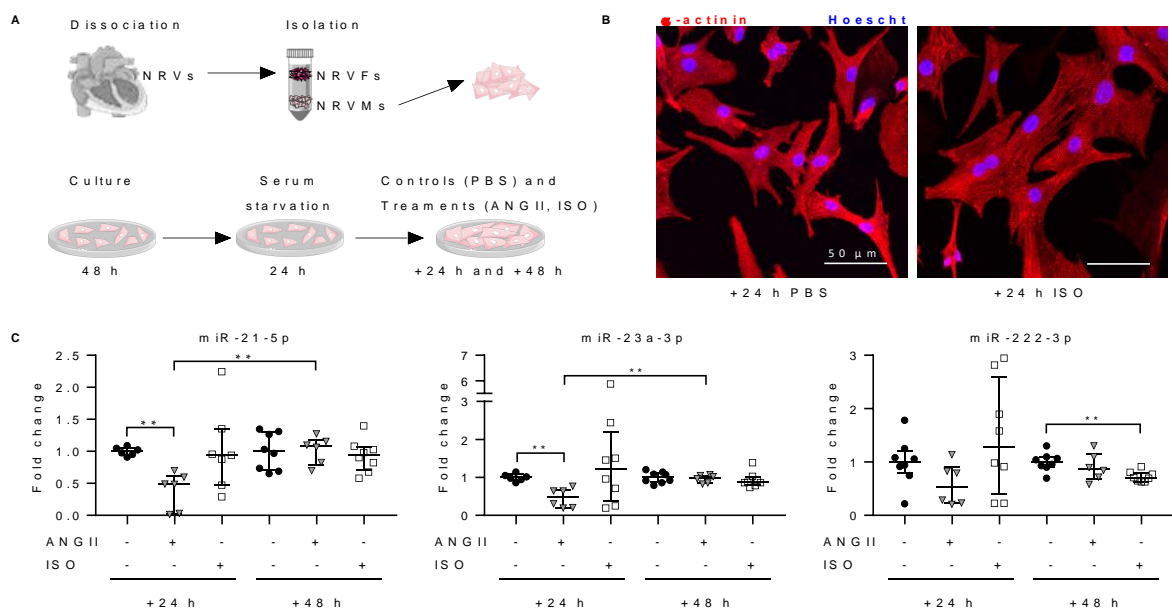


Figure 37: Expression des miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p dans les cardiomyocytes de rats néonataux (NRVMs) hypertrophiés. (A) Aperçu du protocole utilisé pour isoler les NRVMs et induire leur hypertrophie par traitement à l'angiotensine II (ANGII, triangles gris) et à l'isoprénaline (ISO, carrés blancs). Le PBS (ronds noirs) a été utilisé comme contrôle. (B) Marquage du cytosquelette des NRVMs à l' α -actinine (en rouge) et des noyaux au Hoescht (en bleu). (C) Les miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p ont été quantifiés dans les NRVMs par RT-qPCR et exprimés en *fold change* par rapport aux NRVMs traités au PBS de chaque temps de traitement (+24 h et +48 h) après normalisation avec RNU6.2. Les groupes de données (n = 6-8) sont présentés en médiane \pm interquartiles et sont comparés avec le test de Mann-Whitney: ** $P < 0.01$.

L'hypertrophie des CMs de rats néonataux est induite par une stimulation pendant 24 h et 48 h soit à l'ANGII, soit à l'ISO (**Figure 37A**). L'hypertrophie des CMs traités à l'ISO pendant 24 h a été validée après marquage du cytosquelette à α -actinine par une augmentation de l'aire cellulaire de 23% par rapport aux CMs contrôles (PBS) (**Figure 37B**). L'hypertrophie des CMs traités à l'ISO pendant 48 h avait aussi été validée (Dubois-Deruy *et al.*, 2017) et celle des CMs traités à l'ANGII pendant 24 h et 48 h est en cours de validation. L'expression des miR-21-5p et miR-23a-3p est

diminuée dans les CMs traités pendant 24 h à l'ANGII comparés aux CMs contrôles et aux CMs traités pendant 48 h à l'ANGII (**Figure 37B**). L'expression du miR-222-3p est diminuée dans les CMs traités pendant 48 h à l'ISO comparés aux CMs contrôles (**Figure 37B**). Ces résultats montrent que les expressions des miR-21-5p, miR-23a-3p sont diminuées par l'hypertrophie cardiomyocytaire induite par le traitement à l'ANGII tandis que l'expression du miR-222-3p est diminuée après 48 h et pas 24 h de traitement à l'ISO, ce qui témoigne que ces 3 microARNs sont régulés par des voies de signalisation différentes pour l'hypertrophie cardiomyocytaire. De manière intéressante, dans ces mêmes conditions, l'une des cibles directes du miR-222-3p, l'enzyme anti-oxydante SOD2 est augmentée après 48 h mais pas 24 h de traitement à l'ISO (Dubois-Deruy *et al.*, 2017), ce qui témoigne que le miR-222-3p est impliqué dans la régulation de SOD2 en cas d'hypertrophie des CMs.

III - Caractérisation des VEs cardiaques impliquées dans le transport de la signature en microARNs associée avec le RVG après l'IDM.

La signature des 7 microARNs associée avec le RVG (**Résultats I**) et ses mécanismes (fibrose et hypertrophie, **Résultats II**) est détectée au moins en partie dans le plasma de rat et d'Homme (Charrier *et al.*, 2019). Ce résultat témoigne de l'implication de transporteurs extracellulaires dans le transport de cette signature qui la protège de la dégradation par les RNases et suggère que cette signature participe à la communication cellulaire. Puisque les 7 microARNs de la signature semblent être exprimés de manière ubiquitaire, leur détection dans la circulation pourrait avoir d'autres sources que le VG. La régulation des mécanismes impliqués dans la sécrétion des microARNs pourrait aussi participer aux différences d'expressions détectées entre le VG et le plasma.

III.1 - Implication des VEs cardiaques dans le transport de la signature en microARNs

Pour comprendre comment la signature en microARNs est sécrétée par les cellules cardiaques et identifier les transporteurs extracellulaires qui la rendent détectable dans la circulation, nous avons cherché à déterminer l'implication des VEs dans son transport. A partir de milieux de culture de cellules cardiaques de rats (CFs et CMs de rats néonataux et CMs-H9c2 de rats embryonnaires), les petites VEs et les grandes VEs ont été séparées par centrifugations différentielles (**Figure 38**).

RESULTATS

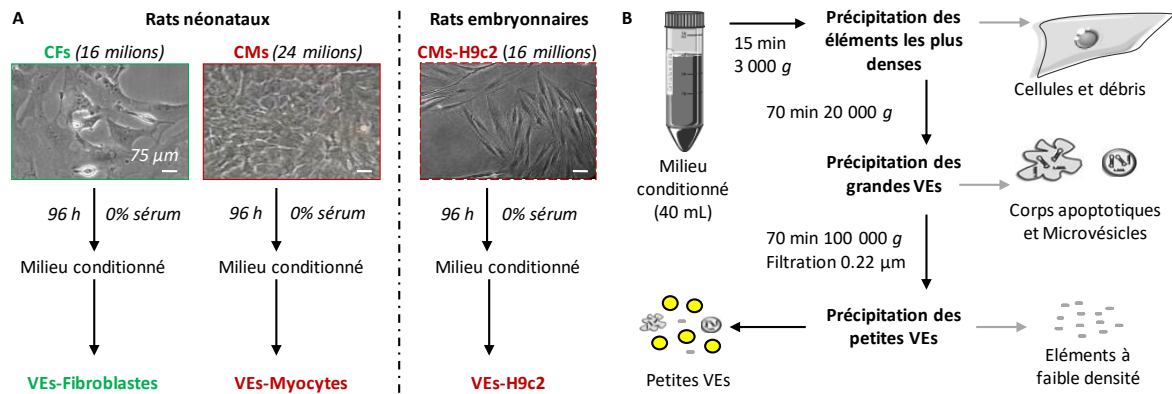


Figure 38: (A) Production, (B) isolement des vésicules extracellulaires (VEs) à partir de milieux de culture conditionnés de fibroblastes cardiaques (CFs, en vert) et de cardiomyocytes (CMs, en rouge) de rats néonataux et de cardiomyoblastes H9c2 (CMs-H9c2, en rouge) de rats embryonnaires.

La production de VEs par les CFs, les CMs et les H9c2 est stimulée par une privation en sérum de 96 h avant la collecte du milieu conditionné (**Figure 38A**). Comme les échantillons de plasma de rats et de patients disponibles au laboratoire, les milieux conditionnés ont été congelés à -20°C , ce qui favorise la dégradation des grandes VEs (Sokolova *et al.*, 2011) mais permet d'obtenir des populations de VEs plus comparables avec les VEs issues de plasma congelé. Les cellules et débris contenus dans le milieu conditionné sont séparés par une première centrifugation à 3 000 *g*, les grandes VEs (microvésicules et corps apoptotiques) sont séparées à 20 000 *g* et les petites VEs (exosomes, microvésicules et corps apoptotiques) sont séparées à 100 000 *g* (**Figure 38B**).

L'isolement des petites et grandes VEs issues de CFs, CMs et de CMs-H9c2 a été validé par analyse du suivi individuel des particules (NTA) et microscopie électronique à transmission (MET) (**Figure 39**).

L'analyse des VEs de CFs suggère que les petites VEs de CFs semblent avoir un diamètre modal (120.4 nm) inférieur à celui des grandes VEs de CFs (164.3 nm) (**Figure 39A**); la majorité des petites VEs de CFs ont un diamètre de 121.5 nm tandis que la majorité des grandes VEs de CFs ont un diamètre plus grand compris entre 149.1 et 190 nm (**Figure 39A**); les petites VEs de CFs semblent 10 fois plus nombreuses que les grandes VEs de CFs (**Figure 39A**); enfin la détection des petites VEs de CFs en MET confirme leur isolement et suggère leur agrégation. Cette analyse suggère que les petites et grandes VEs de CFs semblent différentes morphologiquement et numériquement.

L'analyse des VEs de CMs suggère que les petites VEs de CMs semblent avoir un diamètre modal (97.3 nm) inférieur à celui des grandes VEs de CMs (107.9 nm) (**Figure 39B**); la majorité des petites et grandes VEs de CMs ont un diamètre compris entre 95 nm et 113 nm (**Figure 39B**); enfin, les petites VEs de CMs semblent 7 fois plus nombreuses que les grandes VEs de CMs (**Figure**

RESULTATS

39B). Comme les VEs de CFs, les petites et grandes VEs de CMs semblent différentes morphologiquement et numériquement; cependant leurs concentrations semblent 100 fois moins importantes que les VEs libérées par les CFs, ce qui suggère que les CMs produisent moins de VEs que les CFs dans ces conditions.

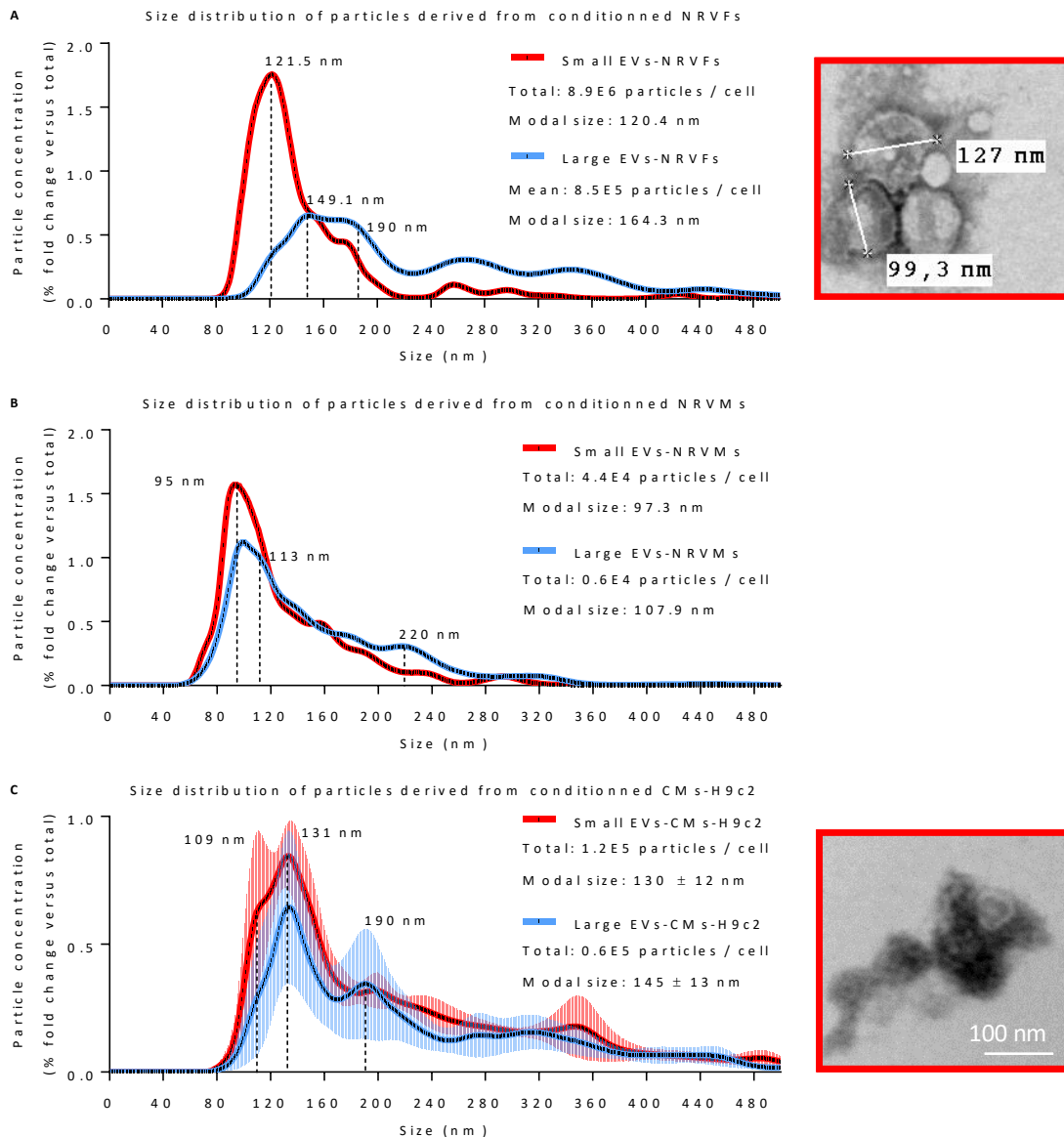


Figure 39: Caractérisation morphologique des vésicules extracellulaires (VEs) grandes (précipitées à 20 000 g, en rouge) et petites (précipitées à 100 000 g, en bleu) à partir du milieu de culture conditionné par 96 h de privation en sérum (A) de fibroblastes (NRVFs, n = 1) et (B) de cardiomyocytes (NRVMs, n = 1) ventriculaires de rats néonataux, et (C) de cardiomyoblastes H9c2 (CMs-H9c2, n = 3). La distribution des particules dérivées des cellules conditionnées a été mesurée par analyse du suivi individuel des particules (NTA). La concentration en particules de chaque diamètre est exprimée en *fold change* comparée à la concentration en particules totales détectées entre 30 nm et 1000 nm de diamètre pour chaque échantillon. Le diamètre modal des particules est indiqué. Les 3 pics les plus élevés, représentant les sous-types de particules de diamètre similaire les plus représentés sont indiqués par des lignes pointillées avec leurs diamètres respectifs. Les petites VEs issues des NRCFs et des myoblastes H9c2 sont détectées par microscopie électronique (images à droite des profils NTA).

RESULTATS

L'analyse des VEs-CMs-H9c2 suggère que les petites et grandes VEs-CMs-H9c2 ont un diamètre modal (130 nm \pm 12 nm et 145 nm \pm 13 nm respectivement), une distribution de taille ainsi qu'une concentration (1,2.10⁵ et 0,6.10⁵ particules par cellule respectivement) presque similaires (**Figure 39C**). La détection des petites VEs de CMs en MET (**Figure 39C**) confirme leur isolement et suggère leur agrégation. Ces résultats suggèrent que les petites et grandes VEs-CMs-H9c2 ne sont pas différentes morphologiquement et numériquement. Les VEs-CMs-H9c2 ont un nombre 10 fois plus élevé et un diamètre 1,25 fois plus grand que les VEs-CMs (**Figure 39**), ce qui indique que les CMs-H9c2 produisent plus de VEs que les CMs et que ces VEs-CMs-H9c2 sont plus grandes que les VEs-CMs. Comme les VEs-CMs, les VEs-CMs-H9c2 sont en un nombre moins élevé que les VEs-CFs (**Figure 39**), ce qui suggère que les H9c2 produisent moins de VEs que les CFs.

L'absence de différence morphologique entre les petites et grandes VEs issues de CMs et de CMs-H9c2, suggère que dans ces conditions, les grandes VEs sont fragmentées par la congélation-décongélation. La caractérisation morphologique des VEs-CFs, VEs-CMs et VEs-CMs-H9c2 isolées par centrifugation différentielle montre que les VEs sont hétérogènes et semblent différentes morphologiquement et numériquement selon l'origine cellulaire, ce qui suggère que leur implication dans le transport des microARNs dépend des cellules. L'implication des petites VEs issues de CFs et de CMs-H9c2 mais pas des VEs-CMs (en quantité insuffisante) ni des grandes VEs (sensibles à la congélation-décongélation des milieux de culture) a été évaluée pour le transport des microARNs de la signature associée au RVG après l'IDM (**Figure 40**).

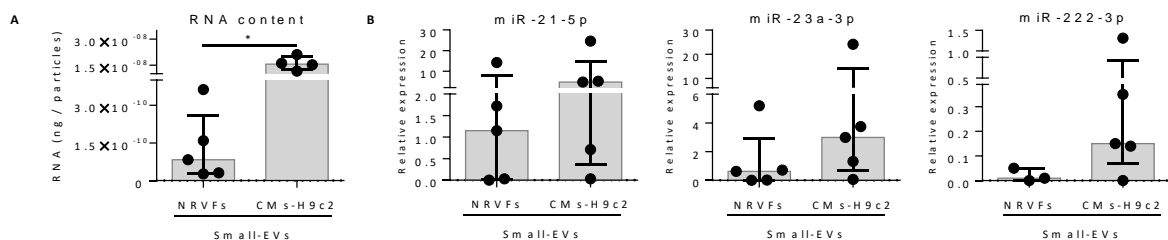


Figure 40: Analyse (A) de la concentration en ARN et (B) de l'expression des miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p dans les petites vésicules extracellulaires (*small-EVs*) issues de fibroblastes ventriculaires de rats néonataux (NRVFs) et de cardiomyoblastes H9c2 (CMs-H9c2). La concentration en ARNs extraits des VEs issues de NRVFs et de CMs-H9c2 a été détectée par spectrophotométrie et normalisée sur le nombre de particules détectées en analyse du suivi individuel des particules. L'expression des microARNs, quantifiés par RT-qPCR, est normalisée sur l'expression du *Cel-miR-39*. Les groupes de données (n = 3-5) sont présentés en médiane \pm interquartiles et sont comparés avec le test de Mann-Whitney: **P* < 0.05.

Les petites VEs-CFs sont 120 fois moins concentrées en ARNs (*P* = 0.016) que les petites VEs-CMs-H9c2 (**Figure 40A**), ce qui montre que les CFs sécrètent moins d'ARNs par les petites VEs que les CMs-H9c2 et suggère que les mécanismes impliqués dans le chargement en ARNs des VEs-CFs et des VEs-CMs-H9c2 sont différents. Les miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p sont détectés

RESULTATS

aussi bien dans les petites VEs issues de CFs que de CMs-H9c2 (**Figure 40B**), ce qui confirme que les petites VEs issues de CFs et de CMs-H9c2 sont impliquées dans le transport de la signature en microARNs associée au RVG après l'IDM. La grande hétérogénéité d'expression des 3 microARNs détectés dans les petites VEs issues de CFs et de CMs-H9c2 témoigne de la diversité des petites VEs isolées de CFs et de CMs-H9c2.

Les différences morphologiques et de contenus en ARNs des petites VEs-CFs et VEs-CMs-H9c2 montrent que les sous-types de petites VEs libérées par les CFs et les CMs-H9c2 sont différents, ce qui suggère que leur implication dans le transport de la signature en microARNs associée au RVG après l'IDM n'est pas la même selon les sous types de VEs.

III.2 - Caractérisation des VEs cardiaques impliquées dans le transport de la signature en microARNs

Pour identifier les petites VEs issues des CFs et des CMs-H9c2 impliquées dans le transport de la signature en microARNs associée au RVG après l'IDM, les petites VEs issues des CFs et les CMs-H9c2 ont été caractérisées par recherche de protéines impliquées dans leur biogénèse (CD63, CD81 et CD9) (van Niel *et al.*, 2018) (**Figure 41**).

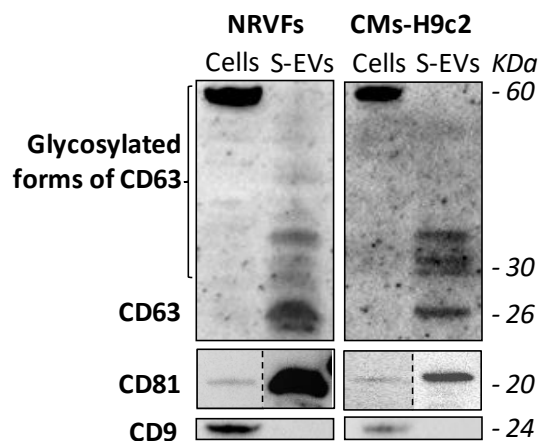


Figure 41: Analyse des protéines impliquées dans la biogénèse (CD63, CD81 et CD9) des petites vésicules extracellulaires (S-EVs) issues des fibroblastes ventriculaires de rats néonataux (NRVFs), des cardiomyoblastes H9c2 (CMs-H9c2) après 96 h de privation en sérum. CD, cluster of differentiation; KDa, Kilodalton. Les lignes pointillées indiquent qu'une partie de l'image a été retirée pour juxtaposer les cellules et les S-EVs.

Les petites VEs issues des CFs et des CMs-H9c2 expriment CD63 non-glycosylée, CD81 mais pas CD9 qui est pourtant abondante dans les CFs et les CMs-H9c2 (**Figure 41**), ce qui confirme qu'elles sont issues d'une biogénèse membranaire (plasmique ou endosomale). L'absence de CD9 dans les petites VEs issues des CFs et des CMs-H9c2, pourtant exprimée par les CFs et les CMs-H9c2, montre que les petites VEs cardiaques ont une composition particulière.

RESULTATS

Pour aller plus loin dans la caractérisation de la composition des sous-types de VEs impliqués dans le transport des microARNs de la signature associée au RVG après l'IDM, les profils des protéines des petites VEs issues des CFs et des CMs-H9c2 ont été séparées en gel 1 dimension pour être analysées (**Figure 42**).

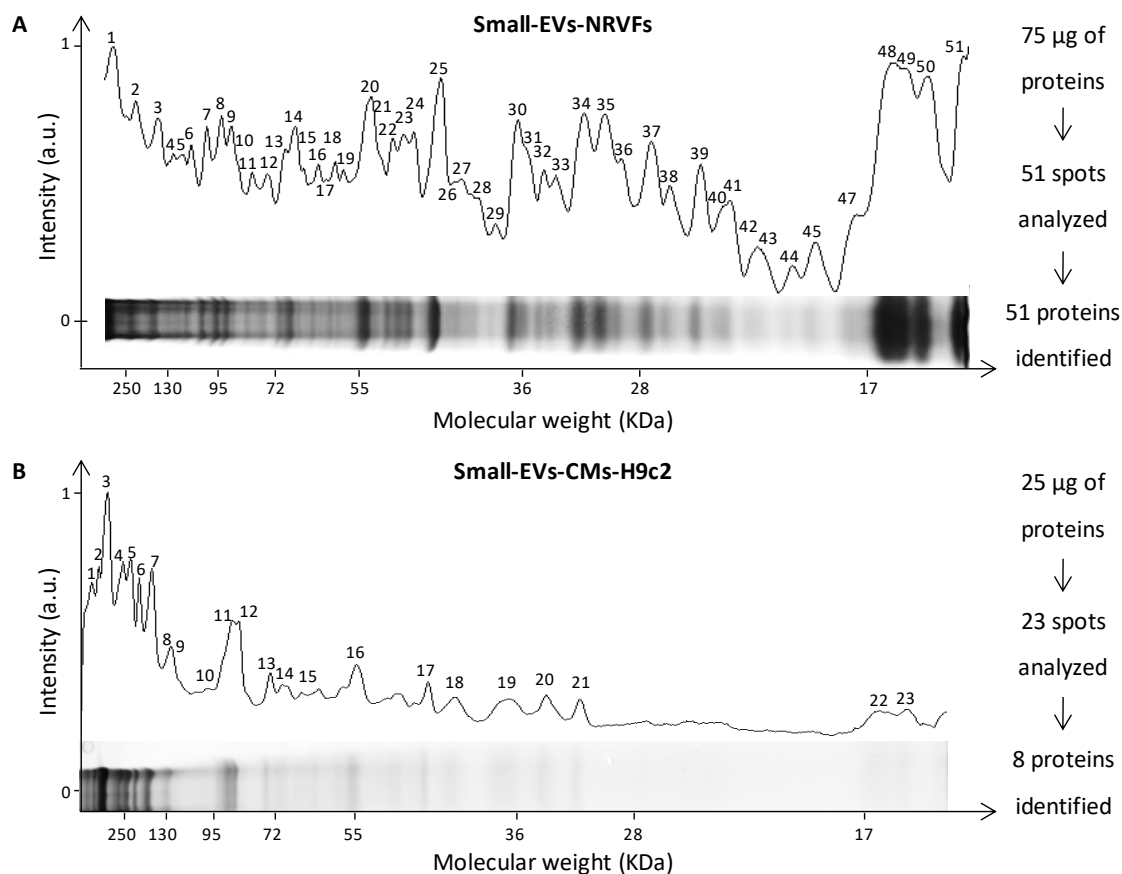


Figure 42: Analyse protéomique des petites vésicules extracellulaires (Small-EVs) issues (A) de fibroblastes cardiaques de rats néonataux (NRVFs) et (B) de cardiomyoblastes H9c2 (CMs-H9c2). Après séparation en gel 1D et une coloration des protéines au bleu de Coomassie colloïdal, les bandes de protéines (numérotées) ont été analysées en spectrométrie de masse en tandem par MALDI TOF/TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight/ Time of Flight*). Les protéines ont ensuite été identifiées par établissement de cartes peptidiques massiques (*peptide mass fingerprinting*). La quantité de protéines séparées, le nombre de bandes analysées et le nombre de protéines identifiées sont indiqués sur la droite. L'intensité des protéines colorées est mesurée par densitométrie et est exprimée en unité arbitraire (*a.u.*). Les poids moléculaires sont indiqués en Kilodalton (KDa).

L'alignement des profils de séparation des protéines de petites VEs issues de CFs (**Figure 42A**) et CMs-H9c2 (**Figures 42B**) suggère que ces profils sont majoritairement différents selon les petites VEs. Moins de protéines (25 µg) ont été utilisées pour l'analyse des petites VEs-CMs-H9c2 (**Figure 42A**) que pour l'analyse des petites VEs-CFs (75 µg) (**Figure 42B**). Moins de protéines ont été identifiées dans les petites VEs-CMs-H9c2 (8 protéines) (**Figure 42A**) que dans les petites VEs-CFs (35 protéines) (**Figure 42B**). Certains pics d'intensité ont une masse moléculaire similaire

RESULTATS

comme le pic 7 des petites VEs-CFs (**Figure 42A**) et le pic 10 des petites VEs-CMs-H9c2 (**Figure 42B**), ce qui suggère que des protéines sont communément exprimées. Certaines bandes de protéines analysées comme celles correspondant au pic 10 des petites VEs-CMs-H9c2 n'ont pas permis une identification significative ($\text{Log}P > 52$) (**Figure 42B**) alors que l'analyse de la bande correspondant au pic 7 des petites VEs-CFs a permis à l'identification de la protéine de voûte majeure (MVP) (**Figure 42A**), ce qui suggère que cette protéine est en fait exprimée par les deux types de petites VEs.

Les compositions protéiques identifiées à partir des petites VEs issues des CFs et des CMs-H9c2 ont été comparées et l'identification de certaines protéines a été validée par *western blot* (**Figure 43**).

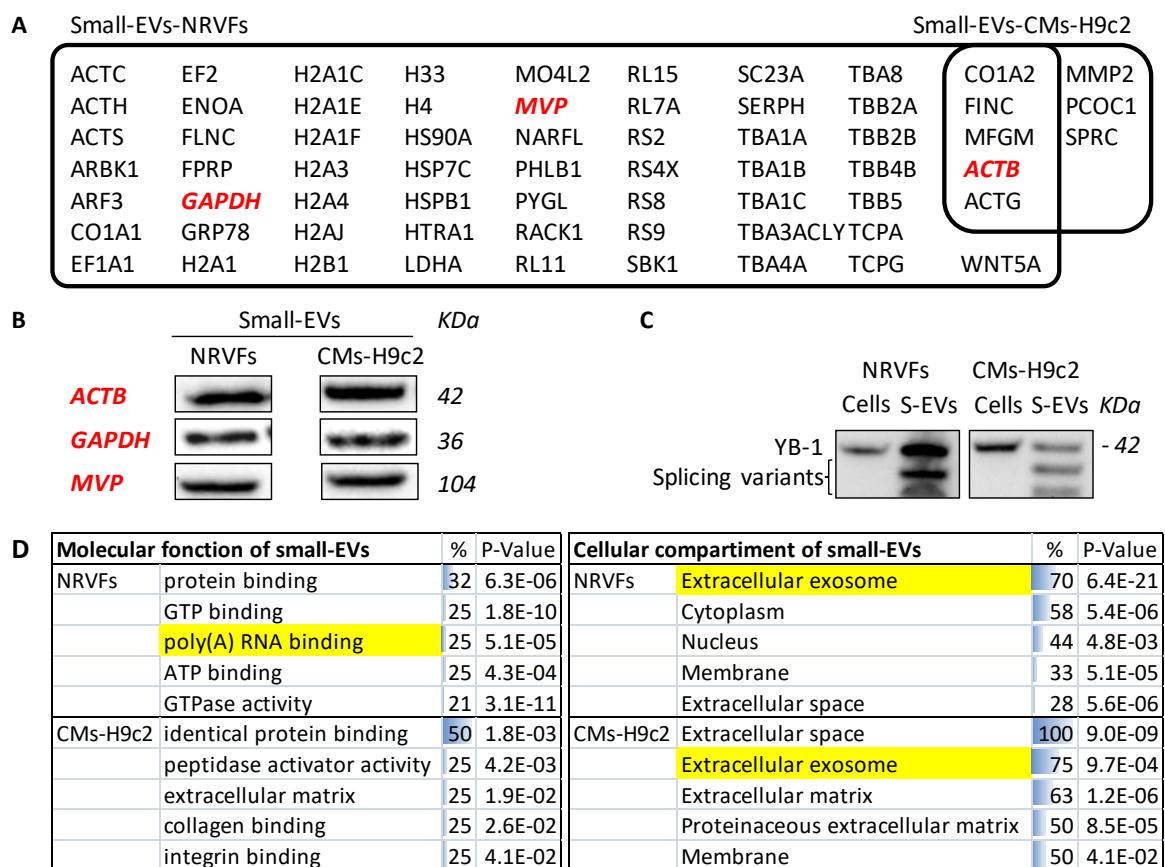


Figure 43: Analyse de la composition protéique des petites vésicules extracellulaires (small-EVs) de fibroblastes ventriculaires de rats néonataux (NRVFs) et de cardiomyoblastes H9c2 (CMs-H9c2). (A) Profil protéomique des *small-EVs* issues de NRVFs et de CMs-H9c2. (B) Détection de l'actine- β (ACTB, en rouge), la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH, en rouge), de la protéine de voûte majeure (MVP, en rouge) et (C) de la protéine YB-1 (*Y-box binding protein 1*). (D) Prédiction des 5 compartiments cellulaires et fonctions moléculaires des protéines identifiées par « *Gene Ontology* » (GO) avec les pourcentages de couverture des gènes représentés par terme GO les plus importants. La significativité de l'enrichissement de chaque terme GO est indiquée d'après le test exact de Fischer. Les termes GO colorés en jaune sont associés au transport des microARNs.

RESULTATS

L'analyse protéomique a identifié 51 protéines de petites VEs-CFs, 8 protéines de petites VEs-CMs-H9c2 et 5 protéines communes (**Figure 43A**). La détection biochimique de l'actine- β (ACTB), de la GAPDH et de MVP dans les petites VEs de CFs et de CMs-H9c2 (**Figure 43B**) valide l'identification des protéines par cette approche protéomique. La détection de GAPDH et de MVP, identifiées dans les petites VEs-CFs, ainsi que dans les petites VEs-CMs-H9c2 (**Figure 43B**), confirme que ces protéines n'ont pas été détectées de manière assez sensible dans les VEs-CMs-H9c2 pour permettre de les identifier. La détection de MVP dans les petites VEs cardiaques (**Figure 43B**) suggère l'implication de cette protéine dans le chargement des petites VEs cardiaques en microARNs (Teng, 2017). Pour aller plus loin dans l'identification des protéines pouvant être impliquées dans le chargement des VEs en microARNs, la protéine YB-1 et ses variants d'épissage ont été recherchés (Shurtleff *et al.*, 2016). Leur abondance dans les petites VEs issues des CFs et des CMs-H9c2 par rapport au CFs et au CMs-H9c2 respectivement (**Figure 43C**) témoigne que YB-1 et ses variants d'épissage, comme MVP, peuvent participer au chargement des petites VEs cardiaques en microARNs. L'analyse des termes *Gene Ontology* les plus représentés parmi les protéines identifiées à partir des petites VEs de CFs et de CMs-H9c2 suggère leur origine endosomale ("*exosome*") et leur fonction dans transport des molécules ("*binding*") (**Figure 43D**).

Les protéines identifiées par cette approche protéomique pourraient inclure des marqueurs spécifiques des petites VEs des CFs et des CMs.

III.3 - Identification des protéines abondantes dans les VEs intra-ventriculaires

Les protéines identifiées dans les petites VEs ventriculaires de CFs et de CMs pourraient permettre de les différencier des VEs non-ventriculaires présentes dans le plasma. Cependant, les VEs ventriculaires ne comprennent pas seulement les petites VEs produites par les CFs et les CMs mais aussi d'autres cellules cardiaques comme les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires. De plus, l'isolement des VEs par centrifugation différentielle ne permet pas de les séparer de tous les composants non-VEs comme les protéines sécrétées contrairement à d'autres techniques comme la chromatographie d'exclusion de taille (SEC).

Pour déterminer si les protéines identifiées dans les petites VEs-CFs et petites-CMs-H9c2 permettent de définir un profil spécifique des VEs ventriculaires, les protéines exprimées ou non dans les VEs issues de toutes les cellules des ventricules (VEs-ventricules) (Loyer *et al.*, 2017) de rats néonataux ont été comparées entre: (i) les VEs-ventricules et les composants non-VEs-ventricules séparés par SEC; (ii) les petites et grandes VEs-ventricules isolées par centrifugation différentielle; (iii) les VEs-ventricules et les VEs-plasmatiques (**Figure 44**). Les VEs et les composants non VEs issus des ventricules et du plasma ont été séparés par centrifugation

RESULTATS

différentielle et par SEC, respectivement et les particules isolées ou séparées ont été caractérisées morphologiquement (**Figure 44**).

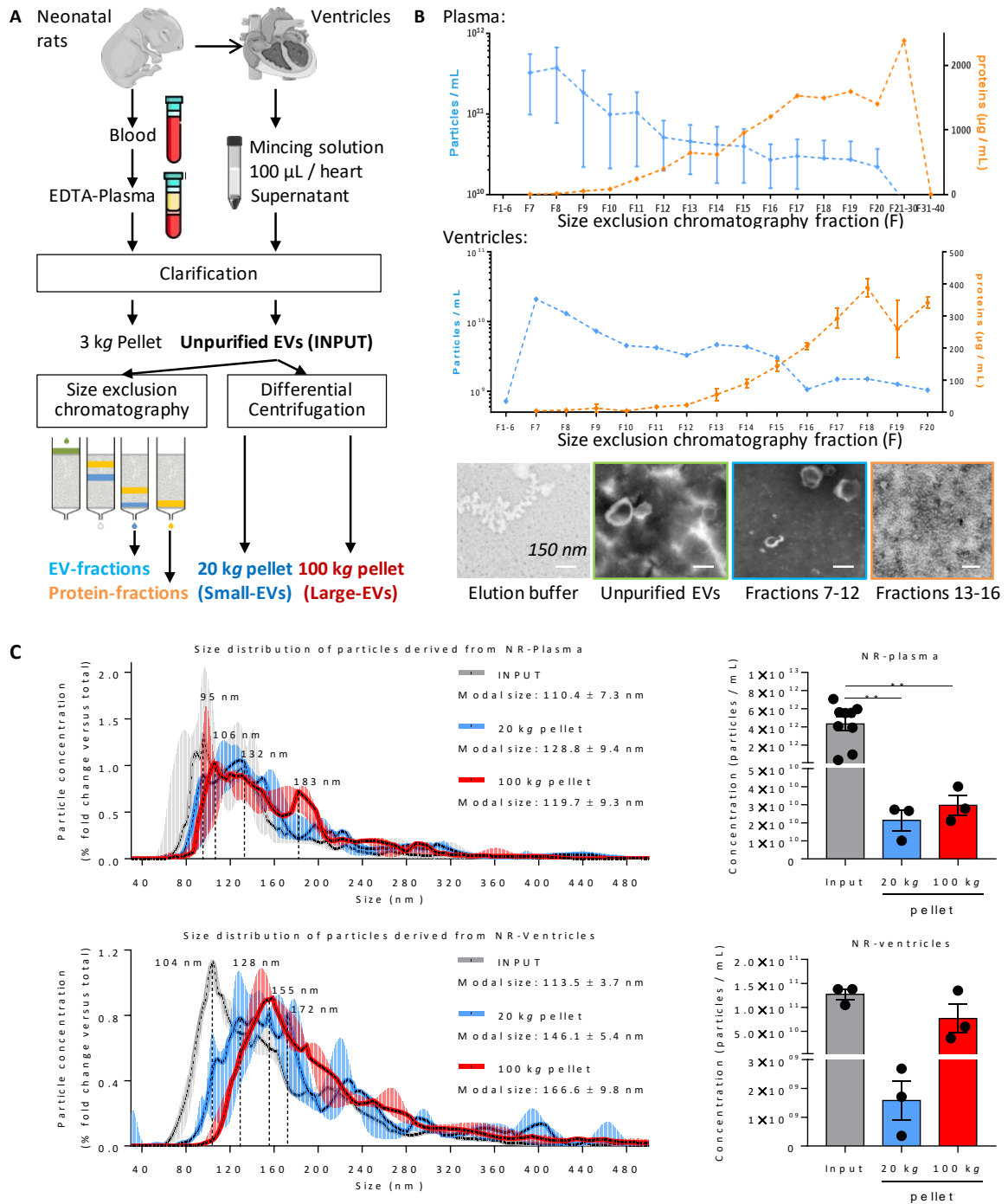


Figure 44: Caractérisation morphologique des vésicules extracellulaires (EVs) non-purifiées (INPUT), des petites (100 kg pellet, en rouge) et grandes (20 kg pellet, en bleu) EVs isolées par centrifugation différentielle et des composants non-EVs (en orange) séparés des VE par chromatographie d'exclusion de taille (SEC) à partir des ventricules et du plasma de rats néonataux (NR). (A) Isolement des EVs et des composants non-EVs à partir des ventricules et du plasma traité à l'EDTA. (B) Analyse des quantités en particules et en protéines des fractions SEC séparées à partir des ventricules et du plasma. Les concentrations en particules (en bleu ciel) et en protéines sont mesurées par analyse du suivi individuel des particules (NTA) et par dosage BCA

RESULTATS

(*bicinchoninic acid assay*) respectivement et sont exprimées par mL de VEs non-purifiées. Les fractions SEC représentatives sont détectées en microscopie électronique après coloration négative à l'acide phosphotungstique (en bas des profils de séparation des particules et des protéines). (C) Analyse de la distribution de la taille des particules issues des ventricules et du plasma par NTA. Le diamètre modal des particules est indiqué. Les 4 pics les plus élevés, représentant les sous-types de particules de diamètre similaire les plus représentés sont indiqués par des lignes pointillées avec leurs diamètres respectifs. La concentration en particules de chaque diamètre est exprimée en *fold change* comparée à la concentration en particules totales détectées entre 30 nm et 1000 nm de diamètre pour chaque échantillon ($n = 3$). Les concentrations en particules / mL de EVs non purifiées de ventricules ou de plasma ont été comparées (à droite des profils NTA) en utilisant le test de Mann-Whitney et les graphes indiquent des moyennes et des écarts types.

Les VEs et les composants non-VEs séparés par SEC et les petites et grandes VEs isolées par centrifugation différentielle issues du plasma et des ventricules de rats néonataux ont été analysés (**Figure 44A**). La concentration en particules détectée en NTA dans les fractions SEC issues du plasma et des ventricules montre que les particules sont plus nombreuses dans les premières fractions SEC avant la fraction 12, comparées aux fractions SEC suivantes, ce qui témoigne de l'élution majoritaire des VEs avant la fraction 12 (**Figure 44B**). Inversement, la concentration en protéines détectée en NTA dans les fractions SEC issues du plasma et des ventricules montre que les protéines sont plus nombreuses dans les dernières fractions SEC (après la fraction 12) comparées aux fractions SEC précédentes (**Figure 44B**). La détection par MET des VEs-ventricules dans les fractions 7 à 12 et d'objets lipidiques non-membranaires dans les fractions 13 à 20 (**Figure 44B**) valide la séparation par SEC des VEs et de composants non-VEs comme les protéines et certaines molécules lipidiques issues des ventricules.

La distribution de la taille des particules issues du plasma et des ventricules montre que les VEs non-purifiées (INPUT) ont un diamètre modal (110.4 ± 7.3 nm et 113.5 ± 3.7 nm respectivement) inférieur aux petites (119.7 ± 9.3 nm et 166.6 ± 9.8 nm respectivement) et grandes VEs (128.8 ± 9.4 nm et 146.1 ± 5.4 nm, respectivement), ce qui suggère que les particules sont plus agrégées après la centrifugation et/ou que les particules non isolées sont de plus petites tailles que les particules isolées par la centrifugation (**Figure 44C**).

La distribution de la taille des particules issues du plasma montre que les VEs non purifiées ont des tailles variées comparables aux petites et aux grandes VEs (**Figure 44C**). La plupart des particules issues de plasma ont un diamètre compris entre 95 nm et 183 nm (multiples pics) indépendamment de l'isolement (**Figure 44C**), ce qui témoigne de la polydispersité des VEs issues du plasma et suggère que les populations de VEs-plasma isolées ont une morphologie similaire. La diminution significative (x150-200, $P = 0.01$) de la concentration en particules après la centrifugation (**Figure 44C**) montre que beaucoup de particules ne sont pas isolées par la

RESULTATS

centrifugation. L'absence de différence significative entre le nombre de petites et grandes VEs dans le plasma (**Figure 44C**) suggère que les petites et grandes VEs sont présentes en quantité similaire dans le plasma.

Alors que les grandes VEs-ventricules ont plusieurs diamètres fortement représentés à 128 nm, 155 nm et 172 nm (**Figure 44C**), les petites VEs-ventricules sont principalement distribuées autour de 155 nm (**Figure 44C**), ce qui suggère que les petites VEs-ventricules sont plus uniformes en taille que les grandes VEs mais leur diamètre plus important que les grandes VEs témoigne peut être de leur agrégation. Comme pour les VEs issues de CFs et de CMs-H9c2, les petites VEs-ventricules tendent à être plus concentrées ($x48$, $P = 0.1$) que les grandes VEs-ventricules (**Figure 44C**), ce qui suggère que les petites VEs-ventricules sont produites en plus grandes quantités et/ou s'accumulent plus dans les ventricules que les grandes VEs-ventricules. L'absence de modulation de la concentration en particules avant et après la centrifugation (**Figure 44C**) suggère que la plupart des VEs-ventricules sont isolées par la centrifugation.

Comparées aux petites et grandes VEs-plasma, les petites et grandes VEs-ventricules ont un des diamètres les plus grands ($x1.39$, $P = 0.1$ et $x1.13$, $P = 0.2$, respectivement) (**Figure 44C**), ce qui suggère que les grandes VEs sont moins sécrétées dans le plasma et/ou y sont moins stables que les petites VEs. Puisque les échantillons de plasma et de ventricules ont été congelés avant d'être analysés en NTA, une partie des grandes VEs, sensibles à la congélation, peut avoir été dégradée, ce qui peut entraîner une sous-estimation des grandes VEs et une surestimation des petites VEs dans cette expérience. Inversement, comme observé précédemment avec les VEs-CFs et les VEs-H9c2, la centrifugation favorise l'agrégation des particules, ce qui peut aussi mener à une surestimation de leur taille.

Afin d'identifier le profil protéique des VEs-ventricules, les VEs issues des ventricules et du plasma isolées par centrifugation différentielle et les composants non-VEs obtenus par SEC ont été caractérisés pour leur contenu en protéines impliquées dans la biogénèse des VEs (CD63 et CD9), dans leur chargement en microARNs et en protéines sécrétées hors des VEs comme l'albumine (**Figure 45**).

L'albumine est détectée plus abondamment dans les VEs non-purifiées et les composants non-VEs que dans les petites et grandes VEs issues de ventricules et de plasma (**Figure 45**), ce qui montre que les protéines sécrétées hors des VEs comme l'albumine sont presque éliminées par la centrifugation différentielle et témoigne de la faible contamination des petites et grandes VEs-ventricules par des protéines sécrétées; la plus forte abondance de l'albumine dans les VEs-plasma témoigne que la séparation des VEs est moins efficace dans le plasma. La détection de

RESULTATS

CD63 à 26 kDa de manière un peu plus abondante dans les VEs issues de ventricules et de plasma que dans les ventricules, les VEs non-purifiées, et les composants non-VEs séparés en SEC (**Figure 45**) confirme que les VEs sont isolées par centrifugation différentielle. La détection de deux bandes entre 50 kDa et 60 kDa (**Figure 45**) pourrait correspondre à des formes glycosylées de CD63. Ces deux formes de CD63 semblent plus abondantes dans les VEs-plasma que dans le plasma, les VEs-plasma non-purifiées, et les composants non-VEs-plasma séparés en SEC. Dans les VEs-ventricules les 2 formes de CD63 semblent aussi plus abondantes dans les VEs-ventricules non-purifiées, et les composants non-VEs-ventricules séparés en SEC (**Figure 45**). Ces résultats suggèrent que les VEs-ventricules et les VEs-plasma ont une composition différente. De même, CD81 est détecté en abondance dans les VEs-ventricules mais pas dans les VEs-plasma et plus particulièrement dans les petites-VEs-ventricules (**Figure 45**).

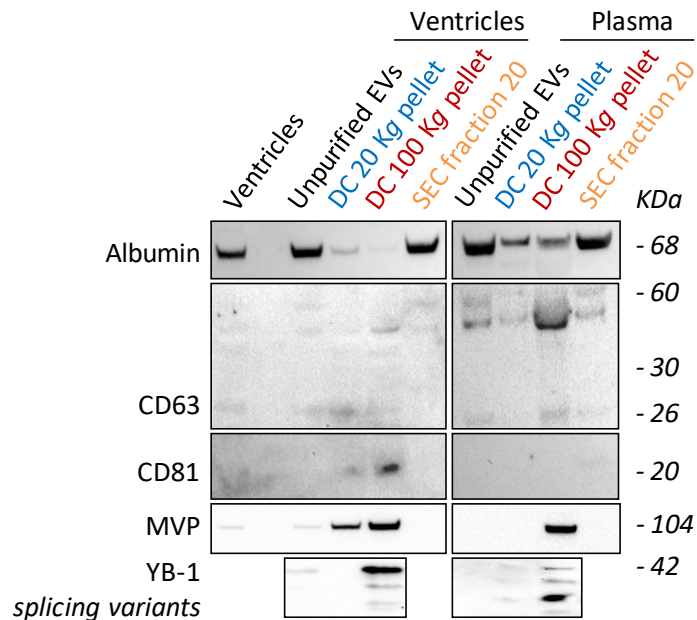


Figure 45: Analyse des protéines impliquées dans la biogénèse (CD63 et CD81) et le chargement en microARNs (MVP, YB-1 et ses variants d'épissage) des petites (100 kg pellet, en rouge) et grandes (20 kg pellet, en bleu) vésicules extracellulaires (EVs) isolées par centrifugation différentielle (DC) et des protéines caractéristiques de composants non-VEs (en orange) comme l'albumine séparées des EVs par chromatographie d'exclusion de taille (SEC) à partir des ventricules et du plasma traité à l'EDTA de rats néonataux. CD, cluster of differentiation; EDTA, acide éthylènediaminetétra-acétique; KDa, Kilodalton; MVP, major vault protein; YB-1, Y-box binding protein 1

MVP est détectée plus abondamment dans les petites que dans les grandes VEs-ventricules mais pas dans les VEs non-purifiées et les composants non-VEs (**Figure 45**), ce qui valide l'identification de cette protéine comme marqueur des petites VEs, suggérée par l'analyse protéomique des petites VEs issues de CFs et de CMS-H9c2. Cependant la spécificité de MVP ne semble pas se limiter aux VEs-ventricules car elle est aussi détectée dans les petites VEs-plasma

RESULTATS

(Figure 45). YB-1 ainsi que ses formes clivées sont aussi plus abondantes dans les VEs issues de ventricules et du plasma que dans les VEs non-purifiées et avec une abondance plus grande dans les petites VEs que dans les grandes VEs (Figure 45). Cela témoigne que les petites VEs ont une composition différente des grandes VEs et suggère leur implication dans le transport de microARNs.

Afin d'établir un profil protéique plus complet pour les VEs issues des ventricules et du plasma, une seconde analyse protéomique a été effectuée par LC-MS (Figure 46).

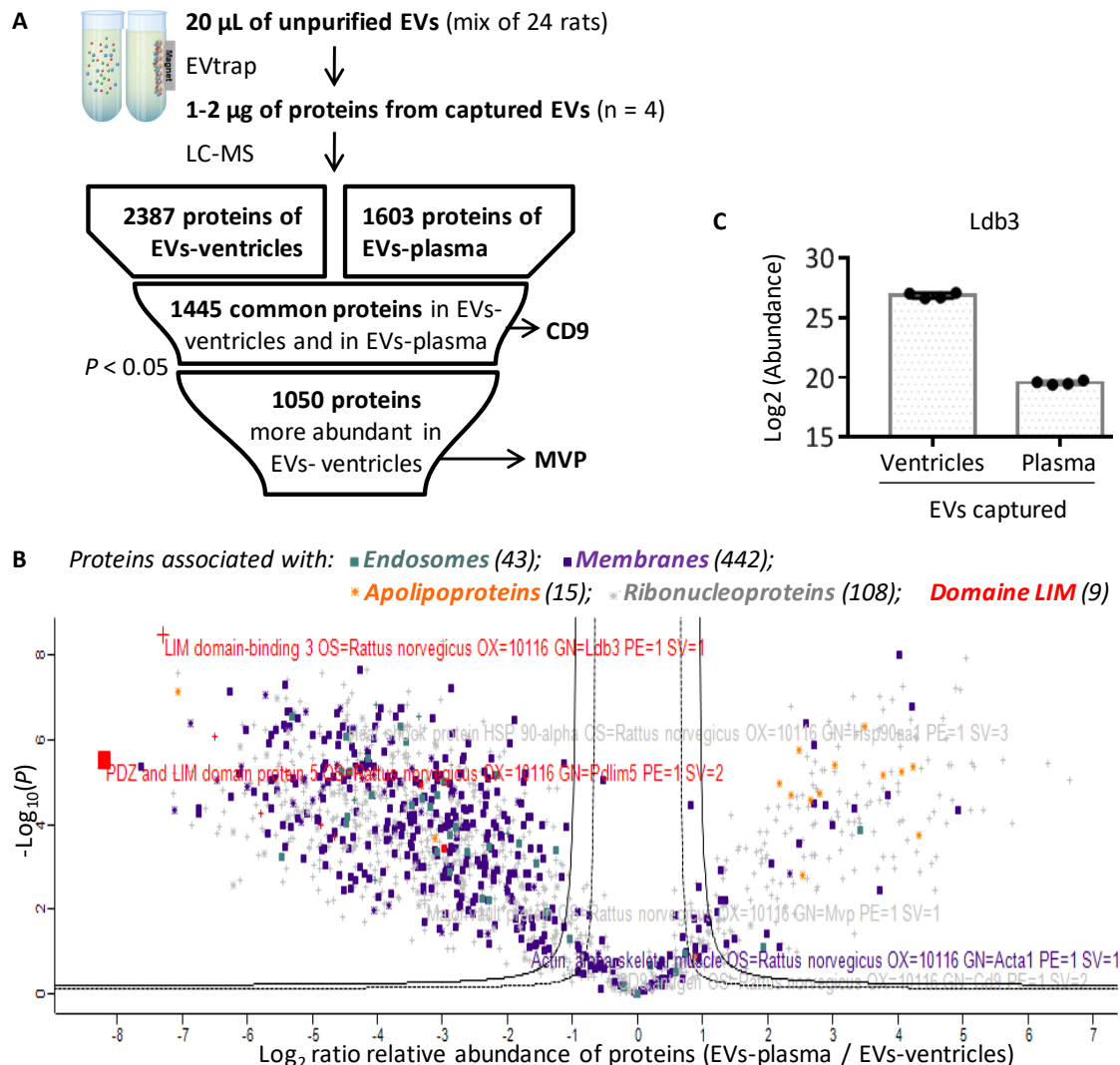


Figure 46: (A) Identification de protéines abondantes dans des vésicules extracellulaires (EVs) capturées par affinité lipidique à partir des ventricules et du plasma de rats néonataux et (B) sélection d'un marqueur abondant dans les EVs-ventricules. (C) La protéine 3 de liaison au domaine LIM (Ldb3) a été sélectionnée pour son abondance la plus significativement augmentée dans les VEs-ventricules comparées aux VEs-plasma (4 groupes avec n = 24 rats chacun). La capture des VEs par affinité lipidique a été effectuée par le système EVTRAP (*extracellular vesicles total recovery and purification*) et l'analyse protéomique a été effectuée par LC-MS (*liquid chromatography mass spectrometry*). Le volcano plot généré par Perseus v1.6.5 contient les protéines significativement identifiées dans au moins 3 échantillons sur 4 à la fois dans les VEs-ventricules et dans les VEs-plasma. Quatre termes *Gene Ontology* (GO) associés à des protéines

RESULTATS

des endosomes (43 carrés vert-gris), membranes (442 carrés violets), apolipoproteins (15 étoiles oranges), ribonucléoprotéines (108 étoiles grises) sont indiqués. Les protéines non-associées aux termes GO sont indiquées par des croix grises; celles en rouge font partie des 9 protéines à domaine LIM. Les courbes d'erreurs indiquent le seuil de significativité ($P < 0.05$). CD, *cluster of differentiation*; MVP, *major vault protein*; Ldb3, *LIM domain binding protein 3*.

Le système EVTRAP (Wu *et al.*, 2018) a permis de capturer à partir de 20 μ L de VEs non-purifiées, 1 à 2 μ g de protéines qui ont permis l'identification par LC-MS de 2387 protéines de VEs-ventricules et 1603 protéines de VEs-plasma (**Figure 46A**). Pour augmenter la probabilité d'identifier un/des marqueur(s) de VEs cardiaques présentes dans le plasma, les 1445 protéines communes, ayant une abondance significativement différente entre les VEs-ventricules et les VEs-plasma, ont été sélectionnées (**Figure 46A**). Parmi ces 1445 protéines, 1050 protéines sont plus abondantes dans les VEs-ventricules, ce qui suggère que ces protéines définissent un profil protéique spécifique des VEs-ventricules présentes dans le plasma (**Figure 46A**). La protéine avec l'abondance la plus élevée entre les VEs issues des ventricules par rapport aux VEs de plasma est la protéine 3 de liaison au domaine LIM (Ldb3) (**Figure 46B et 46 C**). Neuf autres protéines LIM ont une abondance plus élevée dans les VEs issues des ventricules par rapport aux VEs de plasma (**Figure 46B**), ce qui peut témoigner de la spécificité d'expression de ces protéines aux ventricules. Les protéines LIM sont d'ailleurs décrites pour leur spécificité au tissu cardiaque (Li, 2012) et leurs localisations endosomale et membranaire (Liu, 2019), ce qui en fait des marqueurs potentiels des membranes des VEs-ventricules pouvant être ciblés pour les capturer à partir du plasma. La détection de 15 apolipoprotéines dans les VEs issues des ventricules et avec une abondance plus grande dans les VEs issues du plasma (**Figure 46B**), témoigne d'une contamination possible des VEs capturées par EVTRAP par des apolipoprotéines, ce qui témoigne de l'importance de valider ces identifications par d'autres approches d'isolement des VEs. Enfin, comme avec l'analyse protéomique des VEs-CFs et des VEs-CMs-H9c2, de nombreuses ribonucléoprotéines ont été identifiées (**Figure 46B**), ce qui témoigne que ces protéines sont transportées par les VEs et/ou sont co-isolées lors de la capture EVTRAP.

Pour valider la spécificité de Ldb3 aux VEs-ventricules, son abondance a été recherchée dans le plasma, dans plusieurs organes de rats néonataux (incluant les ventricules) et dans les VEs et composants non-VEs issus des ventricules et du plasma (**Figure 47**).

RESULTATS

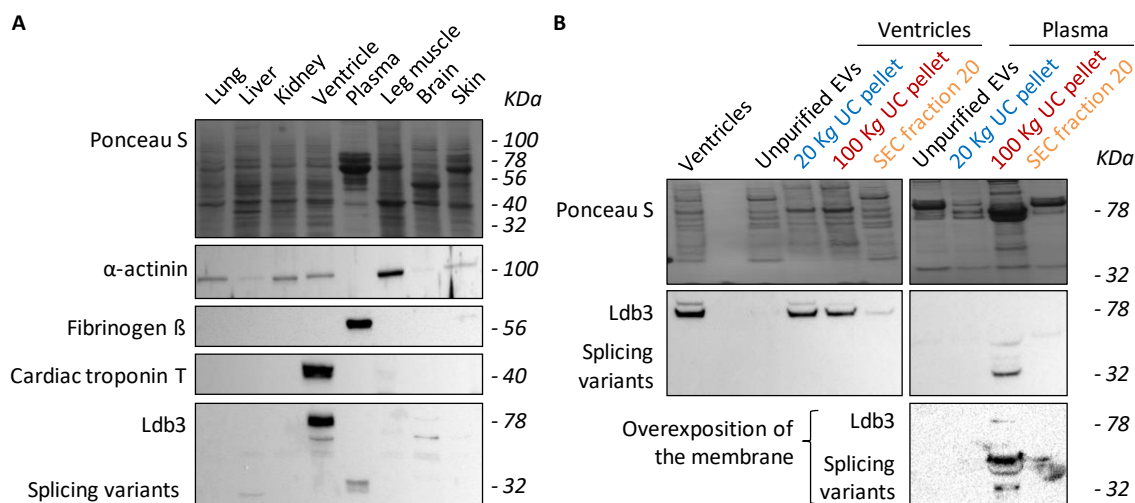


Figure 47: Comparaison de l'abondance de la protéine 3 de liaison au domaine LIM (Ldb3) (A) entre le plasma et différents organes (incluant les ventricules) issus de rats néonataux et (B) entre les vésicules extracellulaires (EVs) non-purifiées, les petites EVs (100 kg pellet, en rouge) et les grandes EVs (20 kg pellet, en bleu) isolées par centrifugation différentielle (DC) et des composants non-EVs (en orange) séparés des EVs par chromatographie d'exclusion de taille (SEC). Les protéines totales de chaque échantillon ont été détectées par coloration au rouge Ponceau (*Ponceau S*).

Le profil de détection des protéines issues du plasma et des organes analysés (poumon, foie, rein, ventricule, muscle de la jambe, cerveau et peau) par coloration au rouge Ponceau témoigne que des quantités comparables de protéines ont été déposées et que les différents organes étudiés ainsi que le plasma ont des compositions en protéines différentes (**Figure 47A**). L' α -actinine n'est pas détectée dans le plasma mais dans tous les organes analysés avec une abondance faible dans le foie et plus forte dans les muscles de la jambe (**Figure 47A**), ce qui témoigne que cette protéine du cytosquelette est exprimée dans les cellules issues de ces différents organes. La fibrinogène β est détectée spécifiquement dans le plasma et pas dans les organes analysés (**Figure 47A**), ce qui témoigne de la présence de plaquettes dans le plasma. Comme attendu, l'isoforme cardiaque de la troponine T est détectée spécifiquement dans les ventricules et pas dans les autres organes analysés (**Figure 47A**). L'absence de détection de cette protéine dans le plasma (**Figure 47A**) témoigne que cette protéine n'est pas libérée dans le plasma en conditions physiologiques et/ou que ses concentrations plasmatiques sont négligeables comparées à ses concentrations ventriculaires. L'isoforme principale de Ldb3 (à 78 kDa) est détectée abondamment dans les ventricules et en quantité négligeable dans les muscles de la jambe et dans le cerveau (**Figure 47A**); le variant d'épissage de Ldb3 (à 32 kDa) est détecté dans le plasma mais pas dans les ventricules (**Figure 47A**), ce qui suggère que l'isoforme de Ldb3 est un marqueur cardiaque alors que son variant d'épissage (à 32 kDa) est un marqueur plasmatique.

RESULTATS

Le profil de détection des protéines des VEs non-purifiées, petites et grandes et des composants non-EVs par coloration au rouge Ponceau témoigne que des quantités comparables de protéines ont été déposées et que les compositions en protéines sont différentes entre ces échantillons (**Figure 47B**); de manière intéressante, des profils similaires sont observés entre les petites et grandes VEs et entre les VEs non-purifiées et les composants non-VEs (**Figure 47B**), respectivement, ce qui témoigne que la majorité des protéines sécrétées avant l'isolement des VEs sont des protéines de composants non-VEs. La détection de l'isoforme principale de Ldb3 (78 kDa) dans les ventricules et les petites et grandes VEs de ventricules mais pas dans les VEs non-purifiées et en quantité négligeable dans les protéines sécrétées (**Figure 47B**) témoignent que l'isoforme principale de Ldb3 est majoritairement sécrétée par les petites et grandes VEs. La détection du variant d'épissage de Ldb3 (à 32 kDa) en abondance dans les petites VEs-plasma et pas dans les VEs non-purifiées, ni dans les grandes VEs et les composants non-VEs (**Figure 47B**) témoignent que le variant d'épissage de Ldb3 est majoritairement exprimé par les petites VEs-plasma. Ces résultats valident le potentiel de Ldb3 en tant que marqueur des VEs-ventricules et des petites VEs-plasma. La détection en condition de surexposition de la membrane (bande majoritaire à 32 kDa non quantifiable) de l'isoforme principale de Ldb3 (78 kDa) dans les petites VEs en abondance dans les petites VEs-plasma et pas dans les VEs non-purifiées, ni dans les grandes VEs et les composants non-VEs (**Figure 47B**) témoigne que l'isoforme principale de Ldb3 est majoritairement exprimée par les petites VEs-plasma, ce qui valide son potentiel de marqueur des petites VEs-plasma et suggère que l'isoforme principale de Ldb3 marque les petites VEs-ventricules libérées dans le plasma.

Ces résultats valident la seconde approche protéomique pour identifier des marqueurs des VEs-ventriculaires présents dans le plasma. Les VEs-plasma exprimant l'isoforme principale de Ldb3 pourraient être capturées spécifiquement dans la circulation si cette protéine a un site accessible par un anticorps à l'extérieur des VEs-ventricules. L'implication des petites VEs exprimant Ldb3 dans le transport de la signature en microARNs associée au RVG après l'IDM devra être confirmée. La quantification des éléments comme les microARNs transportés par les petites-VEs exprimant Ldb3 dans le plasma pourrait permettre de détecter des événements spécifiques des ventricules comme le RVG après l'IDM.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'évaluation diagnostique, pronostique et fonctionnelle des patients après l'IDM est un point essentiel pour stratifier les patients à risque et décider de la stratégie thérapeutique à adopter. Cette évaluation et les outils thérapeutiques actuels ne permettent pas de prévenir efficacement le RVG après l'IDM qui reste associé à la survenue de l'IC (Bauters *et al.*, 2017). Les objectifs de cette thèse étaient d'identifier une signature en microARNs pour prédire le RVG après l'IDM, de déterminer les mécanismes associés au RVG impliqués dans sa régulation et de déterminer l'implication des VEs cardiaques dans son transport.

I - Identification d'une signature en microARNs associée au RVG après l'IDM

Pour identifier une signature en microARNs associée au RVG après l'IDM, 2 approches de biologie des systèmes ont été utilisées (**Résultats I**). Ces 2 approches combinent les données omiques modulées par le RVG post-IDM avec des données d'interactions moléculaires disponibles dans des bases de données (Charrier & Cuveliez *et al.*, 2019).

I.1 - Pertinence des données omiques générées à partir des rats et des patients de l'étude REVE-2

Les données omiques utilisées pour identifier une signature en microARNs associée au RVG après l'IDM ont été générées à partir des rats post-IDM et des patients post-IDM de l'étude REVE-2. L'intérêt de ces rats et de ces patients est qu'ils ont été suivis pour leur RVG par des mesures répétées de leurs paramètres morphométriques et échocardiographiques après l'IDM. Puisque le RVG est un processus dynamique, des échantillons de VG et/ou de plasma ont été prélevés à différents temps après l'IDM.

Comme chez l'Homme, les rats post-IDM développent une dilatation progressive du VG caractéristique du RVG post-IDM (Mulder *et al.*, 1997). Contrairement à l'Homme où presque seuls les prélèvements de sang sont accessibles, les VG peuvent être prélevés chez les rats, ce qui permet d'accéder aux événements moléculaires associés au RVG post-IDM spécifiques du VG. Dans cette étude, seule la zone non-infarctée du VG des rats a été analysée; les événements moléculaires qui y sont détectés sont donc spécifiques du RVG dans la zone non-infarctée, qui diffèrent des événements moléculaires associés au RVG détectés dans la zone infarctée (Nagaraju *et al.*, 2017). Par ailleurs, les animaux utilisés dans cette étude sont des mâles âgés de 10 semaines seulement, ce qui permet d'améliorer leur survie après l'IDM mais correspond à un âge physiologique moins avancé que celui de la plupart des patients hommes ayant un premier IDM (généralement après 40 ans). De plus, alors que les patients post-IDM sont pris en charge

rapidement pour réduire au maximum la taille de l'IDM pour préserver la fonction cardiaque (reperfusion), les rats post-IDM utilisés dans cette étude ne sont jamais revascularisés; la ligature de leur artère coronaire est permanente, ce qui les empêche de récupérer leur fonction cardiaque mais favorise le RVG. Ainsi, en plus des différences liées à l'espèce et au sexe masculin uniquement, le RVG post-IDM de ces animaux ne correspond pas à ce qui est observé chez l'Homme en terme d'âge physiologique et de prise en charge thérapeutique. Dans cette étude, les données protéomiques issues du VG des rats post-IDM ont été générées 2 mois après l'IDM, lorsque le RVG est déjà fortement développé. De plus, ces données omiques ont été générées sans *a priori*: elles ne résultent pas de la mesure d'une sélection de variables déjà connues dans la littérature pour être modulées par des mécanismes associés avec le RVG, ce qui permet d'intégrer toutes les variables détectées comme étant modulées par le RVG dans ce modèle.

Les patients recrutés dans l'étude REVE-2 ont eu un IDM inaugural, massif (au moins 3 segments akinétiques) et antérieur (Fertin et al., 2010). Du fait de la sévérité élevée de leur IDM, les patients de l'étude REVE-2 ont un risque plus important de décompensation cardiaque que les patients post-IDM moins sévère, avec ou sans akinésie résiduelle (les plus fréquents) (Masci et al., 2011). Par ailleurs, 81% des patients l'étude REVE-2 sont des hommes. Ainsi, les événements moléculaires associés au RVG des patients de l'étude REVE-2 concernent d'abord le sexe masculin (Dubois-Deruy *et al.*, 2017) et résultent d'un IDM sévère qui pourrait réguler différemment certains mécanismes compensateurs de l'ischémie comme le système antioxydant (Dubois-Deruy *et al.*, 2017) et l'autophagie (Turkieh *et al.*, 2019). Dans cette étude, les données multi-omiques issues des échantillons de plasma des patients de l'étude REVE-2 ont été générées à différents temps après l'IDM: le jour de leur inclusion dans l'étude (3 à 7 jours après l'IDM), 1 mois, 3 mois et 1 an après l'IDM, ce qui permet d'accéder aux différents événements moléculaires successifs associés au RVG post-IDM (Pinet *et al.*, 2017). Dans le plasma, les variables spécifiques d'un événement cardiovasculaire sont souvent minoritaires donc difficiles à détecter: les peptides natriurétiques par exemple nécessitent des dosages ultrasensibles pour les détecter dans le plasma (Egerstedt *et al.*, 2019). Ainsi, les données omiques issues des patients post-IDM de l'étude REVE-2 ne résultent pas d'une approche sans *a priori* mais de la mesure plasmatique d'une sélection de 26 variables décrites pour être modulées par des mécanismes associés avec le RVG, ce qui assure une spécificité plus importante pour le RVG (Pinet *et al.*, 2017).

I.2 - Analyse des données omiques par la biologie des systèmes

La biologie des systèmes permet de combiner des données omiques avec des données disponibles dans des bases de connaissance pour identifier des signatures moléculaires avec une pertinence biologique pour un phénotype comme le RVG (Vilne & Schunkert, 2018).

Dans cette étude, 2 approches de biologie des systèmes ont été utilisées pour analyser les données omiques modulées par le RVG après l'IDM chez le rat et chez l'Homme, respectivement. Afin de réduire les données d'interactions moléculaires peu pertinentes, chaque type de données omiques a été combiné seulement avec les données expérimentalement validées ou prédites par au moins 3 bases de données publiques. Ces bases de données n'étant pas exhaustives, les 2 réseaux d'interactions moléculaires construits par ces 2 approches offrent nécessairement un aperçu représentatif mais incomplet et avec des *a priori* sur les mécanismes moléculaires impliqués dans le RVG après l'IDM. Les lacunes des bases de données tendent à être diminuées par le développement des techniques omiques à haut débit mais cela complexifie d'autant plus leur analyse (Cuvelliez *et al.*, 2019). L'analyse des termes *Gene Ontology* de ces 2 réseaux d'interactions moléculaires suggère que des événements moléculaires participant au RVG sont régulés comme le stress oxydant (Dubois-Deruy *et al.*, 2017; Pinet *et al.* 2017). Pour le réseau REVE-2, l'analyse des modules actifs aux différents temps de prélèvement du plasma (**Figure 23**) témoigne de l'évolution dynamique de ces mécanismes moléculaires (Pinet *et al.* 2017).

Parmi les molécules identifiées dans ces 2 réseaux d'interactions moléculaires, les microARNs ont une importance particulière car ils peuvent réguler l'expression d'un grand nombre de cibles plus ou moins impliquées dans le RVG post-IDM (Turkieh *et al.*, 2019); la dérégulation de leur expression peut être associée à l'apparition et à la progression de certains mécanismes moléculaires du RVG (Dutka *et al.*, 2019). De manière intéressante, la plupart des microARNs identifiés par ces deux réseaux ont déjà été associés à l'IC dans la littérature (Charrier & Cuvelliez *et al.*, 2019), ce qui peut témoigner de leur importance dans la survenue et la progression de l'IC. L'analyse de la centralité d'intermédiarité des 1310 molécules identifiées dans le réseau REVE-2 montre que 11 des 24 microARNs identifiés font partie des 3.2% molécules les plus centrales (**Figure 25**), ce qui confirme leur importance dans le réseau REVE-2 et le RVG (Charrier & Cuvelliez *et al.*, 2019). Pour autant, la spécificité au RVG des microARNs identifiés *in silico* doit être validée avec des critères de sélection et de validation expérimentale pour s'assurer de leur pertinence biologique *in vivo*.

L'analyse du réseau d'interaction protéines-microARNs construit à partir des données omiques issues du VG des rats 2 mois après l'IDM a permis d'identifier 13 microARNs dont seuls 3 d'entre

eux sont détectés modulés par le RVG post-IDM, à la fois dans le VG et dans le plasma des rats: les miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p (Charrier & Cuvellez *et al.*, 2019). Les critères de sélection de cette approche ont été basés sur l'hypothèse que la modulation de l'expression ventriculaire des microARNs augmentait la probabilité de les détecter modulés dans le plasma. Cependant les différences de modulation des 3 microARNs détectées entre les VG et le plasma (**Figure 22**) témoignent que les microARNs ont des profils d'expression différents entre le VG et le plasma, ce qui suggère que dans le plasma, ces 3 microARNs ont d'autres sources que le cœur et que leur sécrétion résulte de mécanismes actifs différents d'une simple diffusion extracellulaire. Bien que les microARNs circulants de rats ne reflètent pas toujours les microARNs circulants humains (Vetger *et al.*, 2017), l'association des miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p avec le RVG après l'IDM détectée dans le plasma des rats post-IDM a été validée dans le plasma des patients de l'étude REVE-2 (Dubois-Deruy *et al.*, 2017), ce qui montre que ces 3 microARNs définissent une signature conservée du RVG après l'IDM. L'analyse du réseau REVE-2, construit à partir des données omiques générées à partir des échantillons de plasma des patients de l'étude REVE-2, a permis d'identifier 24 microARNs dont 6 microARNs qui ont été sélectionnés pour leur forte centralité d'intermédiarité et leur activité au temps associés avec le RVG post-IDM: les miR-17-5p, miR-21-5p, miR-26b-5p, miR-222-3p, miR-335-5p et miR-375 (**Figure 25**) (Charrier & Cuvellez *et al.*, 2019). Les miR-21-5p et miR-222-3p ont été validés par la première approche (Dubois-Deruy *et al.*, 2017). Le miR-23a-3p n'a pas été sélectionné en dépit de sa centralité élevée car il n'est actif que 3-7 jours après l'IDM. Dans le VG des rats, les miR-17-5p et miR-375-3p ne sont pas modulés; par contre le miR-26b-5p diminue significativement et le miR-335-5p a une tendance à être augmenté 7 jours après l'IDM (**Figure 27**), ce qui témoigne de leur association avec le RVG et de leur conservation entre l'homme et le rat. La quantification des miR-17-5p, miR-26b-5p, miR-335-5p et miR-375 dans les échantillons de plasma des rats post-IDM et des patients post-IDM de l'étude REVE-2 sera nécessaire pour valider leur potentiel de biomarqueurs du RVG post-IDM.

L'analyse des données omiques modulées par le RVG après l'IDM par ces 2 approches de biologie des systèmes, a permis d'identifier un grand nombre de microARNs susceptibles d'être associés au RVG après l'IDM. Cependant, leur importance dans les réseaux d'interactions moléculaires construits à partir de ces données omiques semble hétérogène. Pour avoir un intérêt clinique en tant que biomarqueur ou cible thérapeutique, ces microARNs doivent être spécifiques du RVG; il convient donc de réduire le nombre de ces microARNs d'intérêt à un petit nombre de microARNs spécifiques du RVG. Le criblage des microARNs identifiés par ces réseaux par des critères *in silico* (centralité et modules actifs) et/ou *in vivo* (expression ventriculaire et plasmatique après l'IDM) a permis de sélectionner une signature de 7 microARNs (miR-21-5p,

miR-222-3p, miR-335-5p, miR-26b- 5p, miR-23a-3p, miR-375 et miR-17-5p) qui semble importante dans les événements moléculaires associés au RVG après l'IDM (Charrier & Cuvellez *et al.*, 2019). L'analyse de l'implication de ces événements dans la régulation des 7 microARNs pourrait permettre d'évaluer leur potentiel de biomarqueurs du RVG et de mettre en évidence de nouvelles stratégies thérapeutiques contre l'IC.

II - Association de la signature en microARNs avec les mécanismes associés au RVG après l'IDM

Pour déterminer comment la signature en microARNs pouvait être régulée par le RVG après l'IDM et comprendre son rôle dans la régulation des événements moléculaires ventriculaires associés au RVG, l'implication de 2 mécanismes cellulaires (la fibrose et l'hypertrophie) associés au RVG post-IDM, dans la modulation de l'expression de la signature en microARNs a été évaluée (**Résultats II**).

II.1 - Implication de la fibrose cardiaque dans la régulation de la signature en microARNs

La fibrose cardiaque est un mécanisme cellulaire associé au RVG post-IDM qui permet de cicatriser la zone infarctée mais peut aussi conduire à la rigidification du myocarde et à des dysfonctions diastoliques; une fibrose excessive est associée à un mauvais pronostic (Nielsen *et al.*, 2019). Les principaux effecteurs de la fibrose cardiaque sont les CFs qui s'activent et se transforment progressivement en myofibroblastes cardiaques pour produire plus de matrice extracellulaire (Tallquist *et al.*, 2017). L'implication des différents phénotypes des CFs dans la fibrose cardiaque reste méconnue.

In vitro, le phénotype des CFs est décrit pour acquérir au bout de 2 passages (P2) une morphologie d'étoile avec des fibres de stress, caractéristiques d'une transformation en myofibroblastes (Shinde *et al.*, 2017). Dans cette étude, le nombre de passages et le temps de culture des CFs de rats néonataux augmentent les 3 gènes d'activation de la fibrose cardiaque étudiés (CTGF, α -SMA et Col1) et diminuent l'expression des marqueurs cardiomyocytaires (SMM et desmine) (**Figure 29**), ce qui, respectivement, confirme que la culture en 1 dimension favorise la transformation des CFs en myofibroblastes et témoigne d'une réduction du nombre de CMs contaminant ces cultures. Ces 2 mécanismes cellulaires sont impliqués dans le RVG après l'IDM. Dans ces conditions, 5 des 7 microARNs de la signature associée au RVG après l'IDM sont modulés par l'activation de la fibrose cardiaque et/ou la réduction du nombre de CMs: les miR-21-5p et miR-222-3p sont augmentés tandis que les miR-17-5p, miR-26b-5p et miR-335-5p sont diminués (**Figure 30**), ce qui suggère que ces 2 mécanismes cellulaires régulent l'expression de la signature en microARNs.

Pour déterminer l'implication de la modulation de l'activation de la fibrose cardiaque et pas de la réduction du nombre de CMs dans la régulation de l'expression des 5 microARNs (miR-21-5p, miR-222-3p, miR-17-5p, miR-26b-5p et miR-335-5p), les CFs cultivés jusqu'au passage 1 (P1), ayant déjà un phénotype myofibroblastique mais presque dépourvus de CMs, ont été traités à l'ISO et à l'ANGII, deux stimulations impliquées dans la modulation de l'activation de la fibrose cardiaque (Sun *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2015; Campbell *et al.*, 1997; Staufenberger *et al.*, 2001). Dans cette étude, l'adhésion/prolifération des CFs P1 myofibroblastiques traités à l'ISO est modulée transitoirement (**Figures 33 et 34**), ce qui suggère que l'ISO favorise une modification du phénotype des CFs P1 myofibroblastiques. L'adhésion/prolifération des CFs a été détectée modulée en cas de stimulation neurohormonale par le TGF- β (Shinde *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019). Dans notre étude, la stimulation à l'ANGII, pourtant connue pour augmenter par la liaison à son récepteur AT1 la production endogène de TGF- β (Campbell *et al.*, 1997), n'entraîne pas de modulation de l'adhésion/prolifération des CFs P1 myofibroblastiques, ce qui suggère que l'augmentation de la production endogène de TGF- β par l'ANGII ne suffit pas à induire de modulation phénotypique des CFs P1.

L'analyse de l'état d'activation transcriptionnelle et traductionnelle des gènes étudiés de la fibrose pendant cette période transitoire de modulation de l'adhésion/prolifération des CFs P1 myofibroblastique confirme que le traitement à l'ISO module transitoirement leur phénotype (**Figure 33**); après cette période, une inactivation traductionnelle et une désactivation transcriptionnelle des gènes de la fibrose cardiaque sont détectées (**Figure 33**). Ces résultats témoignent que l'impédancemétrie permet de détecter les modulations traductionnelles mais pas transcriptionnelles des gènes activés par la stimulation à l'ISO lors de la fibrose cardiaque. Au contraire, les modulations transcriptionnelles et traductionnelles d'une partie seulement des gènes étudiés de la fibrose cardiaque détectées dans les CFs P1 traités à l'ANGII ne sont pas associées à des modifications morphologiques suffisantes pour être détectées par impédancemétrie (**Figure 34**). Ainsi, les traitements à l'ISO et à l'ANGII ont des effets pro- et anti-fibrotiques différents selon le temps de traitement et impliquent des voies de signalisation différentes en fonction du traitement. La correspondance entre le profil d'adhésion/prolifération et le profil protéique des gènes de la fibrose des CFs P1 témoigne de l'intérêt de l'impédancemétrie pour identifier des temps de traitement associés à des modulations du phénotype myofibroblastique.

La désactivation transcriptionnelle et/ou traductionnelle de la fibrose cardiaque observée après 20 h de traitement à l'ISO et à l'ANGII ne permet pas de retrouver les niveaux d'expression des gènes pro-fibrotiques détectés dans les CFs T0 (**Figures 33 et 34**), ce qui suggère que les CFs

P1 traités pendant 20 h à l'ISO et à l'ANGII présentent toujours un phénotype myofibroblastique. La désactivation transcriptionnelle et/ou traductionnelle de la fibrose cardiaque détectée dans des CF P1 myofibroblastiques traités pendant 20 h à l'ISO et à l'ANGII (**Figures 33 et 34**) pourrait impliquer l'inhibition des récepteurs au TGF- β . En effet, l'analyse du transcriptome des CFs transformés en myofibroblastes par la culture et traités ou non par un inhibiteur des récepteurs au TGF- β montre que les CFs traités par cet inhibiteur expriment moins les gènes de la fibrose, de l'adhésion et de la voie de signalisation dépendante du TGF- β , que les CFs non-traités (Driesen *et al.*, 2014).

L'analyse de l'expression des 5 microARNs dans les CFs P1 myofibroblastiques associés ou non à une désactivation transcriptionnelle et/ou traductionnelle de la fibrose cardiaque montre que les miR-17-5p et miR-335-5p augmentent dans les CFs traités pendant 20 h à l'ISO et à l'ANGII comparés aux CFs P1 contrôles (**Figure 35**). L'expression du miR-26b-5p est augmentée dans les CFs P1 myofibroblastiques traités pendant 20 h à l'ISO mais pas à l'ANGII (**Figure 35**), ce qui témoigne que son expression est régulée par la voie de signalisation dépendante de l'ISO et pas de l'ANGII. De manière intéressante, une autre étude menée sur des CFs de souris néonatales traités ou non à l'ANGII montre que la stimulation à l'ANGII augmente l'expression de l'ARN circulaire circRNA_000203 qui est capable de séquestrer directement le miR-26b-5p (Tang *et al.*, 2017), ce qui suggère que la stimulation à l'ANGII inhibe le miR-26b-5p.

L'augmentation des miR-17-5p, miR-26b-5p et miR-335-5p en cas de désactivation transcriptionnelle et/ou traductionnelle de la fibrose cardiaque (**Figure 35**) et, au contraire, la diminution de leur expression lors de l'activation de la fibrose cardiaque induit par la culture (**Figure 30**) confirment que la modulation de l'activation de la fibrose cardiaque régule spécifiquement l'expression de ces 3 microARNs. L'absence de modulation des miR-21-5p et miR-222-3p dans ces conditions (**Figure 30**) suggère que leur augmentation dans les CFs lors de l'activation de la fibrose cardiaque induit par la culture est soit: (i) indépendante de la modulation de la fibrose cardiaque mais dépendante de la contamination en CMs détectée dans les CFs avant P1; soit (ii) dépendante de la modulation de la fibrose cardiaque mais indépendamment des voies de signalisation activées par l'ISO et l'ANGII et probablement dépendante des voies activées par les contraintes mécaniques liées à la mise en culture.

II.2 - Implication de l'hypertrophie par rapport à la fibrose dans la régulation de la signature en microARNs

L'hypertrophie des CMs participe aussi à la régulation de l'expression de la signature associée au RVG après l'IDM. En effet, nous avons montré que les CMs hypertrophiés après une

stimulation à l'ANGII pendant 24 h ont une expression diminuée des miR-21-5p et miR-23a-3p comparée au CMs contrôles; d'autre part, les CMs hypertrophiés après une stimulation à l'ISO pendant 48 h ont une expression diminuée du miR-222-3p comparée au CMs contrôles (**Figure 37**). Ces résultats suggèrent que le profil de modulation de la signature en microARNs par l'hypertrophie dans les CMs change selon le traitement à l'ISO et à l'ANGII et le temps de traitement. La diminution du miR-222-3p dans les CMs hypertrophiés après une stimulation à l'ISO pendant 48 h suggère son implication dans l'augmentation de sa cible directe SOD2 après 48 h mais pas après 24 h de traitement à l'ISO (Dubois-Deruy *et al.*, 2017). La quantification des 4 autres microARNs de la signature dans les CMs traités ou non à l'ISO et à l'ANGII sera réalisée pour vérifier si l'hypertrophie des CMs participe aussi à la régulation de leur expression.

Le profil d'expression des miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p dans les VG des rats après un IDM comparé au rats contrôles (**Figure 22**) correspond à leur profil d'expression dans les CFs myofibroblastiques par rapport aux CFs contrôles (**Figures 30 et 35**) mais ne correspond pas à leur profil d'expression dans les CMs hypertrophiés par rapport aux CMs contrôles (**Figure 37**), ce qui suggère que la modulation ventriculaire de la signature en microARNs par le RVG reflète d'abord la modulation de l'activation de la fibrose cardiaque dans les CFs mais pas la modulation de l'hypertrophie des CMs.

II.3 - Fonction des miR-21-5p, miR-222-3p, miR-17-5p, miR-26b-5p et miR-335-5p dans la fibrose

Puisque parmi les 7 microARNs de la signature associée au RVG après l'IDM, 5 microARNs sont augmentés (miR-21-5p et miR-222-3p) et diminués (miR-17-5p, miR-26b-5p et miR-335-5p) par l'activation de la fibrose cardiaque et/ou la réduction du nombre de CMs, les conséquences potentielles de leur modulation d'expression dans la régulation de ces mécanismes ont été étudiées. D'après l'analyse des voies KEGG significativement enrichies en gènes cibles des 5 microARNs expérimentalement validés disponibles dans la base de données TarBase (**Figure 31**), la voie de dégradation des lysines qui participe au remodelage de la matrice extracellulaire (Nagaraju *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2019) serait notamment régulée communément par les miR-21-5p et miR-222-3p tandis que la voie de signalisation HIPPO dont l'activation inhiberait l'activation de la fibrose (Xiao *et al.*, 2018), serait notamment régulée communément par les miR-21-5p, miR-17-5p, miR-26b-5p et miR-335-5p.

Les microARNs peuvent réguler l'expression des gènes soit en interagissant directement avec leur ARN messager (inhibition directe de l'expression d'un gène); soit en interagissant avec un ARN messager codant pour un régulateur de leur expression (inhibition ou augmentation de l'expression d'un gène), les corrélations négatives et positives entre leurs expressions peuvent

indiquer une interaction directe et indirecte respectivement. Pour s'assurer qu'une interaction est directe entre un microARNs et l'ARN messager d'un gène cible, leurs expressions doivent être corrélées négativement et la séquence cible du microARNs doit être présente dans la région 3'UTR de ce gène. Dans cette étude, l'expression du miR-21-5p, déjà connue pour son implication dans la fibrose (**Introduction II.2.3**), corrèle positivement avec l'expression des gènes de la fibrose étudiés dans les VG des rats après l'IDM et dans les CFs non myofibroblastiques (avant P1) (**Figure 36A**), ce qui valide la pertinence de ces résultats. De plus l'expression du miR-26b-5p semble corrélée négativement avec l'expression du proCol1 à la fois dans les VG des rats après l'IDM et dans les CFs lors de la modulation de l'activation de la fibrose cardiaque (**Figure 36A**), ce qui suggère que le miR-26b-5p est un inhibiteur de l'expression de proCol1. Par ailleurs, 5 des ARNs messagers codants pour différents types de collagènes (incluant proCol1) qui composent la matrice fibreuse présentent une séquence cible du miR-26b-5p dans la région 3'UTR conservée chez l'Homme (**Figure 36B**), ce qui témoigne que le miR-26b-5p peut être un régulateur direct de l'expression des collagènes. De manière intéressante, une autre étude menée sur des CFs de souris néonatales a montré que le miR-26b-5p interagit directement avec ses séquences cibles présentes dans la région 3'UTR de la proCol1 mais aussi de CTGF ce qui inhibe l'expression de ces gènes mais aussi celle de l' α -SMA et de la Col3 (Tang *et al.*, 2017). D'autres études ont montré que le miR-26b-5p régule directement l'expression de CTGF dans les cellules d'ostéocarcinome (Duan *et al.*, 2015) et de cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires (Wang *et al.*, 2016). Ces données de la littérature et les résultats obtenus pendant cette thèse (**Résultats II.2**) témoignent de l'implication du miR-26b-5p dans la régulation de l'activation de la fibrose cardiaque et le RVG après l'IDM.

Certaines études ont montré que l'utilisation de mimic de microARNs ayant un rôle protecteur après l'IDM peut avoir un potentiel thérapeutique; par exemple le miR-19a/19b qui est capable de stimuler la prolifération des CMs de rats néonataux, protège aussi de l'IDM chez la souris post-IDM après son injection intracardiaque ou systémique en utilisant un adénovirus (Gao *et al.*, 2019). L'utilisation de mimic du miR-26b-5p et/ou de molécules capables d'inhiber l'ARN circulaire circRNA_000203 à l'origine de sa séquestration, sont des pistes thérapeutiques potentielles pour réduire la fibrose cardiaque. Toutefois, les nombreuses séquences cibles du miR-26b-5p impliquent nécessairement des effets indésirables qu'il faudra identifier.

III - Implication des VEs cardiaques dans le transport de la signature en microARNs

La signature en microARNs est détectée au moins partiellement dans le plasma de rats et d'Homme (Charrier *et al.*, 2019), ce qui témoigne qu'elle est protégée de la dégradation par des

transporteurs extracellulaires. Parmi ces transporteurs, les VEs cardiaques ont suscité un intérêt croissant ces dernières années notamment pour leur implication dans des mécanismes physiopathologiques après l'IDM comme l'hypertrophie des cardiomyocytes (Bang *et al.*, 2014) et l'inflammation (Loyer *et al.*, 2018). Dans cette étude, nous avons montré l'implication des VEs cardiaques dans le transport de la signature en microARNs et nous avons cherché à caractériser ces VEs.

III.1 - Diversité des VEs issues des CFs, des CMs, des CMs-H9c2 et des ventricules de rats

Nous avons montré que l'intérêt des CFs et des CMs-H9c2 comparés aux CMs est leur production élevée de VEs cardiaques en cas de privation en sérum. La centrifugation différentielle des milieux de culture conditionnés des CFs et des CMs-H9c2 permet d'isoler des populations de VEs plus polydisperses en taille dans le culot obtenu à 20 000 *g* (grande-VEs) que dans le culot obtenu à 100 000 *g* (petites VEs) (**Figure 39**). De plus, les petites VEs issues de CFs et de CMs-H9c2 sont détectées en concentration environ 10 fois plus importante que les grandes VEs (**Figure 39**). La faible hétérogénéité de taille des petites VEs issues de CFs et de CMs-H9c2 comparée aux grandes VEs ainsi que leur quantité plus importante suggèrent que les petites VEs issues de CFs et de CMs-H9c2 contiennent moins de sous-types différents de VEs que les grandes VEs. De plus, les petites VEs-CFs semblent plus petites que les petites VEs-CMs-H9c2 (**Figure 39**), ce qui témoigne de la diversité des sous-types de petites VEs selon l'origine cellulaire. La caractérisation de la morphologie des VEs produites par les CFs, les CMs et les CMs-H9c2 devra être répliquée pour confirmer leur hétérogénéité.

Nous avons montré que les petites VEs issues des CFs contenaient moins d'ARNs que les petites VEs issues des CMs-H9c2 (**Figure 40**), ce qui témoigne de leur différence. Les miR-21-5p, miR-23a-3p et miR-222-3p sont détectés dans les 2 types de petites VEs (**Figure 40**), ce qui confirme leur implication commune dans le transport de la signature. La variabilité d'expression des 3 microARNs détectée dans ces petites VEs témoigne de leur diversité et de la nécessité d'en isoler un sous-type pour réduire cette variabilité d'expression de la signature en microARNs. La détection de MVP et de YB-1 dans ces petites VEs pourrait indiquer leur implication dans leur chargement en microARNs.

La recherche des protéines impliquées dans la biogénèse des VEs issues de CFs et de CMs-H9c2 (**Figure 41**) a montré que ces petites VEs expriment CD63 non-glycosylée, CD81 mais pas CD9, pourtant exprimée dans les cellules, ce qui confirme une composition particulière. L'absence de CD9 dans les petites VEs issues des CFs et des CMs-H9c2 pourrait être liée à la privation de sérum car les petites VEs issues des CFs conditionnés dans du milieu avec du sérum déplété en VEs (Lyu

et al., 2015) et des CMs-H9c2 privés en sérum et en glucose (Garcia *et al.*, 2015) expriment CD9. Cette variabilité d'expression de CD9 dans les petites VEs issues de CFs et CMs-H9c2 témoigne que le mécanisme de biogénèse des petites VEs est modulé différemment selon le stress cellulaire.

Les VEs cardiaques ne comprennent pas seulement les VEs issues des CFs et des CMs. De plus, les faibles quantités de petites VEs produites par ces cellules *in vitro* rendent difficile l'analyse des autres sous-types de VEs comme les grandes VEs. Pour obtenir les petites et grandes VEs issues de tous les types cellulaires cardiaques, les ventricules des rats néonataux ont été utilisés (Loyer *et al.*, 2018). Le plasma des animaux, qui contient des VEs cardiaques et non-cardiaques a été utilisé comme contrôle. Comme pour les VEs issues de CFs et de CMs-H9c2, les petites VEs issues de ventricules et du plasma isolées par centrifugation différentielle sont moins polydisperses en taille que les grandes VEs (**Figure 44**). Par ailleurs, la polydispersion de taille et la concentration des VEs issues de ventricules et du plasma sont plus importantes que celles des VEs issues de CFs et de CMs-H9c2, ce qui indique que les sous-types de VEs isolés de ventricules et du plasma sont plus nombreux que les sous-types de VEs isolés par les CFs et de CMs-H9c2 conditionnés.

La diversité de taille et de composition des VEs cardiaques témoigne de leur hétérogénéité et de l'importance de les caractériser pour identifier les sous-types de VEs cardiaques impliqués dans le transport de la signature en microARNs.

III.2 - Identification des protéines exprimées par les VEs cardiaques isolées

Pour identifier des marqueurs capables de distinguer les VEs cardiaques des autres VEs et aussi des particules non VEs et ainsi s'assurer de l'implication des VEs cardiaques dans le transport de la signature en microARNs, la composition en protéines des VEs cardiaques a été analysée par 2 approches protéomiques.

La première approche protéomique (**Figures 42 et 43**), basée sur l'analyse des protéines des petites VEs issues des CFs et de CMs-H9c2, a permis d'identifier 51 et 8 protéines, respectivement, à partir d'un volume de milieu conditionné de 40 mL et d'une quantité en protéine de 25 µg et 75 µg, respectivement. Parmi elles, MVP est commune et pourrait être impliquée dans le chargement des petites VEs exprimant CD63 en microARNs (Teng *et al.*, 2017). La détection de MVP dans les VEs issues de ventricules et du plasma mais pas dans les composants non-VEs séparés par SEC, semble confirmer que MVP est un marqueur des VEs (**Figure 45**). Cependant, d'autres études menées sur des cellules cancéreuses de colon et de glioblastomes suggèrent que MVP pourrait ne pas être dans les VEs cardiaques: après une séparation par centrifugation en gradient de densité, MVP est détectée dans la fraction non-VEs; de plus MVP n'est pas détectée

dans les VEs immunoprécipitées par CD63, CD9 et CD81 (Jeppesen *et al.*, 2019). MVP est aussi le composant principal de structures protéiques, impliquées dans le transport extracellulaire des ARNs, appelées voûtes qui sont larges de 41 nm et hautes de 72.5 nm (Rome & Kickhoefer, 2013), ce qui suggère qu'elles peuvent être co-précipitées avec les VEs par centrifugation différentielle. L'implication de MVP dans le transport de la signature en microARNs n'est pas connue et pourra être analysée.

La seconde approche protéomique (**Figure 46**), basée sur l'analyse des protéines des VEs issues de ventricules et du plasma capturées par affinité lipidique, a permis d'identifier et de quantifier 2387 et 1603 protéines, respectivement, à partir d'un volume d'échantillon de 20 μ L et d'une quantité en protéine de 1 à 2 μ g seulement. Cette seconde approche est plus rapide, nécessite moins d'échantillon et permet d'identifier plus de protéines que la première approche. Parmi les protéines identifiées, la détection de CD9 confirme que les ventricules sécrètent des VEs exprimant cette protéine; la détection de MVP quant à elle suggère soit la capture de sous-types de VEs exprimant cette protéine, soit la capture de particules non-VEs comme les voûtes. D'autres composants non-VEs potentiels semblent avoir été capturés comme les 15 apolipoprotéines, ce qui témoigne de l'importance de valider l'identification de ces protéines par d'autres techniques d'isolement des VEs. Cette seconde approche permet aussi de comparer quantitativement l'expression des protéines communes, ce qui a permis la sélection des protéines identifiées les plus abondantes dans les VEs-ventricules qui sont tout de même détectées dans les VEs-plasma. La protéine identifiée la plus significativement abondante dans les VEs-ventricules comparée aux VEs-plasma est Ldb3, dont l'isoforme principale est détectée dans les ventricules et le plasma mais pas dans les autres organes analysés (**Figure 47**), ce qui confirme sa spécificité cardiaque et l'existence de sa forme sécrétée dans le plasma. La détection de Ldb3 dans les petites et grandes VEs issues de ventricules et les petites VEs-plasma mais pas dans les composants non-VEs séparées par SEC semble valider sa spécificité aux VEs-ventricules et suggère que les grandes VEs-ventricules exprimant cette protéine ne sont pas détectées dans le plasma.

Puisque des voûtes et d'autres composants non-VEs de taille similaire aux VEs peuvent contaminer les VEs isolées par centrifugation différentielle, l'identification de MVP et Ldb3 comme des marqueurs des VEs ou des composants non-VEs devra être validée par centrifugation en gradient de densité et/ou par immunoprécipitation. L'origine cellulaire cardiaque des VEs exprimant Ldb3 devra être recherchée et leur implication ainsi que celles des structures exprimant MVP dans le transport de la signature en microARNs associée au RVG après l'IDM devront être analysées.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Pour conclure, la caractérisation des VEs cardiaques a permis d'identifier des sous-types de VEs qui pourraient participer au transport de la signature en microARNs dans le plasma, dont 1 sous-type de VEs produit potentiellement exclusivement par le cœur, ce qui pourrait permettre de détecter dans le plasma les événements moléculaires spécifiques au RVG après l'IDM pour prédire l'IC.

REFERENCES

- Abel ED, Doenst T. Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2011;90(2):234-42.
- Adam O, Lohfelm B, Thum T, et al. Role of miR-21 in the pathogenesis of atrial fibrosis. *Basic Res Cardiol*. 2012;107(5):278.
- Alam SG, Zhang Q, Prasad N, Li Y, Chamala S, Kuchibhotla R, et al. The mammalian LINC complex regulates genome transcriptional responses to substrate rigidity. *Sci Rep*. 2016;6:38063.
- Alarcon CR, Lee H, Goodarzi H, Halberg N, Tavazoie SF. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*. 2015;519(7544):482-485.
- Alfaro MP, Deskins DL, Wallus M, et al. A physiological role for connective tissue growth factor in early wound healing. *Lab Invest*. 2013;93(1):81-95.
- Allo M, Agirre E, Bessonov S, et al. Argonaute-1 binds transcriptional enhancers and controls constitutive and alternative splicing in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(44):15622-15629.
- Andersen HR, Falk E, Nielsen D. Right ventricular infarction: frequency, size and topography in coronary heart disease: a prospective study comprising 107 consecutive autopsies from a coronary care unit. *J Am Coll Cardiol*. 1987;10(6):1223-32.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*. 2000;25(1):25-9.
- Azuaje FJ, Dewey FE, Brutsaert DL, Devaux Y, Ashley EA, Wagner DR. Systems-based approaches to cardiovascular biomarker discovery. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5(3):360-7.
- Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, et al. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol*. 2012;14(7):677-685.
- Bang C, Batkai S, Dangwal S, et al. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest*. 2014;124(5):2136-2146.
- Barman B, Bhattacharyya SN. mRNA Targeting to Endoplasmic Reticulum Precedes Ago Protein Interaction and MicroRNA (miRNA)-mediated Translation Repression in Mammalian Cells. *J Biol Chem*. 2015;290(41):24650-24656.
- Bauters C, Dubois E, Porouchani S, et al. Long-term prognostic impact of left ventricular remodeling after a first myocardial infarction in modern clinical practice. *PLoS One*. 2017;12(11):e0188884.
- Bauters C, Kumarswamy R, Holzmann A, et al. Circulating miR-133a and miR-423-5p fail as biomarkers for left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2013;168(3):1837-1840.
- Bayoumi AS, Teoh JP, Aonuma T, et al. MicroRNA-532 protects the heart in acute myocardial infarction, and represses prss23, a positive regulator of endothelial-to-mesenchymal transition. *Cardiovasc Res*. 2017;113(13):1603-1614.

REFERENCES

- Beer KB, Rivas-Castillo J, Kuhn K, et al. Extracellular vesicle budding is inhibited by redundant regulators of TAT-5 flippase localization and phospholipid asymmetry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(6):E1127-e1136.
- Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2019;139(10):e56-e528.
- Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*. 2009;324(5923):98-102.
- Bernardi P, Rasola A, Forte M, Lippe G. The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. *Physiol Rev*. 2015;95(4):1111-55.
- Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther*. 2010;128(1):191-227.
- Bie ZD, Sun LY, Geng CL, et al. MiR-125b regulates SFRP5 expression to promote growth and activation of cardiac fibroblasts. *Cell Biol Int*. 2016;40(11):1224-1234.
- Bissig C, Gruenberg J. ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland. *Trends Cell Biol*. 2014;24(1):19-25.
- Bonifacino JS, Glick BS. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*. 2004;116(2):153-166.
- Bose M, Barman B, Goswami A, Bhattacharyya SN. Spatiotemporal Uncoupling of MicroRNA-Mediated Translational Repression and Target RNA Degradation Controls MicroRNP Recycling in Mammalian Cells. *Mol Cell Biol*. 2017;37(4).
- Boulanger CM, Loyer X, Rautou PE, Amabile N. Extracellular vesicles in coronary artery disease. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(5):259-272.
- Brouwers FP, van Gilst WH, Damman K, van den Berg MP, Gansevoort RT, Bakker SJ, et al. Clinical risk stratification optimizes value of biomarkers to predict new-onset heart failure in a community-based cohort. *Circ Heart Fail*. 2014;7(5):723-31.
- Bulluck H, Go YY, Crimi G, Ludman AJ, Rosmini S, Abdel-Gadir A, et al. Defining left ventricular remodeling following acute ST-segment elevation myocardial infarction using cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2017;19(1):26.
- Buttrick PM, Kaplan M, Leinwand LA, Scheuer J. Alterations in gene expression in the rat heart after chronic pathological and physiological loads. *J Mol Cell Cardiol*. 1994;26(1):61-7.
- Campbell SE, Katwa LC. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29(7):1947-58.
- Lenk E, van der Schaar M, Yoon J, Manfrini O, Vasiljevic Z, Vavlukis M, et al. Sex-Related Differences in Heart Failure After ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74(19):2379-89.
- Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008;18(10):997-1006.

REFERENCES

- Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 2005;436(7051):740-744.
- Cheng Y, Liu X, Zhang S, Lin Y, Yang J, Zhang C. MicroRNA-21 protects against the H₂O₂-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;47(1):5-14.
- Chi SW, Zang JB, Mele A, Darnell RB. Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature*. 2009;460(7254):479-486.
- Chiriaco MS, Bianco M, Nigro A, et al. Lab-on-Chip for Exosomes and Microvesicles Detection and Characterization. *Sensors (Basel)*. 2018;18(10).
- Cieniewski-Bernard C, Mulder P, Henry JP, et al. Proteomic analysis of left ventricular remodeling in an experimental model of heart failure. *J Proteome Res*. 2008;7(11):5004-5016.
- Clark PM, Loher P, Quann K, Brody J, Londin ER, Rigoutsos I. Argonaute CLIP-Seq reveals miRNA targetome diversity across tissue types. *Sci Rep*. 2014;4:5947.
- Cokkinos DV, Belogiannas C. Left Ventricular Remodelling: A Problem in Search of Solutions. *Eur Cardiol*. 2016;11(1):29-35.
- Colombo M, Moita C, van Niel G, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 24):5553-5565.
- Connor DE, Exner T, Ma DD, Joseph JE. The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb Haemost*. 2010;103(5):1044-1052.
- Cortez-Dias N, Costa MC, Carrilho-Ferreira P, et al. Circulating miR-122-5p/miR-133b Ratio Is a Specific Early Prognostic Biomarker in Acute Myocardial Infarction. *Circ J*. 2016;80(10):2183-2191.
- Cung TT, Morel O, Cayla G, Rioufol G, Garcia-Dorado D, Angoulvant D, et al. Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 2015;373(11):1021-31.
- Cuvelliez M, Vandewalle V, Brunin M, et al. Circulating proteomic signature of early death in heart failure patients with reduced ejection fraction. *Sci Rep*. 2019;9(1):19202.
- Davidson SM, Ferdinandy P, Andreadou I, Botker HE, Heusch G, Ibanez B, et al. Multitarget Strategies to Reduce Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(1):89-99.
- de Boer RA, Daniels LB, Maisel AS, Januzzi JL, Jr. State of the Art: Newer biomarkers in heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2015;17(6):559-69.
- de Bold AJ, Bruneau BG, Kuroski de Bold ML. Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart. *Cardiovasc Res*. 1996;31(1):7-18.
- de Rie D, Abugessaisa I, Alam T, et al. An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nat Biotechnol*. 2017;35(9):872-878.
- Deatherage BL, Cookson BT. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun*. 2012;80(6):1948-1957.

REFERENCES

- Del Re DP, Amgalan D, Linkermann A, Liu Q, Kitsis RN. Fundamental Mechanisms of Regulated Cell Death and Implications for Heart Disease. *Physiol Rev.* 2019;99(4):1765-817.
- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 2004;432(7014):231-235.
- Denzer K, van Eijk M, Kleijmeer MJ, Jakobson E, de Groot C, Geuze HJ. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol.* 2000;165(3):1259-1265.
- Desjarlais M, Dussault S, Dhahri W, Mathieu R, Rivard A. MicroRNA-150 Modulates Ischemia-Induced Neovascularization in Atherosclerotic Conditions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(5):900-908.
- Detzer A, Engel C, Wunsche W, Sczakiel G. Cell stress is related to re-localization of Argonaute 2 and to decreased RNA interference in human cells. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(7):2727-2741.
- Devaux Y, Vausort M, McCann GP, et al. A panel of 4 microRNAs facilitates the prediction of left ventricular contractility after acute myocardial infarction. *PLoS One.* 2013;8(8):e70644.
- Devaux Y, Vausort M, McCann GP, et al. MicroRNA-150: a novel marker of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Genet.* 2013;6(3):290-298.
- Dias MV, Teixeira BL, Rodrigues BR, et al. PRNP/prion protein regulates the secretion of exosomes modulating CAV1/caveolin-1-suppressed autophagy. *Autophagy.* 2016;12(11):2113-2128.
- Dirkx E, da Costa Martins PA, De Windt LJ. Regulation of fetal gene expression in heart failure. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(12):2414-24.
- Dorn LE, Petrosino JM, Wright P, Accornero F. CTGF/CCN2 is an autocrine regulator of cardiac fibrosis. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;121:205-211.
- Driesen RB, Nagaraju CK, Abi-Char J, et al. Reversible and irreversible differentiation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 2014;101(3):411-422.
- Duan G, Ren C, Zhang Y, Feng S. MicroRNA-26b inhibits metastasis of osteosarcoma via targeting CTGF and Smad1. *Tumour Biol.* 2015;36(8):6201-6209.
- Dubois E, Richard V, Mulder P, et al. Decreased serine207 phosphorylation of troponin T as a biomarker for left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2011;32(1):115-123.
- Dubois-Deruy E, Cuvelliez M, Fiedler J, et al. MicroRNAs regulating superoxide dismutase 2 are new circulating biomarkers of heart failure. *Sci Rep.* 2017;7(1):14747.
- Dutka M, Bobinski R, Korbecki J. The relevance of microRNA in post-infarction left ventricular remodelling and heart failure. *Heart Fail Rev.* 2019;24(4):575-586.
- Edgar JR, Manna PT, Nishimura S, Banting G, Robinson MS. Tetherin is an exosomal tether. *Elife.* 2016;5.
- Egerstedt A, Berntsson J, Smith ML, Gidlof O, Nilsson R, Benson M, et al. Profiling of the plasma proteome across different stages of human heart failure. *Nat Commun.* 2019;10(1):5830.

REFERENCES

- Eitan E, Suire C, Zhang S, Mattson MP. Impact of lysosome status on extracellular vesicle content and release. *Ageing Res Rev.* 2016;32:65-74.
- Enyedi B, Niethammer P. Nuclear membrane stretch and its role in mechanotransduction. *Nucleus.* 2017;8(2):156-61.
- Ervasti JM, Campbell KP. Dystrophin-associated glycoproteins: their possible roles in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy. *Mol Cell Biol Hum Dis Ser.* 1993;3:139-66.
- Eschaliier R, Fertin M, Fay R, et al. Extracellular matrix turnover biomarkers predict long-term left ventricular remodeling after myocardial infarction: insights from the REVE-2 study. *Circ Heart Fail.* 2013;6(6):1199-1205.
- Fader CM, Sanchez DG, Mestre MB, Colombo MI. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793(12):1901-1916.
- Fang L, Ellims AH, Moore XL, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for diffuse myocardial fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Transl Med.* 2015;13:314.
- Feng D, Zhao WL, Ye YY, et al. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic.* 2010;11(5):675-687.
- Fertin M, Dubois E, Belliard A, Amouyel P, Pinet F, Bauters C. Usefulness of circulating biomarkers for the prediction of left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2012;110(2):277-283.
- Fertin M, Hennache B, Hamon M, et al. 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(10):1410-1416.
- Fertin M, Lemesle G, Turkieh A, et al. Serum MMP-8: a novel indicator of left ventricular remodeling and cardiac outcome in patients after acute myocardial infarction. *PLoS One.* 2013;8(8):e71280.
- Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol.* 2014;11(5):255-65.
- Funaro S, La Torre G, Madonna M, Galiuto L, Scara A, Labbadia A, et al. Incidence, determinants, and prognostic value of reverse left ventricular remodelling after primary percutaneous coronary intervention: results of the Acute Myocardial Infarction Contrast Imaging (AMICI) multicenter study. *Eur Heart J.* 2009;30(5):566-75.
- Gaggin HK, Szymonifka J, Bhardwaj A, Belcher A, De Berardinis B, Motiwala S, et al. Head-to-head comparison of serial soluble ST2, growth differentiation factor-15, and highly-sensitive troponin T measurements in patients with chronic heart failure. *JACC Heart Fail.* 2014;2(1):65-72.
- Gagnon KT, Li L, Chu Y, Janowski BA, Corey DR. RNAi factors are present and active in human cell nuclei. *Cell Rep.* 2014;6(1):211-221.
- Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One.* 2012;7(3):e30679.

REFERENCES

- Gao F, Kataoka M, Liu N, et al. Therapeutic role of miR-19a/19b in cardiac regeneration and protection from myocardial infarction. *Nat Commun*. 2019;10(1):1802.
- Garbincius JF, Michele DE. Dystrophin-glycoprotein complex regulates muscle nitric oxide production through mechanoregulation of AMPK signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(44):13663-8.
- Garcia NA, Ontoria-Oviedo I, Gonzalez-King H, Diez-Juan A, Sepulveda P. Glucose Starvation in Cardiomyocytes Enhances Exosome Secretion and Promotes Angiogenesis in Endothelial Cells. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138849.
- Gardiner C, Di Vizio D, Sahoo S, et al. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *J Extracell Vesicles*. 2016;5:32945.
- Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(1):21-37.
- Gibb AA, Hill BG. Metabolic Coordination of Physiological and Pathological Cardiac Remodeling. *Circ Res*. 2018;123(1):107-28.
- Gibbins DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol*. 2009;11(9):1143-1149.
- Gidlof O, Andersson P, van der Pals J, Gotberg M, Erlinge D. Cardiospecific microRNA plasma levels correlate with troponin and cardiac function in patients with ST elevation myocardial infarction, are selectively dependent on renal elimination, and can be detected in urine samples. *Cardiology*. 2011;118(4):217-226.
- Giorgi C, Marchi S, Pinton P. The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(11):713-30.
- Goni FM, Alonso A. Effects of ceramide and other simple sphingolipids on membrane lateral structure. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1788(1):169-177.
- Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K, Boutros M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol*. 2012;14(10):1036-1045.
- Grossman W. Cardiac hypertrophy: useful adaptation or pathologic process? *Am J Med*. 1980;69(4):576-584.
- Guo H, Chitiprolu M, Roncevic L, et al. Atg5 Disassociates the V1V0-ATPase to Promote Exosome Production and Tumor Metastasis Independent of Canonical Macroautophagy. *Dev Cell*. 2017;43(6):716-730.e717.
- Guo ML, Guo LL, Weng YQ. Implication of peripheral blood miRNA-124 in predicting acute myocardial infarction. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(5):1054-1059.
- Haider AW, Larson MG, Benjamin EJ, Levy D. Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32(5):1454-9.
- Hartupee J, Mann DL. Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(1):30-38.

REFERENCES

- Heineke J, Ruetten H, Willenbockel C, Gross SC, Naguib M, Schaefer A, et al. Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(5):1655-60.
- Herum KM, Lunde IG, McCulloch AD, Christensen G. The Soft- and Hard-Heartedness of Cardiac Fibroblasts: Mechanotransduction Signaling Pathways in Fibrosis of the Heart. *J Clin Med*. 2017;6(5).
- Hessvik NP, Overbye A, Brech A, et al. PIKfyve inhibition increases exosome release and induces secretory autophagy. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(24):4717-4737.
- Horgan RP, Kenny LC. 'Omic' technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician & Gynaecologist*. 2011;13(3):189-95.
- Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*. 2015;527(7578):329-335.
- Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*. 2004;104(9):2761-2766.
- Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura S, et al. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J Cell Biol*. 2010;189(2):223-232.
- Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)*. 2005;20:22-27.
- Humeres C, Frangogiannis NG. Fibroblasts in the Infarcted, Remodeling, and Failing Heart. *JACC Basic Transl Sci*. 2019;4(3):449-67.
- Hyenne V, Apaydin A, Rodriguez D, et al. RAL-1 controls multivesicular body biogenesis and exosome secretion. *J Cell Biol*. 2015;211(1):27-37.
- Ibanez B, Heusch G, Ovize M, Van de Werf F. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(14):1454-71.
- Jakob P, Kacprowski T, Briand-Schumacher S, et al. Profiling and validation of circulating microRNAs for cardiovascular events in patients presenting with ST-segment elevation myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2017;38(7):511-515.
- Jennings RB, Ganote CE. Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circ Res*. 1974;35 Suppl 3:156-72.
- Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, et al. Reassessment of Exosome Composition. *Cell*. 2019;177(2):428-445.e418.
- Jiao M, You HZ, Yang XY, et al. Circulating microRNA signature for the diagnosis of childhood dilated cardiomyopathy. *Sci Rep*. 2018;8(1):724.
- Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*. 1987;262(19):9412-9420.
- Joyce AR, Palsson BO. The model organism as a system: integrating 'omics' data sets. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(3):198-210.

REFERENCES

- Kajimoto T, Okada T, Miya S, Zhang L, Nakamura S. Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nat Commun.* 2013;4:2712.
- Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(10):827-40.
- Kamerkar S, LeBleu VS, Sugimoto H, et al. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature.* 2017;546(7659):498-503.
- Karimi N, Cvjetkovic A, Jang SC, et al. Detailed analysis of the plasma extracellular vesicle proteome after separation from lipoproteins. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(15):2873-2886.
- Kempf T, von Haehling S, Peter T, Allhoff T, Cicoira M, Doehner W, et al. Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50(11):1054-60.
- Kim YJ, Maizel A, Chen X. Traffic into silence: endomembranes and post-transcriptional RNA silencing. *Embo j.* 2014;33(9):968-980.
- Kimes BW, Brandt BL. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res.* 1976;98(2):367-381.
- Koppers-Lalic D, Hackenberg M, Bijnsdorp IV, et al. Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Rep.* 2014;8(6):1649-1658.
- Kovacic-Milivojevic B, Roediger F, Almeida EA, Damsky CH, Gardner DG, Ilic D. Focal adhesion kinase and p130Cas mediate both sarcomeric organization and activation of genes associated with cardiac myocyte hypertrophy. *Mol Biol Cell.* 2001;12(8):2290-307.
- Kowal J, Arras G, Colombo M, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(8):E968-977.
- Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D155-d162.
- Kumarswamy R, Bauters C, Volkman I, et al. Circulating long noncoding RNA, LIPCAR, predicts survival in patients with heart failure. *Circ Res.* 2014;114(10):1569-1575.
- Kuosmanen SM, Hartikainen J, Hippelainen M, Kokki H, Levonen AL, Tavi P. MicroRNA profiling of pericardial fluid samples from patients with heart failure. *PLoS One.* 2015;10(3):e0119646.
- Lamblin N, Bauters A, Fertin M, de Groote P, Pinet F, Bauters C. Circulating levels of hepatocyte growth factor and left ventricular remodelling after acute myocardial infarction (from the REVE-2 study). *Eur J Heart Fail.* 2011;13(12):1314-1322.
- Leask A. Focal Adhesion Kinase: A Key Mediator of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Fibroblasts. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2. United States 2013. p. 247-9.
- Li A, Ponten F, dos Remedios CG. The interactome of LIM domain proteins: the contributions of LIM domain proteins to heart failure and heart development. *Proteomics.* 2012;12(2):203-25.
- Li B, Antonyak MA, Zhang J, Cerione RA. RhoA triggers a specific signaling pathway that generates transforming microvesicles in cancer cells. *Oncogene.* 2012;31(45):4740-4749.

REFERENCES

- Li R, Wu Y, Manso AM, Gu Y, Liao P, Israeli S, et al. beta1 integrin gene excision in the adult murine cardiac myocyte causes defective mechanical and signaling responses. *Am J Pathol.* 2012;180(3):952-62.
- Li Z, Solomonidis EG, Meloni M, Taylor RS, Duffin R, Dobie R, et al. Single-cell transcriptome analyses reveal novel targets modulating cardiac neovascularization by resident endothelial cells following myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2019;40(30):2507-20.
- Linares R, Tan S, Gounou C, Arraud N, Brisson AR. High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2015;4:29509.
- 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(8):e0160920.
- Lourenco P, Paulo Araujo J, Paulo C, Mascarenhas J, Frioies F, Azevedo A, et al. Higher C-reactive protein predicts worse prognosis in acute heart failure only in noninfected patients. *Clin Cardiol.* 2010;33(11):708-14.
- Loyer X, Vion AC, Tedgui A, Boulanger CM. Microvesicles as cell-cell messengers in cardiovascular diseases. *Circ Res.* 2014;114(2):345-353.
- Loyer X, Zlatanova I, Devue C, et al. Intra-Cardiac Release of Extracellular Vesicles Shapes Inflammation Following Myocardial Infarction. *Circ Res.* 2018;123(1):100-106.
- Luo S, Hieu TB, Ma F, Yu Y, Cao Z, Wang M, et al. ZYZ-168 alleviates cardiac fibrosis after myocardial infarction through inhibition of ERK1/2-dependent ROCK1 activation. *Sci Rep.* 2017;7:43242.
- Lv P, Zhou M, He J, et al. Circulating miR-208b and miR-34a are associated with left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Int J Mol Sci.* 2014;15(4):5774-5788.
- Lyu L, Wang H, Li B, et al. A critical role of cardiac fibroblast-derived exosomes in activating renin angiotensin system in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;89(Pt B):268-279.
- Magnussen C, Blankenberg S. Biomarkers for heart failure: small molecules with high clinical relevance. *J Intern Med.* 2018;283(6):530-43.
- Marques FZ, Vizi D, Khammy O, Mariani JA, Kaye DM. The transcardiac gradient of cardio-microRNAs in the failing heart. *Eur J Heart Fail.* 2016;18(8):1000-1008.
- Martinez MC, Andriantsitohaina R. Extracellular Vesicles in Metabolic Syndrome. *Circ Res.* 2017;120(10):1674-1686.
- Martinez MC, Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R. Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32(11):659-665.
- Masci PG, Ganame J, Francone M, Desmet W, Lorenzoni V, Iacucci I, et al. Relationship between location and size of myocardial infarction and their reciprocal influences on post-infarction left ventricular remodelling. *Eur Heart J.* 2011;32(13):1640-8.
- Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, They C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol.* 2019;21(1):9-17.

REFERENCES

- Matsumoto A, Takahashi Y, Nishikawa M, et al. Accelerated growth of B16BL6 tumor in mice through efficient uptake of their own exosomes by B16BL6 cells. *Cancer Sci*. 2017;108(9):1803-1810.
- McConnell RE, Higginbotham JN, Shifrin DA, Jr., Tabb DL, Coffey RJ, Tyska MJ. The enterocyte microvillus is a vesicle-generating organelle. *J Cell Biol*. 2009;185(7):1285-1298.
- McKenzie AJ, Hoshino D, Hong NH, et al. KRAS-MEK Signaling Controls Ago2 Sorting into Exosomes. *Cell Rep*. 2016;15(5):978-987.
- Meijer HA, Smith EM, Bushell M. Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochem Soc Trans*. 2014;42(4):1135-1140.
- Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*. 2015;523(7559):177-182.
- Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y, Sattar N, et al. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med*. 2008;205(2):339-46.
- Minami Y, Kajimoto K, Sato N, Hagiwara N, Takano T. C-reactive protein level on admission and time to and cause of death in patients hospitalized for acute heart failure. *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes*. 2017;3(2):148-56.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10513-10518.
- Mittelbrunn M, Vicente Manzanares M, Sanchez-Madrid F. Organizing polarized delivery of exosomes at synapses. *Traffic*. 2015;16(4):327-337.
- Miyoshi H, Umeshita K, Sakon M, et al. Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury. *Gastroenterology*. 1996;110(6):1897-1904.
- Mobius W, van Donselaar E, Ohno-Iwashita Y, et al. Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic*. 2003;4(4):222-231.
- Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, et al. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*. 2004;104(10):3257-3266.
- Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles*. 2014;3.
- Mulder P, Richard V, Derumeaux G, et al. Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: effect of long-term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling. *Circulation*. 1997;96(6):1976-1982.
- Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, et al. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol*. 2009;19(22):1875-1885.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124-36.

REFERENCES

- Nabhan JF, Hu R, Oh RS, Cohen SN, Lu Q. Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(11):4146-4151.
- Nagaraju CK, Dries E, Popovic N, et al. Global fibroblast activation throughout the left ventricle but localized fibrosis after myocardial infarction. *Sci Rep*. 2017;7(1):10801.
- Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(7):387-407.
- Nguyen MN, Kiriazis H, Ruggiero D, Gao XM, Su Y, Jian A, et al. Spontaneous ventricular tachyarrhythmias in beta2-adrenoceptor transgenic mice in relation to cardiac interstitial fibrosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;309(5):H946-57.
- Nielsen SH, Mouton AJ, DeLeon-Pennell KY, Genovese F, Karsdal M, Lindsey ML. Understanding cardiac extracellular matrix remodeling to develop biomarkers of myocardial infarction outcomes. *Matrix Biol*. 2019;75-76:43-57.
- Nishi K, Takahashi T, Suzawa M, et al. Control of the localization and function of a miRNA silencing component TNRC6A by Argonaute protein. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(20):9856-9873.
- O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:402.
- Oldfield CJ, Duhamel TA, Dhalla NS. Mechanisms for the transition from physiological to pathological cardiac hypertrophy. *Can J Physiol Pharmacol*. 2019.
- Oldham S, Fulcher B, Parkes L, Arnatkeviciute A, Suo C, Fornito A. Consistency and differences between centrality measures across distinct classes of networks. *PLoS One*. 2019;14(7):e0220061.
- O'Meara E, Allen BG. Cardiac remodelling patterns and proteomics: the keys to move beyond ejection fraction in heart failure? *Eur J Heart Fail*. 2019.
- Pan CH, Wen CH, Lin CS. Interplay of angiotensin II and angiotensin(1-7) in the regulation of matrix metalloproteinases of human cardiocytes. *Exp Physiol*. 2008;93(5):599-612.
- Pascual-Figal DA, Januzzi JL. The biology of ST2: the International ST2 Consensus Panel. *Am J Cardiol*. 2015;115(7 Suppl):3b-7b.
- Pedram A, Razandi M, Narayanan R, Levin ER. Estrogen receptor beta signals to inhibition of cardiac fibrosis. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;434:57-68.
- Pilichou K, Nava A, Basso C, Beffagna G, Bauce B, Lorenzon A, et al. Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation*. 2006;113(9):1171-9.
- 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 Mol Basis Dis*. 2017;1863(6):1445-53.
- Pinto AR, Ilinykh A, Ivey MJ, Kuwabara JT, D'Antoni ML, Debuque R, et al. Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res*. 2016;118(3):400-9.

REFERENCES

- Pitchiaya S, Heinicke LA, Park JI, Cameron EL, Walter NG. Resolving Subcellular miRNA Trafficking and Turnover at Single-Molecule Resolution. *Cell Rep.* 2017;19(3):630-642.
- Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J.* 2016;37(27):2129-200.
- Purushothaman A, Bandari SK, Liu J, Mobley JA, Brown EE, Sanderson RD. Fibronectin on the Surface of Myeloma Cell-derived Exosomes Mediates Exosome-Cell Interactions. *J Biol Chem.* 2016;291(4):1652-1663.
- Rana S, Claas C, Kretz CC, Nazarenko I, Zoeller M. Activation-induced internalization differs for the tetraspanins CD9 and Tspan8: Impact on tumor cell motility. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011;43(1):106-119.
- Rana S, Yue S, Stadel D, Zoller M. Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(9):1574-1584.
- Ranjan P, Kumari R, Verma SK. Cardiac Fibroblasts and Cardiac Fibrosis: Precise Role of Exosomes. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7:318.
- Rao SK, Huynh C, Proux-Gillardeaux V, Galli T, Andrews NW. Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis. *J Biol Chem.* 2004;279(19):20471-20479.
- Reimer KA, Jennings RB. The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest.* 1979;40(6):633-44.
- Robinson DG, Ding Y, Jiang L. Unconventional protein secretion in plants: a critical assessment. *Protoplasma.* 2016;253(1):31-43.
- Rocha N, Kuijl C, van der Kant R, et al. Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *J Cell Biol.* 2009;185(7):1209-1225.
- Rodriguez C, Martinez-Gonzalez J. The Role of Lysyl Oxidase Enzymes in Cardiac Function and Remodeling. *Cells.* 2019;8(12).
- Rodriguez-Palomares JF, Gavara J, Ferreira-Gonzalez I, Valente F, Rios C, Rodriguez-Garcia J, et al. Prognostic Value of Initial Left Ventricular Remodeling in Patients With Reperfused STEMI. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2019;12(12):2445-56.
- Roell W, Klein AM, Breitbach M, Becker TS, Parikh A, Lee J, et al. Overexpression of Cx43 in cells of the myocardial scar: Correction of post-infarct arrhythmias through heterotypic cell-cell coupling. *Sci Rep.* 2018;8(1):7145.
- Rome LH, Kickhoefer VA. Development of the vault particle as a platform technology. *ACS Nano.* 2013;7(2):889-902.
- Romiti GF, Cangemi R, Toriello F, Ruscio E, Sciomer S, Moscucci F, et al. Sex-Specific Cut-Offs for High-Sensitivity Cardiac Troponin: Is Less More? *Cardiovasc Ther.* 2019;2019:9546931.

REFERENCES

- Roy S, Khanna S, Hussain SR, et al. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovasc Res.* 2009;82(1):21-29.
- Russell AE, Sneider A, Witwer KW, et al. Biological membranes in EV biogenesis, stability, uptake, and cargo transfer: an ISEV position paper arising from the ISEV membranes and EVs workshop. *J Extracell Vesicles.* 2019;8(1):1684862.
- Salameh A, Karl S, Djilali H, Dhein S, Janousek J, Daehnert I. Opposing and synergistic effects of cyclic mechanical stretch and alpha- or beta-adrenergic stimulation on the cardiac gap junction protein Cx43. *Pharmacol Res.* 2010;62(6):506-13.
- Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie AN, Lee RT. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest.* 2007;117(6):1538-49.
- Santangelo L, Giurato G, Cicchini C, et al. The RNA-Binding Protein SYNCRIP Is a Component of the Hepatocyte Exosomal Machinery Controlling MicroRNA Sorting. *Cell Rep.* 2016;17(3):799-808.
- Saucerman JJ, Tan PM, Buchholz KS, McCulloch AD, Omens JH. Mechanical regulation of gene expression in cardiac myocytes and fibroblasts. *Nat Rev Cardiol.* 2019;16(6):361-378.
- Savina A, Fader CM, Damiani MT, Colombo MI. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic.* 2005;6(2):131-143.
- Savoie C, Equine O, Tricot O, et al. 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(9):1144-1149.
- Schluter KD, Jakob G, Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Piper HM. Protection of reoxygenated cardiomyocytes against osmotic fragility by nitric oxide donors. *Am J Physiol.* 1996;271(2 Pt 2):H428-34.
- Schreiber KH, Kennedy BK. When lamins go bad: nuclear structure and disease. *Cell.* 2013;152(6):1365-75.
- Seong J, Tajik A, Sun J, Guan JL, Humphries MJ, Craig SE, et al. Distinct biophysical mechanisms of focal adhesion kinase mechanoactivation by different extracellular matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(48):19372-7.
- Seronde MF, Gayat E, Logeart D, Lassus J, Laribi S, Boukef R, et al. Comparison of the diagnostic and prognostic values of B-type and atrial-type natriuretic peptides in acute heart failure. *Int J Cardiol.* 2013;168(4):3404-11.
- Sharma S, Goswami R, Merth M, Cohen J, Lei KY, Zhang DX, et al. TRPV4 ion channel is a novel regulator of dermal myofibroblast differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2017;312(5):C562-c72.
- Sharma S, Goswami R, Zhang DX, Rahaman SO. TRPV4 regulates matrix stiffness and TGFbeta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Mol Med.* 2019;23(2):761-74.
- Shen B, Fang Y, Wu N, Gould SJ. Biogenesis of the posterior pole is mediated by the exosome/microvesicle protein-sorting pathway. *J Biol Chem.* 2011;286(51):44162-44176.

REFERENCES

- Shimizu T, Narang N, Chen P, Yu B, Knapp M, Janardanan J, et al. Fibroblast deletion of ROCK2 attenuates cardiac hypertrophy, fibrosis, and diastolic dysfunction. *JCI Insight*. 2017;2(13).
- Shinde AV, Humeres C, Frangogiannis NG. The role of alpha-smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017;1863(1):298-309.
- Shore S, Grau-Sepulveda MV, Bhatt DL, Heidenreich PA, Eapen ZJ, Hernandez AF, et al. Characteristics, Treatments, and Outcomes of Hospitalized Heart Failure Patients Stratified by Etiologies of Cardiomyopathy. *JACC Heart Fail*. 2015;3(11):906-16.
- Shurtleff MJ, Temoche-Diaz MM, Karfilis KV, Ri S, Schekman R. Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *Elife*. 2016;5.
- Sinha S, Hoshino D, Hong NH, et al. Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics. *J Cell Biol*. 2016;214(2):197-213.
- Sokolova V, Ludwig AK, Hornung S, et al. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011;87(1):146-150.
- Staufenberger S, Jacobs M, Brandstatter K, Hafner M, Regitz-Zagrosek V, Ertl G, et al. Angiotensin II type 1 receptor regulation and differential trophic effects on rat cardiac myofibroblasts after acute myocardial infarction. *J Cell Physiol*. 2001;187(3):326-35.
- Stefanon I, Valero-Munoz M, Fernandes AA, et al. Left and right ventricle late remodeling following myocardial infarction in rats. *PLoS One*. 2013;8(5):e64986.
- Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, Brech A. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic*. 2009;10(7):925-937.
- Sudhof TC. A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond. *Nat Med*. 2013;19(10):1227-1231.
- Sun LY, Zhao JC, Ge XM, Zhang H, Wang CM, Bie ZD. Circ_LAS1L regulates cardiac fibroblast activation, growth, and migration through miR-125b/SFRP5 pathway. *Cell Biochem Funct*. 2020.
- Sun M, Yu H, Zhang Y, Li Z, Gao W. MicroRNA-214 Mediates Isoproterenol-induced Proliferation and Collagen Synthesis in Cardiac Fibroblasts. *Sci Rep*. 2015;5:18351.
- Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*. 2000;101(25):2981-8.
- Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D607-d13.
- Taegtmeyer H, Sen S, Vela D. Return to the fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1188:191-8.
- Tallquist MD, Molkenin JD. Redefining the identity of cardiac fibroblasts. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(8):484-491.

REFERENCES

- Tamai K, Tanaka N, Nakano T, et al. Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;399(3):384-390.
- Tang CM, Zhang M, Huang L, et al. CircRNA_000203 enhances the expression of fibrosis-associated genes by derepressing targets of miR-26b-5p, Col1a2 and CTGF, in cardiac fibroblasts. *Sci Rep.* 2017;7:40342.
- Tanzer A, Stadler PF. Molecular evolution of a microRNA cluster. *J Mol Biol.* 2004;339(2):327-335.
- Teng Y, Ren Y, Hu X, et al. MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression. *Nat Commun.* 2017;8:14448.
- The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D330-d8.
- Thery C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 2018;7(1):1535750.
- Thomson DW, Dinger ME. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy. *Nat Rev Genet.* 2016;17(5):272-283.
- Thum T, Gross C, Fiedler J, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature.* 2008;456(7224):980-984.
- Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Heart J.* 2019;40(3):237-69.
- Tian T, Zhu YL, Zhou YY, et al. Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *J Biol Chem.* 2014;289(32):22258-22267.
- Traister A, Li M, Aafaqi S, Lu M, Arab S, Radisic M, et al. Integrin-linked kinase mediates force transduction in cardiomyocytes by modulating SERCA2a/PLN function. *Nat Commun.* 2014;5:4533.
- Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science.* 2008;319(5867):1244-1247.
- Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem Sci.* 2012;37(11):460-465.
- Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(16):7223-7233.
- Turkieh A, Charrier H, Dubois-Deruy E, Porouchani S, Bouvet M, Pinet F. Noncoding RNAs in Cardiac Autophagy following Myocardial Infarction. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:8438650.
- Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654-659.
- van Boven N, Akkerhuis KM, Anroedh SS, et al. Serially measured circulating miR-22-3p is a biomarker for adverse clinical outcome in patients with chronic heart failure: The Bio-SHiFT study. *Int J Cardiol.* 2017;235:124-132.

REFERENCES

- Van de Werf F. The history of coronary reperfusion. *Eur Heart J.* 2014;35(37):2510-5.
- van der Meer P, Gaggin HK, Dec GW. ACC/AHA Versus ESC Guidelines on Heart Failure: JACC Guideline Comparison. *J Am Coll Cardiol.* 2019;73(21):2756-68.
- van Niel G, Charrin S, Simoes S, et al. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell.* 2011;21(4):708-721.
- van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(4):213-228.
- Vegter EL, Ovchinnikova ES, Sillje HHW, et al. Rodent heart failure models do not reflect the human circulating microRNA signature in heart failure. *PLoS One.* 2017;12(5):e0177242.
- Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol.* 2011;13(4):423-433.
- Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Mittelbrunn M, et al. ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins. *Nat Commun.* 2016;7:13588.
- Villarroya-Beltri C, Gutierrez-Vazquez C, Sanchez-Cabo F, et al. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun.* 2013;4:2980.
- Vilne B, Schunkert H. Integrating Genes Affecting Coronary Artery Disease in Functional Networks by Multi-OMICs Approach. *Front Cardiovasc Med.* 2018;5:89.
- Vite A, Zhang C, Yi R, Emms S, Radice GL. alpha-Catenin-dependent cytoskeletal tension controls Yap activity in the heart. *Development.* 2018;145(5).
- Wang H, Chen Q, Li Y, Jing X, Yang J. Prognostic value of growth differentiation factor-15 in Chinese patients with heart failure: A prospective observational study. *Cardiol J.* 2018;25(2):245-53.
- Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(20):7248-7259.
- Wang L, Liu J, Xu B, Liu YL, 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(11):626-633.
- Wang P, Chen H, Qin H, Sankarapandi S, Becher MW, Wong PC, et al. Overexpression of human copper, zinc-superoxide dismutase (SOD1) prevents postischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(8):4556-60.
- Wang R, Ding X, Zhou S, et al. MicroRNA-26b attenuates monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling via targeting connective tissue growth factor (CTGF) and cyclin D1 (CCND1). *Oncotarget.* 2016;7(45):72746-72757.
- Wehman AM, Poggioli C, Schweinsberg P, Grant BD, Nance J. The P4-ATPase TAT-5 inhibits the budding of extracellular vesicles in *C. elegans* embryos. *Curr Biol.* 2011;21(23):1951-1959.
- Wei Y, Wang D, Jin F, et al. Pyruvate kinase type M2 promotes tumour cell exosome release via phosphorylating synaptosome-associated protein 23. *Nat Commun.* 2017;8:14041.

REFERENCES

- Weinberg EO, Shimp M, De Keulenaer GW, MacGillivray C, Tominaga S, Solomon SD, et al. Expression and regulation of ST2, an interleukin-1 receptor family member, in cardiomyocytes and myocardial infarction. *Circulation*. 2002;106(23):2961-6.
- Willms E, Johansson HJ, Mager I, et al. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci Rep*. 2016;6:22519.
- Wilson KF, Erickson JW, Antonyak MA, Cerione RA. Rho GTPases and their roles in cancer metabolism. *Trends Mol Med*. 2013;19(2):74-82.
- Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*. 1967;13(3):269-288.
- Wu X, Li L, Iliuk A, Tao WA. Highly Efficient Phosphoproteome Capture and Analysis from Urinary Extracellular Vesicles. *J Proteome Res*. 2018;17(9):3308-3316.
- Xiao M, Li J, Li W, et al. MicroRNAs activate gene transcription epigenetically as an enhancer trigger. *RNA Biol*. 2017;14(10):1326-1334.
- Yan M, Chen C, Gong W, et al. miR-21-3p regulates cardiac hypertrophic response by targeting histone deacetylase-8. *Cardiovasc Res*. 2015;105(3):340-352.
- Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Jr., Colvin MM, et al. 2017 ACC/AHA/HFSA Focused Update of the 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Failure Society of America. *J Card Fail*. 2017;23(8):628-51.
- Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27066.
- Yang JM, Gould SJ. The cis-acting signals that target proteins to exosomes and microvesicles. *Biochem Soc Trans*. 2013;41(1):277-282.
- Yoshida M, Sho E, Nanjo H, Takahashi M, Kobayashi M, Kawamura K, et al. Weaving hypothesis of cardiomyocyte sarcomeres: discovery of periodic broadening and narrowing of intercalated disk during volume-load change. *Am J Pathol*. 2010;176(2):660-78.
- Zhang J, Fan G, Zhao H, Wang Z, Li F, Zhang P, et al. Targeted inhibition of Focal Adhesion Kinase Attenuates Cardiac Fibrosis and Preserves Heart Function in Adverse Cardiac Remodeling. *Sci Rep*. 2017;7:43146.
- Zhang M, Cheng YJ, Sara JD, et al. Circulating MicroRNA-145 is Associated with Acute Myocardial Infarction and Heart Failure. *Chin Med J (Engl)*. 2017;130(1):51-56.
- Zhang WQ, Xie BQ. A meta-analysis of the relations between blood microRNA-208b detection and acute myocardial infarction. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(4):848-854.
- Zhang X, Zuo X, Yang B, et al. MicroRNA directly enhances mitochondrial translation during muscle differentiation. *Cell*. 2014;158(3):607-619.
- Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(2):H579-88.

REFERENCES

Zimmerman B, Kelly B, McMillan BJ, et al. Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket. *Cell*. 2016;167(4):1041-1051

Article

Integrative System Biology Analyses Identify Seven MicroRNAs to Predict Heart Failure

Henri Charrier ^{1,†}, Marie Cuvelliez ^{1,†}, Emilie Dubois-Deruy ¹, Paul Mulder ², Vincent Richard ², Christophe Bauters ³ and Florence Pinet ^{1,*} 

¹ Inserm, Institut Pasteur de Lille, Université de Lille, FHU-REMOD-VHF, U1167-RID-AGE, F-59000 Lille, France; henri.charrier@pasteur-lille.fr (H.C.); marie.cuvelliez@pasteur-lille.fr (M.C.); emilie.deruy@pasteur-lille.fr (E.D.-D.)

² Normandie University, UNIROUEN, Inserm U1096, FHU-REMOD-VHF, 7F-6000 Rouen, France; paul.mulder@univ-rouen.fr (P.M.); vincent.richard@univ-rouen.fr (V.R.)

³ Inserm, Institut Pasteur de Lille, Faculté de Médecine de Lille, Université de Lille, CHU Lille, FHU REMOD-VHF, U1167-RID-AGE, F-59000 Lille, France; christophe.bauters@chru-lille.fr

* Correspondence: florence.pinet@pasteur-lille.fr; Tel.: +33-(0)320-877-215

† These authors contributed equally to this work.

Received: 1 February 2019; Accepted: 5 March 2019; Published: 7 March 2019



Abstract: Heart failure (HF) has several etiologies including myocardial infarction (MI) and left ventricular remodeling (LVR), but its progression remains difficult to predict in clinical practice. Systems biology analyses of LVR after MI provide molecular insights into this event such as modulation of microRNA (miRNA) that could be used as a signature of HF progression. To define a miRNA signature of LVR after MI, we use 2 systems biology approaches, integrating either proteomic data generated from LV of post-MI rat induced by left coronary artery ligation or multi-omics data (proteins and non-coding RNAs) generated from plasma of post-MI patients from the REVE-2 study. The first approach predicted that 13 miRNAs and 3 of these miRNAs would be validated to be associated with LVR in vivo: miR-21-5p, miR-23a-3p and miR-222-3p. The second approach predicted that 24 miRNAs among 1310 molecules and 6 of these miRNAs would be selected to be associated with LVR in silico: miR-17-5p, miR-21-5p, miR-26b-5p, miR-222-3p, miR-335-5p and miR-375. We identified a signature of 7 microRNAs associated with LVR after MI that support the interest of integrative systems biology analyses to define a miRNA signature of HF progression.

Keywords: biomarkers; miRNAs; heart failure; system biology

1. Introduction

Heart failure (HF) is a major cause of mortality in occidental countries that is difficult to predict in clinical practice [1]. HF can be the consequence of left ventricle remodeling (LVR) induced by a myocardial infarction (MI) [2,3]. LVR is characterized by cardiac hypertrophy and reduction of LV wall. Although LVR is an adaptive response early after MI, it is becoming deleterious in the long term [4]. Deciphering molecular events underlying LVR may offer new opportunities in the identification of early predictive biomarkers of LVR and HF. Omics approaches including transcriptomics, proteomics, and metabolomics have been extensively used to explore these mechanisms but the amount of complex generated data prevents their comprehensive analysis.

Recently, systems biology opened new opportunities to better understand molecular networks and identify new targets involved in HF [5,6]. Among those potential targets, microRNAs (miRNAs) are non-coding RNAs of 19 to 23 nucleotides that regulate gene expression by targeting messenger RNAs [7]. MiRNAs are involved in many processes like cardiomyocyte hypertrophy, fibroblast to

myofibroblast transformation and cell to cell communication [8–10]. The modulation of expression of a small set of miRNAs associated with LVR may define a miRNA signature to detect this process. The present study aims to define a signature of miRNAs associated with LVR after MI to predict HF. We analyzed two systems biology approaches that we previously developed from a post MI rat model [10–13] and post-MI patients from the REVE-2 study [14].

2. Results

2.1. Analysis of the Protein-MiRNA Network Derived from Post-MI Rats Identified Circulating MiR-21-5p, MiR-23a-3p and MiR-222-3p to Be Associated with LVR after MI

The proteomic screening in LV of post-MI male rats [11], previously published [12,13], allowed the identification of 45 proteins modulated by LVR. Using the Qiagen's Ingenuity Pathway knowledge base, we built a protein-miRNA interaction network highlighting 13 candidate miRNAs which were prioritized to identify candidate miRNAs to detect LVR after MI (Figure 1).

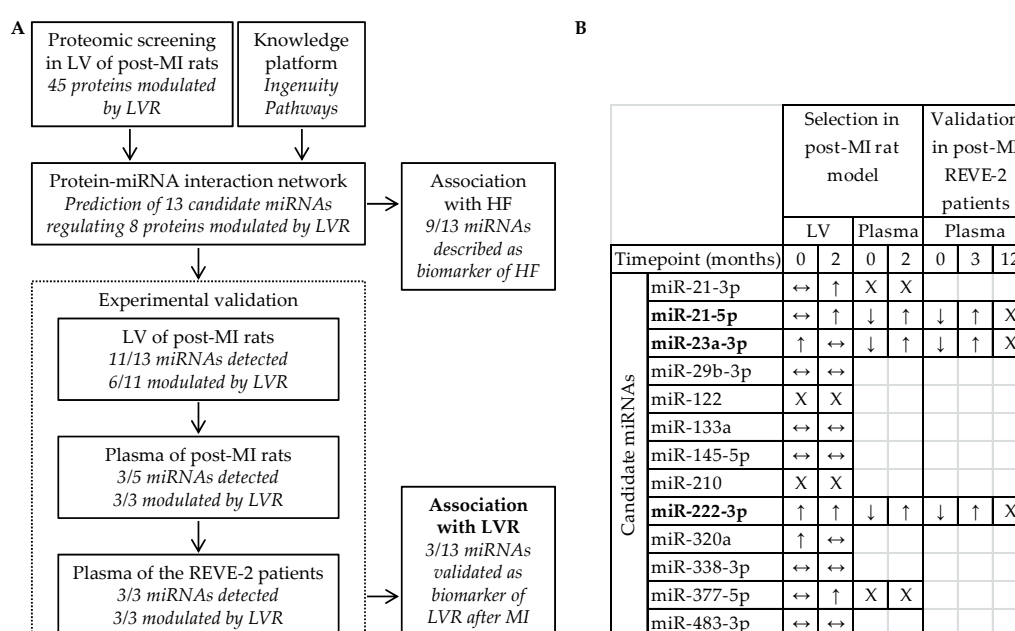


Figure 1. Identification of miR-21-5p, miR-23a-3p and miR-222-3p to detect left ventricular remodeling (LVR) after myocardial infarction (MI) and to predict heart failure (HF). (A) Design and (B) experimental selection and validation of the 13 candidate miRNAs predicted from the proteomic data obtained in LV of post-MI rats by the Ingenuity Pathway knowledge platform. Quantification of candidate miRNAs in LV and in plasma of post-MI rats at 7 days (Timepoint 0) and at 2 months and in plasma of REVE-2 patients at baseline (Timepoint 0), 3 month and 12 months after MI was published elsewhere [10]. ↑ and ↓ respectively indicate a significant increase and decrease of miRNAs ($p < 0.05$) detected between sham- and post-MI rats/between patients with no and high LVR, ↔ indicates no modulation, X indicates a lack of detection. MiRNAs remaining after the validation process are in bold.

The 13 candidate miRNAs are predicted to interact with 8 out of the 45 proteins modulated by LVR [10], testifying that they are involved in LVR after MI. Moreover, 9 out of the 13 candidate miRNAs have been described as biomarkers of HF: miR-21-3p, miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-29b-3p, miR-122, miR-133a, miR-145-5p, miR-222-3p and miR-320a [10,15–20], confirming their potential as targets to predict HF (Figure 1A). To prioritize candidate miRNAs with high relation specificity with LVR, we evaluated in vivo the association of the 13 candidate miRNAs with LVR after MI (Figure 1B). In LV of post-MI rats, we selected 6 candidate miRNAs up-regulated by LVR at 7 days (miR-23a-3p, miR-222-3p and miR-320a) and at 2 months after MI (miR-21-3p, miR-21-5p, miR-222-3p and miR-377-5p) [10] and we excluded the 7 candidate miRNAs which were not detected (miR-122 and

miR-210) or not modulated by LVR (miR-29b-3p, miR-133a, miR-145-5p, miR-338-3p and miR-483-3p). In plasma of post-MI rats, we selected 3 candidate miRNAs down-regulated by LVR at 7 days and up-regulated by LVR at 2 months (miR-21-5p, miR-23a-3p and miR-222-3p) [10] and we excluded the 3 candidate miRNAs which were not detected (miR-21-3p and miR-377-5p) or not measurable (miR-320a). In plasma of post-MI patients from the REVE-2 study, we showed that the 3 selected candidate miRNAs: miR-21-5p, miR-23a-3p and miR-222-3p are down-regulated by LVR at baseline and are up-regulated by LVR after 3 months, especially in men, validating their potential as circulating biomarkers of adverse LVR after MI to predict HF as previously published [10].

2.2. Analysis of the REVE-2 Network Identified MiR-21-5p, MiR-222-3p, MiR-335-5p, MiR-26b-5p, MiR-375 and MiR-17-5p to Detect LVR after MI

The REVE-2 molecular data generated by the measurement of 24 variables in the plasma of the patients from the REVE-2 study (including miR-21-5p, miR-23a-3p and miR-222-3p) and the EdgeLeap’s knowledge platform EdgeBox were used to build the REVE-2 molecular interaction network described in detail elsewhere [14]. The REVE-2 network contains 1310 molecules, including 24 miRNAs which were prioritized to identify candidate miRNAs to detect LVR after MI (Figure 2).

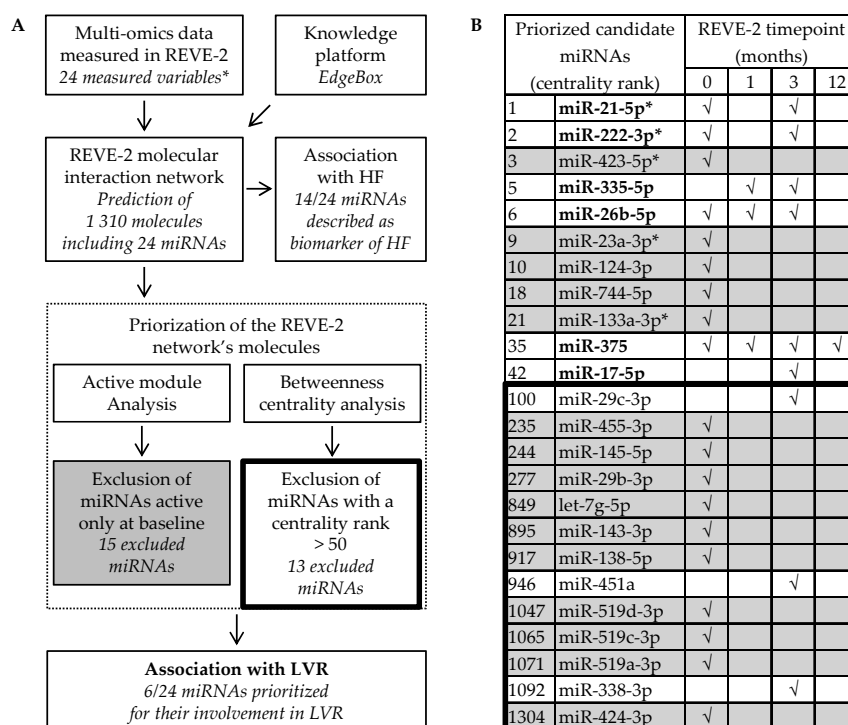


Figure 2. Identification of miR-21-5p, miR-222-3p, miR-335-5p, miR-26ba-3p, miR-375 and miR-17-5p to detect left ventricular remodeling (LVR) after myocardial infarction (MI) and to predict heart failure (HF). (A) Selection process and (B) prioritization analysis of the 24 miRNAs predicted from the multi-omic data obtained in the 226 patients from the REVE-2 study by the EdgeBox knowledge platform. ✓ indicates that miRNA is predicted to be active at the corresponding timepoint: baseline (0), 1 month, 3 month and 12 months after MI. MiRNAs only active at baseline (grey) and with a betweenness centrality rank lower than 50 (inside the thick line) were excluded from further investigation because they are not expected to be highly involved in LVR after MI. * indicates REVE-2 variables. MiRNAs remaining after the selection process are in bold.

Fourteen out of the 24 candidate miRNAs are described to be associated with HF: 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 and miR-451a [10,15,17,18,21–24], confirming they are

interesting targets to predict HF (Figure 2A,B). To prioritize candidate miRNAs with high relation specificity with LVR, we evaluated in silico the association of the 24 candidate miRNAs with LVR after MI through 2 criteria: active modules and betweenness centrality (Figure 2A). To avoid the selection of miRNAs associated with mechanisms not specific to LVR such as inflammation [14], we excluded the 15 candidate miRNAs active only at baseline. However, it could be interesting to analyze the miRNAs that are only active at baseline as a potential biomarker of early LVR. To avoid the selection of miRNAs that are less significant in LVR, we excluded 13 miRNAs that were not in the top 50 molecules with the highest centrality. When combining these 2 criteria, among the 24 candidate miRNAs, only 6 remained: miR-21-5p, miR-222-3p, miR-335-5p, miR-26b-5p, miR-375 and miR-17-5p (Figure 2B). Interestingly, the 6 remaining candidate miRNAs are predicted to be active at least at 3 months after MI, when only specific mechanisms of LVR seem to be effective [14]. To date, only miR-21-5p and miR-222-3p, also identified by the first approach, were validated in vivo to detect LVR after MI [10], testifying that the signature defined by the 6 last candidate miRNAs may be used as a circulating biomarker of adverse LVR after MI to predict HF.

2.3. Gene Ontology Analysis of the 7 MiRNAs Targets Predicted with a High Relation Specificity with Processes Involved in LVR after MI

An analysis of the 7 miRNAs targets was performed using the ClueGO [25] and CluePedia [26] applications of Cytoscape (version 3.4.0). The applications used the miRecords database to identify the experimentally validated targets of each miRNA which were submitted to Gene Ontology enrichment (Figure 3).

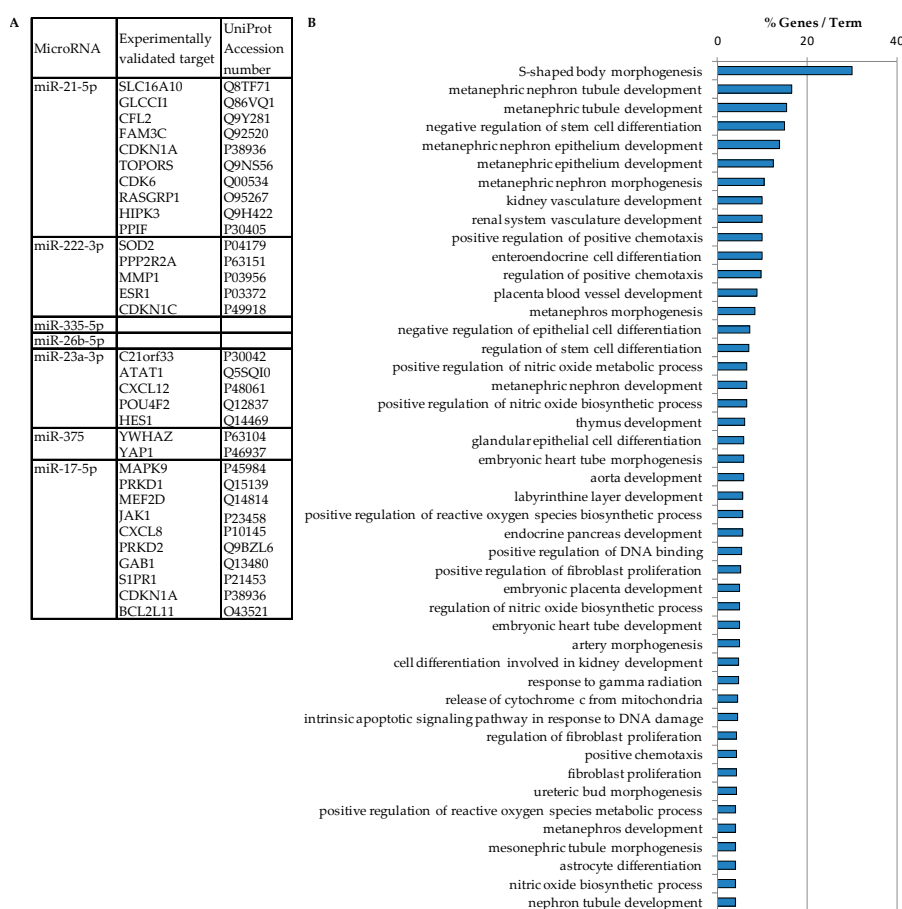


Figure 3. Functional annotation enrichment analysis of the 7 miRNA's targets. (A) Targets of miRNAs were predicted by miRecords database. No targets have been described for miR-335-5p and miR-26b-5p. (B) Biological processes of miRNA's target genes were predicted by Cytoscape plugin ClueGO and Cluepedia applications ($p < 0.05$).

Thirty-one targets were predicted to interact with 5 out of 7 miRNAs (miR-21-5p, miR-222-3p, miR-23a-3p, miR-375 and miR-17-5p) (Figure 3A). The 2 remaining miRNAs (miR-335-5p and miR-26b-5p) had no validated target in miRecords. We can observe that the miRNA's targets are involved in pathways involved in LVR development such as fibroblast proliferation, regulation of reactive oxygen species metabolism and intrinsic apoptotic signaling pathways, but also embryonic heart development as embryonic heart tube development and aorta development (Figure 3B). These results indicate the involvement of the 7 miRNAs in cardiac development and LVR processes.

3. Discussion and Perspectives

Systems biology approaches have been shown to improve the biomarker discovery in comparison with traditional omics approaches by allowing the selection of biomarkers with a biological relevance in the pathology [5,6]. In this study, we described two systems biology analyses integrating both omics data to identify candidate miRNAs associated with LVR after MI and to predict HF. As interaction networks rely on the use of public databases, the prediction of miRNA interactions is not always experimentally validated and may give an approximate vision of the complex mechanisms underlying LVR [27,28]. To avoid this issue, predicted miRNA interactions were either experimentally validated or predicted by at least 3 different databases in this study. Moreover, while most systems biology approaches often integrate a single timepoint, we used different timepoints to integrate the molecular events underlying LVR progression. Finally, both approaches include a selection of candidate miRNAs associated with LVR after MI either by experimental validation *in vivo* or by *in silico* prioritization before validation in post-MI patients.

The first approach, derived from a post-MI rat model, predicted 13 candidate miRNAs and 3 of these candidate miRNAs were selected to be associated with LVR *in vivo* both in LV and in plasma of post-MI rats: miR-21-5p, miR-23a-3p and miR-222-3p. In this first approach, candidate miRNAs were selected based on the hypothesized behavior of circulating miRNAs as an endocrine signal, but our results show that candidate miRNAs do not necessarily have the same profile in LV and in plasma, showing that miRNAs secreted by LV are quantitatively and qualitatively different from their intracellular profile in LV. Moreover, although circulating miRNA profile in HF rat models may not reflect a human profile [29], we validated the association of miR-21-5p, miR-23a-3p and miR-222-3p with LVR after MI both in plasma of the HF rat model and in HF patients, indicating that these 3 selected miRNAs define a conserved miRNA signature of LVR. The second approach predicted 24 candidate miRNAs among 1310 molecules and 6 of these miRNAs were selected to be associated with LVR *in silico*: miR-17-5p, miR-21-5p, miR-26b-5p, miR-222-3p, miR-335-5p and miR-375. Although miR-21-5p and miR-222-3p were validated by the first approach, miR-335-5p, miR-26b-5p, miR-375 and miR-17-5p remain to be validated. Altogether, these two integrative systems biology analyses identified a signature of 7 microRNAs associated with LVR after MI and more especially with mechanisms underlying LVR, such as apoptosis, oxidative stress and fibroblasts proliferation.

MiR-21-5p is one of the most studied miRNAs in cardiovascular diseases. Indeed, it was shown that the failing heart was able to release miR-21-5p into the circulation [18]. MiR-23a-3p is less studied. However, a correlation was described between miR-23a and pulmonary function of patients with idiopathic pulmonary hypertension [30]. MiR-23a was also shown to regulate cardiomyocyte apoptosis by targeting SOD2 mRNA [31]. MiR-222-3p is known to regulate SOD2 expression in HF patients [10] and to be involved in the inhibition of myocardial fibrosis by targeting TGF β [32]. Recently, we showed that miR-21-5p, miR-23a-3p and miR-222-3p were decreased in the plasma of patients with high LVR at baseline and increased at one year [10]. MiR-335-5p has not been yet linked with cardiovascular diseases and it has been described as a potential biomarker of osteosarcoma in children [33] and of osteoporosis [34]. MiR-375 has been shown to be mainly expressed in the developing heart and to a lower extent in the adult heart [35] and it is also increased in the plasma of pregnant women with fetal congenital heart defects [36]. MiR-26b-5p and miR-17-5p are well known to be involved in the cardiovascular system. MiR-26b-5p has been shown to be modulated in plasma of patients presenting

major cardiovascular events [23]. MiR-17-5p was shown to be increased in the plasma of patients with hypertrophic cardiomyopathy and diffuse myocardial fibrosis [24]. These results testify that miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-222-3p, miR-320a, miR-335-5p, miR-26b-5p, miR-375 and miR-17-5p may be interesting targets to predict HF.

In conclusion, we highlighted the use of integrative systems biology analyses to define a miRNA signature of LVR to predict HF. However, even though the building of molecular networks relies on experimental data, we showed that miRNA signatures still need to be experimentally validated to be relevant *in vivo*.

Our study has some limitations: further experiments should be done in order to understand why there is no correlation for some miRNAs between the intracellular (LV) and extracellular (plasma) miRNA profiles. It would be important to determine the cellular origin (fibroblasts, cardiomyocytes, endothelial cells) of miRNAs and the characterization of their transporters from the intracellular to extracellular medium.

4. Methods

4.1. Experimental Model of HF in Rats

All animal experiments were performed according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH publication NO1-OD-4-2-139, revised in 2011). Experimental protocols were performed under the supervision of a person authorized to perform experiments on live animals (F. Pinet: 59-350126 and E. Dubois-Deruy: 59-350253). Approval was granted by the institutional ethics review board (CEEA Nord Pas-de-Calais N°242011, January 2012). MI was induced as previously described [10,11] by permanent left anterior descending coronary artery ligation in 10 weeks old Wistar male rats. Hemodynamic and echocardiographic measurements were performed to detect LVR, at 7 days (n = 8, respectively in sham- and MI-rats) and 2 months (n = 16, respectively in sham- and MI-rats) after surgery, followed by non-infarcted area of LV sampling and plasma sampling.

4.2. The REVE-2 Study

The REVE-2 study is a prospective multicenter study to analyze the association between circulating biomarkers and LVR and has been previously detailed [3]. Briefly, REVE-2 study included 226 patients with a first anterior wall Q-wave MI between February 2006 and September 2008. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Centre Hospitalier et Universitaire de Lille, and each patient provided written informed consent. Serial echocardiographic studies were performed at hospital discharge (baseline), 3 months and one year after MI and were used to assess LVR. LVR was defined as a >20% increase in end diastolic volume from baseline to 1 year. Serial blood samples were taken at 4 timepoint: baseline, 1 month, 3 months and 12 months. Twenty-four molecular variables were measured in the REVE-2 plasma at 1 to 4 timepoints.

4.3. Quantification of Candidate MiRNAs

RNAs were extracted from non-infarcted area of LV of rats and from plasma of rats and REVE-2 patients as described elsewhere [10]. Candidate miRNAs were quantified and normalized with miR-423-3p in LV and with *Caenorhabditis elegans* Cel-39 in plasma, as described elsewhere [10].

4.4. Functional Analysis of MiRNAs Targets

MiRNA target prediction was performed using the ClueGO (version 2.5.2 <http://apps.cytoscape.org/apps/cluego>) [25] and CluePedia (version 1.5.2 <http://apps.cytoscape.org/apps/cluepedia>) applications [26] of Cytoscape software (version 3.4.0 <http://www.cytoscape.org/>). Only validated miRNAs targets from the miRecords database were selected. A Gene Ontology (GO) enrichment analysis for Biological Processes was performed for all the miRNAs targets using the ClueGO

application of Cytoscape software. *p*-value was set at 0.05, and corrected for multiple testing times using the Benjamini-Hochberg adjustment.

Author Contributions: F.P. and C.B. conceived and designed the experiments; H.C., M.C., E.D.-D. and P.M. performed the experiments; H.C., M.C., E.D.-D., P.M., V.R., C.B. and F.P. analyzed the data; H.C., M.C., E.D.-D., C.B. and F.P. wrote the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from “Agence Nationale de la Recherche” (ANR 15-CEA-U16), “Fondation de France” and by the “Fédération Hospital-Universitaire” FHU REMOD-VHF. FP is MC substitute of COST action cardioRNA (CA1229).

Acknowledgments: We thank Jean-Paul Henry for the surgical induction of MI in rats.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Benjamin, E.J.; Blaha, M.J.; Chiuve, S.E.; Cushman, M.; Das, S.R.; Deo, R.; de Ferranti, S.D.; Floyd, J.; Fornage, M.; Gillespie, C.; Isasi, C.R.; et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **2017**, *135*, e146–e603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Savoye, C.; Equine, O.; Tricot, O.; Nugue, O.; Segrestin, B.; Sautière, K.; Elkohen, M.; Pretorian, E.M.; Taghipour, K.; Philias, A.; et al. Left ventricular remodeling after anterior wall acute myocardial infarction in modern clinical practice (from the REModelage VEtriculaire [REVE] study group). *Am. J. Cardiol.* **2006**, *98*, 1144–1149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Fertin, M.; Hennache, B.; Hamon, M.; Ennezat, P.V.; Biaisque, F.; Elkohen, M.; Nugue, O.; Tricot, O.; Lambin, N.; Pinet, F.; et al. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. St John Sutton, M.G.; Sharpe, N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction pathophysiology and therapy. *Circulation* **2000**, *101*, 2981–2988. [[CrossRef](#)]
5. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Mitra, K.; Carvunis, A.; Ramesh, S.; Ideker, T. Integrative approaches for finding modular structure in biological networks. *Nat. Rev. Genet.* **2013**, *14*, 719–732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Winter, J.; Jung, S.; Keller, S.; Gregory, R.L.; Diederichs, S. Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11*, 228–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Bang, C.; Batkai, S.; Dangwal, S.; Gupta, S.K.; Foinquinos, A.; Holzmann, A.; Just, A.; Remke, J.; Zimmer, K.; Zeug, A.; et al. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 2136–2146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Tallquist, M.D.; Molkentin, J.D. Redefining the identity of cardiac fibroblasts. *Nat. Rev. Cardiol.* **2017**, *14*, 484–491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Dubois-Deruy, E.; Cuvelliez, M.; Fiedler, J.; Charrier, H.; Mulder, P.; Hebbar, E.; Pfanne, A.; Beseme, O.; Chwastyniak, M.; Amouyel, P.; et al. MicroRNAs regulating superoxide dismutase 2 are new circulating biomarkers of heart failure. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Cieniewski-Bernard, C.; 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Dubois, E.; Richard, V.; Mulder, P.; Lambin, N.; Drobecq, H.; Henry, J.P.; Amouyel, P.; Thuillez, C.; Bauters, C.; Pinet, F. Decreased Serine207 phosphorylation of troponin T as a biomarker for left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **2011**, *32*, 115–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Cortez-Dias, N.; Costa, M.C.; Carrilho-Ferreira, P.; Silva, D.; Jorge, C.; Calisto, C.; Pessoa, T.; Martins, S.R.; de Sousa, J.C.; da Silva, P.C.; et al. Circulating miR-122-5p/miR-133b Ratio Is a Specific Early Prognostic Biomarker in Acute Myocardial Infarction. *Circ. J.* **2016**, *80*, 2183–2191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Marques, F.Z.; Vizi, D.; Khammy, O.; Mariani, J.A.; Kaye, D.M. The transcardiac gradient of cardio-microRNAs in the failing heart. *Eur. J. Heart Fail* **2016**, *18*, 1000–1008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Van Boven, N.; Kardys, I.; van Vark, L.C.; Akkerhuis, K.M.; de Ronde, M.W.J.; Khan, M.A.F.; Merkus, D.; Liu, Z.; Voors, A.A.; Asselbergs, F.W.; et al. Serially measured circulating microRNAs and adverse clinical outcomes in patients with acute heart failure. *Eur. J. Heart Fail* **2018**, *20*, 89–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Jakob, P.; Kacprowski, T.; Briand-Schumacher, S.; Heg, D.; Klingenberg, R.; Stahli, B.E.; Jaguszewski, M.; Rodondi, N.; Nanchen, D.; Raber, L.; et al. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Fang, L.; Ellims, A.H.; Moore, X.; 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bindea, G.; Galon, J.; Mlecnik, B. CluePedia Cytoscape plugin: Pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 661–663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Bray, D. Limits of computational biology. *In Silico Biol.* **2015**, *12*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Oulas, A.; Minadakis, G.; Zachariou, M.; Sokratous, K.; Bourdakou, M.M.; Spyrou, G.M. Systems Bioinformatics: Increasing precision of computational diagnostics and therapeutics through network-based approaches. *Brief. Bioinform.* **2017**, 1–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Vegter, E.L.; Ovchinnikova, E.S.; Sillj, H.H.W.; Meems, L.M.G.; van der Pol, A.; van der Velde, A.R.; Berezhikov, 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*, e0177242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Sarrion, I.; Milian, L.; Juan, G.; Ramon, M.; Furest, I.; Carda, C.; Cortijo Gimeno, J.; Mata Roig, M. Role of circulating miRNAs as biomarkers in idiopathic pulmonary arterial hypertension: Possible relevance of miR-23a. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, *2015*, 792846. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Long, B.; Gan, T.Y.; Zhang, R.C.; Zhang, Y.H. miR-23a Regulates Cardiomyocyte Apoptosis by Targeting Manganese Superoxide Dismutase. *Mol. Cells* **2017**, *40*, 542–549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Verjans, R.; Peters, T.; Beaumont, F.J.; van Leeuwen, R.; van Herwaarden, T.; Verhesen, W.; Munts, C.; Bijnen, M.; Henkens, M.; Diez, J.; et al. MicroRNA-221/222 Family Counteracts Myocardial Fibrosis in Pressure Overload-Induced Heart Failure. *Hypertension* **2018**, *71*, 280–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Allen-Rhoades, W.; Kurenbekova, L.; Satterfield, L.; Parikh, N.; Fuja, D.; Shuck, R.L.; Rainusso, N.; Trucco, M.; Barkauskas, D.A.; Jo, E.; et al. Cross-species identification of a plasma microRNA signature for detection, therapeutic monitoring; and prognosis in osteosarcoma. *Cancer Med.* **2015**, *4*, 977–988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kocijan, R.; Muschitz, C.; Geiger, E.; Skalicky, S.; Baierl, A.; Dormann, R.; Plachel, F.; Feichtinger, X.; Heimel, P.; Fahrleitner-Pammer, A.; et al. Circulating microRNA signatures in patients with idiopathic and postmenopausal osteoporosis and fragility fractures. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2016**, *101*, 4125–4134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. 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*, 1095–1104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Zhu, S.; Cao, L.; Zhu, J.; Kong, L.; Jin, J.; Qian, L.; Zhu, C.; Hu, X.; Li, M.; Guo, X.; et al. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

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

Emilie Dubois-Deruy¹, Marie Cuvellez¹, Jan Fiedler², Henri Charrier¹, Paul Mulder³, Eleonore Hebbbar¹, Angelika Pfanne², Olivia Beseme¹, Maggy Chwastyniak¹, Philippe Amouyel^{1,4}, Vincent Richard³, Christophe Bauters^{1,4}, Thomas Thum² & Florence Pinet¹

Although several risk factors such as infarct size have been identified, the progression of heart failure (HF) remains difficult to predict in clinical practice. Using an experimental rat model of post-myocardial infarction (MI), we previously identified 45 proteins differentially modulated during HF by proteomic analysis. This study sought to identify microRNAs (miRNAs) able to regulate these proteins and to test their relevance as biomarkers for HF. *In silico* bioinformatical analysis selected 13 miRNAs related to the 45 proteins previously identified. These miRNAs were analyzed in the rat and in cohorts of patients phenotyped for left ventricular remodeling (LVR). We identified that 3 miRNAs, miR-21-5p, miR-23a-3p and miR-222-3p, and their target Mn superoxide dismutase (SOD2) were significantly increased in LV and plasma of HF-rats. We found by luciferase activity a direct interaction of miR-222-3p with 3'UTR of SOD2. Transfection of human cardiomyocytes with miR-222-3p mimic or inhibitor induced respectively a decrease and an increase of SOD2 expression. Circulating levels of the 3 miRNAs and their target SOD2 were associated with high LVR post-MI in REVE-2 patients. We demonstrated for the first time the potential of microRNAs regulating SOD2 as new circulating biomarkers of HF.

Chronic heart failure (HF) remains a major cause of illness and death and its prevalence is increasing with a high rate of morbidity and mortality¹. Despite major significant advances, HF remains a therapeutic challenge, and several adverse consequences of HF are still poorly controlled. New prognostic or diagnostic biomarkers of HF are still important to find and proteomic approaches associated with bioinformatic tools may be useful².

Novel determinants of post-myocardial infarction (MI)-HF were already revealed by previous proteomic³ and phosphoproteomic⁴ approaches using an experimental rat model of HF. We especially discovered that HF is associated with decreased levels of serine²⁰⁸-phosphorylated troponin T (TnTpS208) in left ventricle (LV) and plasma of HF-rats. The same decrease was found in patients with high left ventricular remodeling (LVR) after MI, suggesting that the level of circulating TnTpS208 could be a new biomarker of LVR and may help to predict the development of HF after MI⁵.

MicroRNAs (miRNAs) are non-coding RNAs identified as regulatory molecules consisting of 19 to 23 nucleotides that regulate gene expression by hybridization to messenger RNAs with the consequence of its degradation or translational inhibition of targeted transcripts⁶. miRNAs are highly conserved and play a role in many biological processes such as cell-cell communication⁷ or signalling pathways⁸. miRNAs, some with a tissue- and pathology-specific expression, could be involved in several cardiovascular pathologies such as cardiac hypertrophy^{9,10}, adverse cardiac remodeling^{11,12} or HF^{11,13}. miRNAs can be secreted in either protein-bound or vesicle-enclosed forms from the cells into the circulation, suggesting their potential as biomarkers in molecular diagnostics¹³. These previous studies suggest that levels of circulating miRNAs may depend on several aspects not directly related to disease states, such as miRNA tissue specificity, mechanisms of release and retention, mechanisms of transport onto the bloodstream and pathways of degradation.

Up to now, we failed to identify miRNAs, such as miR-133a and miR-423-5p, as circulating prognostic biomarkers of cardiac remodelling post-MI¹⁴. Our strategy was to use bioinformatics tools such as Ingenuity Pathway

¹INSERM, U1167, FHU-REMOD-HF, Institut Pasteur de Lille, University Lille Nord de France, 59800, Lille, France.

²Institute of Molecular and Translational Therapeutic Strategies (IMTTS), IFB-Tx, Hannover Medical School, Hannover, Germany. ³Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1096, FHU-REMOD-HF, 76000, Rouen, France. ⁴Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, 59800, Lille, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.P. (email: florence.pinet@pasteur-lille.fr)

Analysis (IPA) to integrate our proteomic data obtained in the experimental rat model of HF in order to decipher miRNAs interacting directly or indirectly with the 45 proteins found to be differentially modulated. Interestingly, we evidenced 17 proteins involved in oxidative stress and metabolism³. Among them, we focused on superoxide dismutase [Mn], mitochondrial (SOD2), a major antioxidant enzyme, notably described for protecting the morphology of the diabetic heart and completely normalizing contractility in diabetic cardiomyocytes¹⁵.

The purpose of this work was i) to select by bioinformatics miRNAs interacting with proteins identified by proteomic analysis to be modulated by HF in the rat model, ii) to validate the LV expression and modulation of these selected miRNAs, iii) to determine whether circulating plasma levels of miRNAs match with heart specificity in order to improve our understanding of relationship between LV tissue levels and plasma levels; iv) to characterize how they affect SOD2 expression in cardiomyocytes and, v) to confirm their potential as biomarkers of cardiac remodeling by quantification of circulating plasma levels of the miRNAs and SOD2 in human patients phenotyped for LV remodeling.

Results

Identification of candidate miRNAs for heart failure. A total of 63 rats were included in the analysis; 15 were sacrificed 7 days after surgery (8 sham and 7MI) and 48 were sacrificed 2 months after surgery (25 sham and 23 MI). Detailed echocardiographic, hemodynamic and morphometric parameters of sham- and MI-rats are provided (Table 1). Briefly, 7 days after MI, a significant increase in heart weight was already observed. After 2 months, MI induced classic signs of HF, i.e. significant increases in LV diameters and LV end-diastolic pressure, as well as marked decreases in LV fractional shortening, LV dP/dt and cardiac output, associated with significant cardiac hypertrophy.

We previously identified by proteomic analysis and mass spectrometry 26 proteins differentially expressed³ (Fig. 1A) and 30 proteins differentially phosphorylated⁴ in LV of 2 months HF-rats. These proteins were overlaid onto a global molecular network in the IPA Knowledge Base in order to select miRNAs interacting with the proteins identified by proteomic analysis (Supplementary Table 2). IPA analysis identified interactions between 8 proteins and 13 miRNAs (Supplementary Table 2). We found a significant increase in SOD2 protein in LV (Fig. 1B) but no modulation of SOD2 mRNA (Fig. 1C). Interestingly, SOD2 is regulated by 5 of 13 miRNAs selected by IPA, i.e. miR-21-3p, miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-145-5p and miR-222-3p (Fig. 1A).

We quantified expression of the 13 miRNAs in LV of 7 days and 2 months MI-rats. Unfortunately, we could not deepen the cluster between peroxiredoxin-2, protein disulfide isomerase and the miR-122-5p and miR-210 due to a lack of specificity of different primers tested (not shown). Among the 11 miRNAs quantified, 4 were not modulated after 7 days or 2 months MI: miR-29b-3p, miR-338-3p, miR-133a and miR-483-3p interacting respectively with tropomyosin alpha-1 chain, pyruvate kinase PKM and phosphoglycerate mutase 1 (Fig. 1B–E). Moreover, we observed a significant increase in miR-320a and in miR-377-5p in LV of HF-rats respectively in 7 days and 2 months MI-rats (Fig. 1F–G).

Post-transcriptional regulators of SOD2 expression. First, we quantified the 5 miRNAs identified to be associated to SOD2 by IPA analysis. Expression of miR-145-5p was significantly increased in 2 months-rats compared to 7 days-rats (Fig. 1A). We observed a significantly increased expression of the 4 other miRNAs in LV, at 7 days post-MI for miR-23a-3p (Fig. 1D), at 2 months post-MI for miR-21-5p (Fig. 1D) and miR-21-3p (Fig. 1A) and at both times for miR-222-3p (Fig. 1D).

We next quantified these 4 miRNAs in plasma of the same animals. We were unable to quantify detectable levels of miR-21-3p. Interestingly, miR-21-5p, miR-23a-3p and miR-222-3p were significantly decreased in the plasma of 7 days MI-rats and significantly increased at 2 months post-MI (Fig. 1E) without any modulation of SOD2 in plasma of HF-rats (not shown).

Role of SOD2 and its post-transcriptional regulators in cardiac hypertrophy. We investigated the role of SOD2 during cardiac hypertrophy in H9c2 cells (Fig. 2A–C). First, we validated that Isoproterenol (Iso) (10 μ M) induces hypertrophy verified by the significant increased cell area at both 24 h and 48 h (Fig. 2A). Interestingly, we observed a significant increase in SOD2 protein expression only after 48 h Iso (Fig. 2B), despite no modulation of SOD2 mRNA or of the 3 miRNAs (data not shown). With MitoSOX probe, we observed a significant increase in mitochondrial superoxide anion levels quantified after 24 h of hypertrophy as expected. On the contrary, after 48 h Iso, superoxide anion production was significantly decreased (Fig. 2C), validating an activation of SOD2 at this time.

We then analyzed the role of SOD2 on hypertrophy and oxidative stress by silencing it in H9c2 cells (Fig. 2D–F). First, we validated that SOD2 siRNA transfected in H9c2 cells induced a significant decrease in SOD2 protein expression (Fig. 2D). Interestingly, we observed that SOD2 silencing induced significantly hypertrophy and oxidative stress quantified respectively, by the cell area (Fig. 2E) and the mitochondrial superoxide anion levels (Fig. 2F).

miR-222-3p is a post-transcriptional regulator of SOD2. Among the 3 miRNAs identified to interact with SOD2 in our experimental rat model of HF, only miR-222-3p was predicted to directly interact with SOD2 in human (Fig. 2G). To confirm this interaction, we cloned human SOD2 3'UTR (untranslated region) harboring two potential binding sites for miR-222-3p in HEK293 cells. Cotransfection of miR-222-3p mimic with human SOD2 3'UTR induced a significant decrease in luciferase expression, suggesting that miR-222-3p binds to SOD2 3'UTR (Fig. 2G).

We then used miR-222-3p mimic and inhibitor to analyze the impact of miR-222-3p on SOD2 expression in human Cytivia plus cardiomyocytes. We first validated the efficiency of transfection of miR-222-3p mimic and inhibitor (not shown). We observed that miR-222-3p mimic induced a significant decrease in SOD2 protein

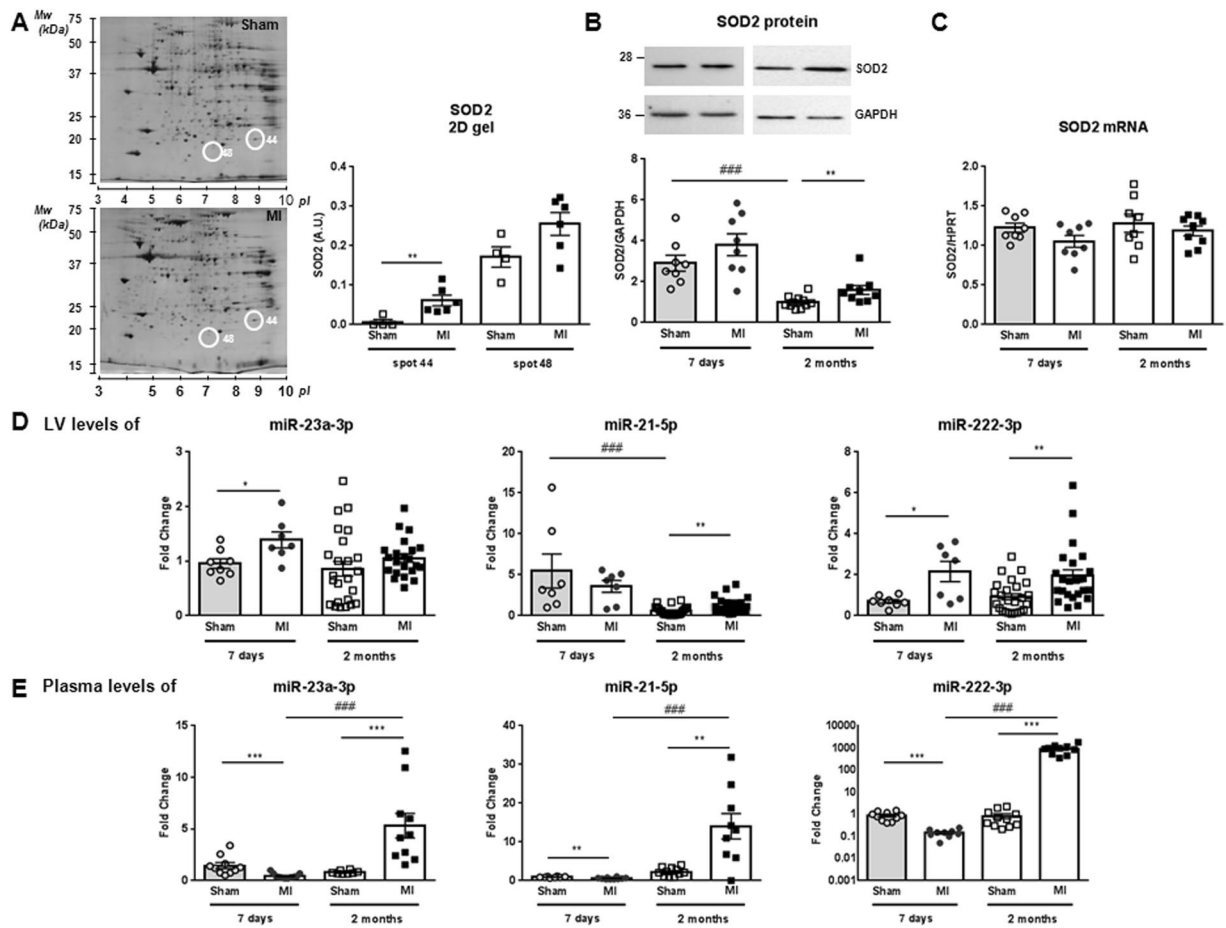


Figure 1. SOD2 and miRNAs expression in LV and plasma of MI-rats. (A) Representative 2D-gel of rat LV proteins from sham and 2-months MI-rats (left panel). The positions of molecular weight (Mw) are indicated on the left and the *pI* on the bottom of the gels. Spots identified by mass spectrometry as SOD2 are encircled. Spots number correspond to proteomic analysis previously published³. Quantification of the 2 spots corresponding to SOD2 was obtained from 4 sham- and 6 MI-rats (right panel). (B) Representative western blot of SOD2 protein in LV extracted from rat 7 days (circle, *n* = 8) and 2 months (square, *n* = 8) after MI (*n* = 16) or sham (*n* = 16) surgery. Data were normalized to GAPDH for western blot. (C) RT-qPCR of SOD2 mRNA in LV extracted from rat 7 days (circle, *n* = 8) and 2 months (square, *n* = 8) after MI (*n* = 16) or sham surgery (*n* = 16). Data were normalized to HPRT for RT-qPCR. (D) RT-qPCR of miR-21-5p, miR-23a-3p and miR-222-3p in LV extracted from rat 7 days (circle, *n* = 8) and 2 months (square, *n* = 8) after MI (*n* = 16) or sham (*n* = 16) surgery. Data were normalized to miR-423-3p for LV and graph shows mean \pm SEM values expressed as fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). (E) RT-qPCR of miR-21-5p, miR-23a-3p and miR-222-3p in plasma extracted from rat 7 days (circle, *n* = 9) and 2 months (square, *n* = 9) after MI (*n* = 18) or sham (*n* = 18) surgery. Data were normalized to Cel-39 for plasma and graph shows mean \pm SEM values expressed as fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001, for 2 groups' comparison (nonparametric Mann-Whitney test) and ###*p* < 0.001, for multiple groups' comparison (Kruskall-Wallis with Dunn's multiple comparison test).

expression (Fig. 2H, top panel) counteracted by Iso treatment (Fig. 2H, lower panel). Conversely, miR-222-3p inhibitor induced a significant increase in SOD2 protein expression (Fig. 2I, left panel) not affected by Iso treatment (Fig. 2I, right panel).

Circulating miRNAs interacting with SOD2 as prognostic biomarkers of HF. Our studies based on *in vivo* rat experimental model and *in vitro* cardiomyocyte models prompted us to assess levels of circulating SOD2 and interacting miRNAs (miR-21-5p, miR-23a-3p and miR-222-3p) in patients with high LV remodeling following MI.

For that purpose, we used blood samples obtained in REVE-2 ("REmodelage VEntriculaire"–2) study¹⁶. REVE-2 was a multicenter study that enrolled 246 patients with a first anterior wall Q-wave MI followed for one year with serial echographic studies and blood sampling at hospital discharge (baseline) then 3 months and 1 year after MI. REVE-2 patients were divided as no remodeling (LVR < 20%) and high remodeling (LVR > 20%) patients according to the LV remodeling determined as ((EDV1year – EDVbaseline)/EDVbaseline). Baseline characteristics of REVE-2 patients are described in Table 1.

Characteristics	All	men	Women
n	246	200	46
Age, yr (mean \pm SD)	57 \pm 14	56 \pm 13	62 \pm 15
Diabetes mellitus	51 (21%)	46 (23%)	5 (11%)
Initial reperfusion therapy			
Primary percutaneous coronary intervention	128 (52%)	106 (43%)	22 (48%)
Thrombolysis alone	28 (11%)	23 (9%)	5 (11%)
Thrombolysis and rescue percutaneous intervention	59 (24%)	50 (20%)	9 (20%)
No reperfusion	31 (13%)	21 (11%)	10 (22%)
Peak creatinine kinase, IU (mean \pm SD)	3018 \pm 2376	3099 \pm 2483	2666 \pm 1824
HF (Killip class \geq 2) during hospitalization	79 (32%)	65 (33%)	14 (30%)
LVEF, % (mean \pm SD)	49 \pm 8	49 \pm 8	51 \pm 9
Medications at discharge			
Antiplatelet therapy	246 (100%)	200 (100%)	46 (100%)
β -blockers	238 (97%)	194 (97%)	44 (96%)
ACE inhibitors	238 (97%)	193 (97%)	45 (98%)
Statins	231 (94%)	189 (95%)	42 (91%)
One-year echocardiography follow-up			
Number of patients with follow-up	223 (92%)	182 (91%)	44 (96%)
LV remodeling*, n	87 (38.5%#)	67 (36.8%#)	20 (45.5%#)

Table 1. Characteristics of the patients included in the REVE-2 study (n = 246). ACE indicates angiotensin-converting enzyme; HF, heart failure; IU, International units; LV, left ventricular; LVEDV, left ventricular end-diastolic volume; and LVEF, left ventricular ejection fraction. *Defined as a $>20\%$ change in LVEDV between baseline and 12 months. #Of the patients with echocardiographic follow-up.

SOD2 was quantified in the plasma of REVE-2 patients at 3 months and 1 year post-MI (Fig. 3). We found a significant increase in patients with high remodeling only at 1 year post-MI (Fig. 3A, left panel). We then quantified the 3 miRNAs predicted by IPA to interact with SOD2 (Supplementary Table 2). Interestingly, the REVE-2 molecular network previously built with 23 circulating molecules quantified in blood samples of REVE-2 patients, shows that these 3 miRNAs were highly central molecules with the highest betweenness centrality for miR-21-5p and miR-222-3p¹⁷, indicating that they are crucial molecules to maintain functionality and coherence of signaling mechanisms in the REVE-2 network. We also identified direct interaction between miR-222-3p, SOD2 and other molecules in the REVE-2 network at baseline (Fig. 3B, details are provided Fig. 2 and Supplementary Table 3). The 3 miRNAs were then quantified at baseline (i.e. hospital discharge), 3 months and 1 year post-MI in REVE-2 patients. We found a significant decrease in plasma levels of miR-222-3p (Fig. 3C, left panel), miR-21-5p and miR-23a-3p (Fig. 3) at baseline (i.e. hospital discharge) in patients with high remodeling compared to low remodeling following MI. Conversely, we observed a significant increase of the 3 miRNAs in patients with high remodeling at 3 months post-MI and no modulation at 1 year post-MI (Fig. 3C, left panel and Fig. 3).

To understand why the levels of the 3 miRNAs and their target, SOD2 are modulated in the same way, we analyzed deeper the REVE-2 molecular network and found an interaction of miR-222-3p with the estrogen receptor 1, located in cluster 22 and characterized by a high betweenness (0.0096), indicating a potential central role of estrogen receptor with miR-222-3p in the REVE-2 network (Supplementary Table 3). Interestingly, the analysis taking into account the gender in REVE-2 population showed significant higher levels of SOD2 in men compared to women (Fig. 3A, right panel). Interestingly, the significant modulation of circulating levels of SOD2 is restricted to women with high remodeling at 3 months and 1 year (Fig. 3A, right panel). Conversely, the significant increase of circulating levels of miR-222-3p is only found in men at 3 months post-MI (Fig. 3C, right panel). The same information was found for the circulating levels of miR-21-5p (Fig. 3A, right panel). Moreover, we observed a significant correlation between circulating levels of SOD2 and of miR-222-3p quantified at 3 months post-MI in the whole REVE-2 population and men population but not in women population (Fig. 3D). The same information was found for the circulating levels of miR-21-5p (Fig. 3A, bottom panel) and miR-23a-3p (Fig. 3B, bottom panel).

Discussion

We used a well-characterized model of HF-rat, together with echocardiographic and hemodynamic measurements to identify 45 proteins differentially modulated by HF (e.g. expression and/or phosphorylation levels)^{3,4}. Using IPA tools, we selected miRNAs interacting directly or indirectly with these 45 proteins. Indeed, miRNAs are small non-coding RNAs that control various biological processes through affecting the stability and translation of targets mRNAs. IPA analysis identified interactions between 8 proteins and 13 miRNAs. Interestingly, SOD2 is regulated by 5 of the 13 miRNAs.

SOD2 is a well-known antioxidant enzyme, which binds to the superoxide anions to convert them to hydrogen peroxide and oxygen. An increase in SOD2 expression could be beneficial by decreasing reactive oxygen species production as it was described in other diseases such as diabetes. In this pathology, SOD2 protects the morphology of the heart and completely normalizes contractility in cardiomyocytes¹⁵. Using an *in vitro*

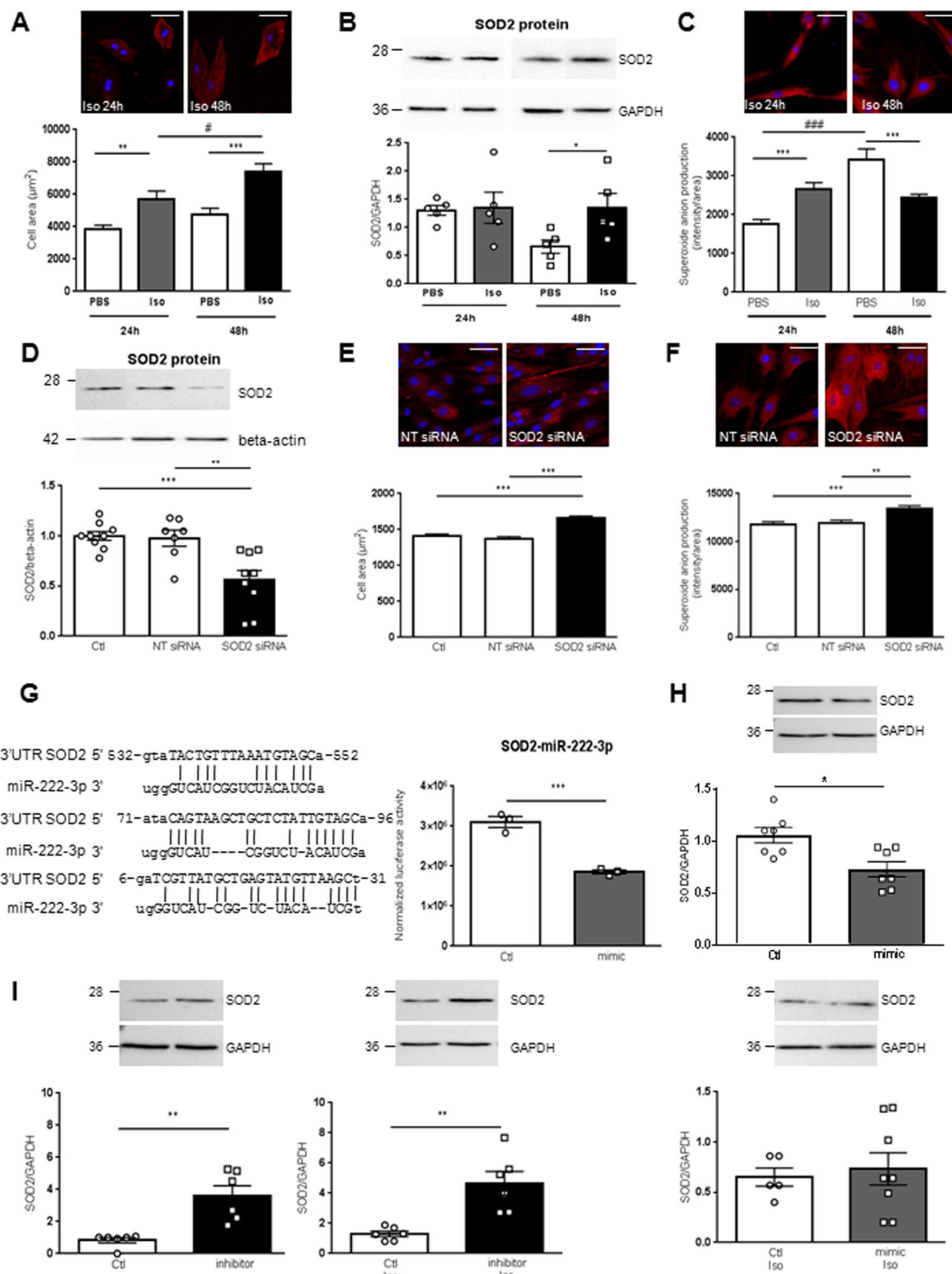


Figure 2. Role of SOD2 and its post-transcriptional regulators in cardiac hypertrophy. (A) Representative immunofluorescence of alpha-actinin (red) in H9c2 cardiomyoblasts Iso treated for 24 h and 48 h (top panel). Quantification after 24 h and 48 h of cell area was performed from 3 independent experiments and at least 28 cells untreated (PBS) or Iso treated. Graph shows mean \pm SEM values expressed as cell area (μm^2) (lower panel). (B) Representative western blot of SOD2 protein in H9c2 cardiomyoblasts untreated or Iso treated for 24 h and 48 h (top panel). Quantification was performed from at least 4 independent experiments. Data were normalized to GAPDH and graph shows mean \pm SEM values expressed as SOD2/GAPDH (lower panel). (C) Representative immunofluorescence of mitoSOX (red) in H9c2 cardiomyoblasts Iso treated for 24 h and 48 h. Mitochondrial superoxide anion production was quantified from 3 independent experiments and at least 60 cells. Graph shows mean \pm SEM values expressed as superoxide anion production intensity/cell area (lower panel). (D) Representative western blot of SOD2 protein in H9c2 cardiomyoblasts control (Ctl: only DharmaFECT[®] reagent) or transfected with non-target (NT siRNA) or SOD2 siRNA for 72 h (top panel).

Quantification of SOD2 was performed from at least 5 independent experiments. Data were normalized to beta-actin and graph shows mean \pm SEM values expressed as SOD2/beta-actin (lower panel). (E) Representative immunofluorescence of alpha-actinin (red) performed in H9c2 cardiomyoblasts Ctl or transfected with NT or SOD2 siRNA for 72 h (top panel). Quantification of cell area was performed from 3 independent experiments and at least 193 cells. Red intensity measured for each cell was normalized to the cell area and graph shows mean \pm SEM values expressed as cell area (μm^2) (lower panel). (F) Representative immunofluorescence of mitoSOX (red) performed in H9c2 cardiomyoblasts Ctl or transfected with NT or SOD2 siRNA for 72 h (top panel). Mitochondrial superoxide anion production was quantified from 3 independent experiments and at least 182 cells. Red intensity measured for each cell was normalized to the cell area and graph shows mean \pm SEM values expressed as superoxide anion production intensity/cell area (lower panel). Nuclei were stained with Hoechst (blue). Scale bar is 50 μm (A, C, E, F). (G) Sequence of the three binding sites of miR-222-3p identified on human 3'-UTR SOD2 with miRTarBase (Release 6.0: Sept. 15, 2015) (left panel). Quantification of luciferase activity in HEK293 cells after transfection of control (white) and miR-222-3p mimic (grey) (right panel). Data were obtained from 3 independent experiments and graph shows mean \pm SEM values expressed as normalized luciferase activity. (H) Representative western blot of SOD2 in human cardiomyocytes either control (white) or transfected by miR-222-3p mimic (grey) in untreated (top panel) or treated with Iso for 48 h (lower panel). Quantification of SOD2 in human cardiomyocytes was obtained from 4 independent experiments. Data were normalized to GAPDH and graph shows mean \pm SEM values expressed as SOD2/GAPDH. (I) Representative western blot of SOD2 in human cardiomyocytes either control (white) or transfected by miR-222-3p inhibitor (black) in untreated (left panel) or treated with Iso for 48 h (right panel). Quantification of SOD2 in human cardiomyocytes was obtained from 4 independent experiments. Data were normalized to GAPDH and graph shows mean \pm SEM values expressed as SOD2/GAPDH * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

model of hypertrophied cardiomyocytes, we found an increase of SOD2 expression associated with decrease of superoxide anion production. Conversely, silencing SOD2 in this model induced hypertrophy and increased superoxide anion production. Despite a high increase in oxidative stress after MI, the role of SOD2 and its post-transcriptional regulators in LVR and HF are still unknown. Here, we focused on 3 miRNAs, miR-21-5p, miR-23a-3p and miR-222-3p and their target SOD2, detected in plasma that we characterized for their potential as biomarkers of HF.

Little is known about the role of miR-23a in cardiovascular diseases, with the exception of a correlation between miR-23a and pulmonary function of patients with idiopathic pulmonary hypertension¹⁸. In our study, miR-23a-3p increased in LV of HF-rats only at 7 days post MI. miR-21 is highly expressed in most of the cardiovascular cells, especially cardiomyocytes and cardiac fibroblasts⁷. In this study, we observed an increase in miR-21-5p in HF-rats, in accordance with previous reports showing an upregulation of miR-21 in HF with preserved LV ejection fraction¹⁹ or in fibroblasts of hypertrophied hearts²⁰. In most of these studies, miR-21 is associated with an anti-apoptotic effect^{19,21}.

MiR-222 has been described to induce cardiomyocytes proliferation and hypertrophy and inhibit apoptosis²². Here, we quantified an increase in miR-222-3p expression in HF-rats, in accordance with a previous study showing an increase in miR-222 during physiological hypertrophy at cell and plasma levels²². Our *in silico* analysis suggested that only miR-222-3p directly interacts with the 3'-UTR of SOD2. This interaction was already described in oral tongue squamous cell carcinoma cell line²³. We confirmed this interaction using luciferase reporter gene assays and transfection of miR-222-3p mimic and inhibitor in human cardiomyocytes.

Despite tissue- and pathology-specificity of miRNAs expression, we failed to identify miRNAs, such as miR-133a and miR-423-5p, as circulating prognostic biomarkers of cardiac remodelling post-MI¹⁴. Another class of non-coding RNAs, long noncoding RNAs (lncRNAs) has been tested successfully in REVE-2 study. We recently described a downregulation of a mitochondrial lncRNA uc022bqs.1, called LIPCAR, early after MI and an upregulation during later stages²⁴. LIPCAR is a novel biomarker of cardiac remodeling and predict future death in patients with HF²⁴, suggesting potential interest of non-coding RNAs as biomarkers in molecular diagnostics. SOD2 mRNA was recently reported for predicting worse prognosis of patients with untreated classical Hodgkin lymphoma²⁵.

Interestingly, by analysing separately women and men in REVE-2 population, we observed that the increase in circulating levels of miRNAs was only significant in men whereas the circulating levels of SOD2 were only increased significantly in women. Our results were supported by previous data showing that estradiol (E2) treatment significantly increases the expression of SOD2 both in mice and in human aorta endothelial cells leading to a decrease in oxidative stress²⁶. This could explain why we did not observe any plasmatic modulation of SOD2 in the rat MI model as only male were used.

In this study, we showed for the first time, that levels of circulating miR-21-5p, miR-23a-3p and miR-222-3p decrease in patients with high remodeling at baseline and increase at 3 months post-MI. Our data shows the potential of miR-21-5p, miR23a-3p and miR-222-3p, and their target SOD2, as new biomarkers of post-MI HF.

Conclusion and perspectives. In this study, we found i) the modulation of 3 miRNAs selected *in silico* to interact with SOD2 in LV and plasma of the experimental rat model of HF and a significant increase of SOD2 in LV of 2 months post-MI rats; ii) that the circulating levels of the 3 miRNAs were differentially modulated compared to LV at 7 days post-MI, suggesting that plasma expression does not completely reflect the heart specificity at early phase of LV remodeling; iii) how miR-222-3p modulated SOD2 in hypertrophied cardiomyocytes and iv) confirmed their potential as biomarkers of cardiac remodeling in human patients phenotyped for LV remodeling post-MI with gender specificity shown by significant modulation of miR-222-3p in men and of SOD2 in women

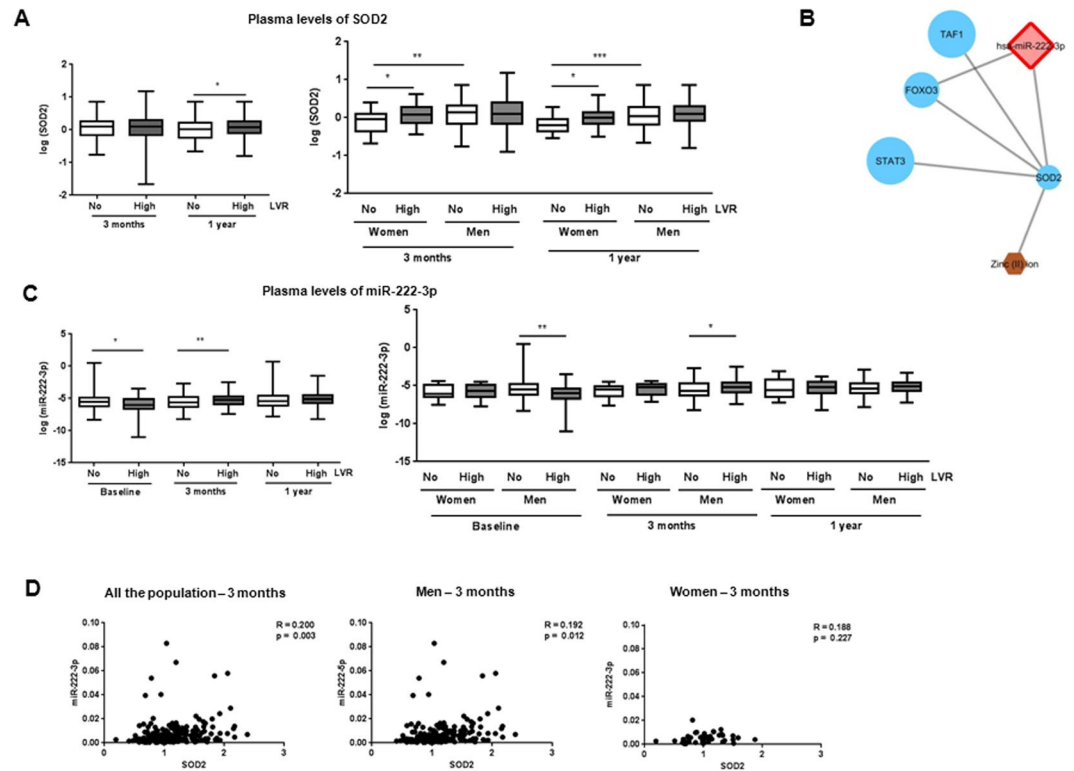


Figure 3. Circulating SOD2 and miRNAs plasma levels of REVE-2 patients. REVE-2 was a multicenter study that enrolled 246 patients with anterior wall Q-wave MI followed for one year with serial echographic studies at hospital discharge (day 3 to day 7) then 3 months and 1 year after MI and serial blood sampling at hospital discharge then 1 month, 3 months, and 1 year after MI. REVE-2 patients ($n = 224$) were divided as no remodelers (LVR $< 20\%$, $n = 138$) (white) and high remodelers (LVR $> 20\%$, $n = 86$) (grey), according to the LV remodeling determined as $((EDV_{1year} - EDV_{baseline})/EDV_{baseline})$. (A) Quantification by ELISA of SOD2 in plasma from no LV remodeling (white, $n = 138$) and high LV remodeling (grey, $n = 86$) patients after 3 months and 1 year post-MI for all the population (left panel). Analysis were also performed by separating women ($n = 46$, 24 no LVR and 20 high LVR) and men ($n = 200$, 114 with no LVR and 66 with LVR) (right panel). Data are expressed as log (SOD2) and are represented in box plot with the central rectangle for the interquartile range, the segment inside the rectangle for the median and the segment outside for the minimum and maximum. (B) Visualization of the REVE-2 molecular network model¹⁷ at baseline centralized on direct miR-222-3p interaction. Detailed information are provided as Fig. 2 and Supplementary Table 3. (C) Quantification by RT-qPCR of miR-222-3p in plasma extracted from REVE-2 patients at baseline and after 3 months and 1 year post-MI for all the population (left panel). Analysis were also performed by separating women ($n = 46$, 24 no LVR and 20 high LVR) and men ($n = 200$, 114 with no LVR and 66 with LVR) (right panel). Data are expressed as log (miR/cel39) and are represented in box plot with the central rectangle for the interquartile range, the segment inside the rectangle for the median and the segment outside for the minimum and maximum. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to no LV remodeling patients. (D) Pearson correlations between SOD2 and miR-222-3p in REVE-2 patients. The scatter plots show the correlation between SOD2 and miR-222-3p plasma levels at 3 month post-MI for all REVE-2 population ($n = 246$) (left panel), for men ($n = 200$) (middle panel) and women ($n = 46$) (right panel).

(Fig. 4). Future works need to deepen the role of SOD2 regulation, notably by the estrogen receptors, and the mechanisms of transport of miRNAs from heart onto bloodstream in the pathophysiology of LVR and HF.

Methods

A detailed methods section is available as supplemental. All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations and all experimental and ethic protocols were approved by Inserm.

Animal models. Animals were used and experimental protocols performed under the supervision of a person authorized to perform experiments on live animals (F. Pinet: 59-350126 and E. Dubois-Deruy: 59-350253). Approval was granted by the institutional ethics review board (CEEA Nord Pas-de-Calais N°242011, January 2012). MI was induced in 10-week-old male Wistar rats ($n = 63$) (Janvier, Le Genest St isle, France) by ligation of the left anterior descending coronary artery^{27,28}. Haemodynamic and echocardiographic measurements (Table 1) were taken 7 days and 2 months after surgery, followed by heart excision and plasma sampling, as previously described^{4,29}.

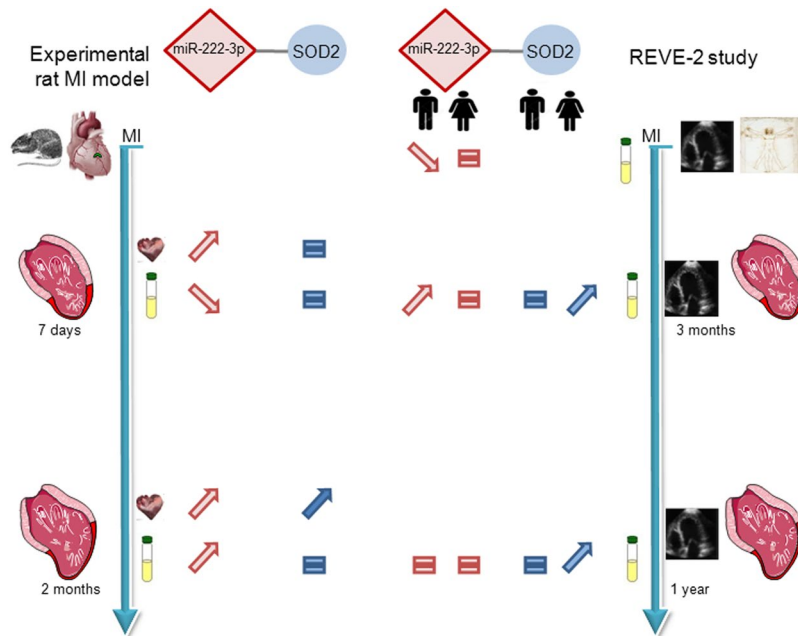


Figure 4. Summary of expression of miR-222-3p and one of its targets SOD2. miR-222-3p and SOD2 were quantified in LV and plasma of experimental model of MI rat at 7 days ($n = 9$) and 2 months ($n = 9$) after MI ($n = 18$) or sham ($n = 18$) surgery. The circulating levels of miR-222-3p and SOD2 were quantified in plasma of REVE-2 patients ($n = 224$) respectively at baseline, 3 months, 1 year post-MI and 3 months and 1 year post-MI. Analysis were performed by separating women ($n = 46$, 24 no LVR and 20 high LVR) and men ($n = 200$, 114 with no LVR and 66 with LVR).

Bioinformatical analysis. Differentially regulated proteins previously identified by mass spectrometry^{3,4} were further analyzed using Ingenuity Pathway Analysis (IPA, www.ingenuity.com, Winter Release 2012, Ingenuity Systems, Mountain View, CA) (Supplementary Table 2). Networks of these focus proteins were algorithmically generated by including as many focus proteins as possible and other non-focus proteins from the database that are needed to generate the network based on connectivity. Here, we focused our analysis on miRNAs with high predicted and experimentally observed selection by IPA.

Human samples. REVE-2 was a multicenter study that enrolled 246 patients with anterior wall Q-wave MI from 8 centers in France from February 2006 to September 2008¹⁶. The research protocol was approved by the ethics committee of the “Centre Hospitalier et Universitaire de Lille” (CP05/91 of December 13th 2005, Lille, France), and written informed consent was obtained from each patient. The protocol required serial echographic studies at hospital discharge (day 3 to day 7) then 3 months and 1 year after MI; serial blood sampling was performed at hospital discharge then 1 month, 3 months, and 1 year after MI. Baseline characteristics of REVE-2 population are summarized in Table 1. REVE-2 patients were divided as no remodeling ($LVR < 20\%$) and high remodeling ($LVR > 20\%$) according to the LV remodeling determined as $((EDV_{1year} - EDV_{baseline})/EDV_{baseline})$.

Cell Culture. The rat embryonic-heart derived H9c2 cell line (ATCC, CRL-1446) were used followed manufacturer’s instructions. The human embryonic-heart derived Cytivia Plus Cardiomyocytes (GE Healthcare, 29-0918-80) were used following manufacturer’s instructions. Cells were then treated with Isoproterenol (Iso, 10 μ M) in serum-free medium for 24 h and 48 h.

Luciferase Reporter Assay. Human SOD2 3’UTR (824 bp) harboring two potential binding sites for miR-222-3p was cloned into SpeI and HindIII cloning site of pMIR-REPORT vector (Ambion). The resulting construct (20 ng) was co-transfected with control mirVana mimic or mirVana mimic miR-222-3p (each 30 nM, ThermoFisher Scientific) and 20 ng of β -galactosidase control plasmid (Promega) into 48well-plated HEK293 reporter cells by the use of Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Cells were incubated for 24 h before detecting luciferase and β -galactosidase activity applying different substrates (Promega).

Transfection. SOD2 siRNA. The specific siRNA specifically targeting rat SOD2 mRNA (SOD2 siRNA) and non-targeting control (NT siRNA) were used (ON-TARGETplus Rat Sod2 (24787) siRNA - SMARTpool, #L-080048-02-0010, Dharmacon, GE Healthcare). H9c2 were plated (300,000 cells/well) in 6-well plates and were allowed to grow for 24 h without antibiotics. SOD2 or NT siRNA (25 nmol/L) were transfected with the DharmaFECT[®] reagent (4 μ L) according to the manufacturer’s recommendations. Total cell extracts were collected 72 h after transfection.

miR-222-3p modulation. The specific miR-222 mimic and miR-222 inhibitor and negative control were used (miRVana, Life Technologies). Cytivia Plus cardiomyocytes were plated (200,000 cells/well) in 6-well plates and were allowed to grow for 1 week in RPMI supplemented with 2% (v/v) B27. MiR-222 mimic, miR-222 inhibitor and their negative control (100 nmol/L) were transfected with the Lipofectamine 2000 (Life Technologies) reagent (4 μ L) in OptiMEM (Life Technologies). Medium was changed for RPMI supplemented with 2% (v/v) B27 6 h after transfection. Cells were treated with Iso 10 μ M 24 h after transfection. Total cell extracts were collected 72 h after transfection.

Statistical analysis. For cell culture and animal model, data are expressed as means \pm SEM and analysed with GraphPad software. Data were compared using non parametric Mann–Whitney test for 2 groups' comparison and using Kruskal–Wallis with Dunn's multiple comparison test for multiple groups' comparison. Statistical significance was accepted at a p value < 0.05 .

For Human studies, the levels of miRs and SOD2 were log-transformed and compared between high remodelers ($>20\%$ change in LVEDV between baseline and 1 year) and non-remodelers ($<20\%$ change in LVEDV between baseline and 1 year). We used a logistic regression adjusted for age, sex, and baseline LVEDV. All statistical analyses were performed using the STATA 14.1 software (STATA Corporation, College Station, Texas, USA). For analyzing correlation between the circulating levels of SOD2 and miRNAs, we used the Pearson correlation coefficient test. Statistical significance was assumed at a p value < 0.05 .

References

1. Benjamin, E. J. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **135**, e146–e603 (2017).
2. Lindsey, M. L. *et al.* Transformative Impact of Proteomics on Cardiovascular Health and Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* **132**, 852–872 (2015).
3. Cieniewski-Bernard, C. *et al.* Proteomic Analysis of Left Ventricular Remodeling in an Experimental Model of Heart Failure. *J. Proteome Res.* **7**, 5004–5016 (2008).
4. Dubois, E. *et al.* Decreased Serine207 phosphorylation of troponin T as a biomarker for left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **32**, 115–123 (2011).
5. Dubois-Deruy, E. *et al.* Interplay between troponin T phosphorylation and O-N-acetylglucosaminylation in ischaemic heart failure. *Cardiovasc. Res.* **107**, 56–65 (2015).
6. Ambros, V. microRNAs: Tiny Regulators with Great Potential. *Cell* **107**, 823–826 (2001).
7. Bang, C. *et al.* Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *J. Clin. Invest.* **124**, 2136–2146 (2014).
8. Van Rooij, E. *et al.* Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* **316**, 575–579 (2007).
9. Sayed, D., Hong, C., Chen, I.-Y., Lypowy, J. & Abdellatif, M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* **100**, 416–424 (2007).
10. Hirt, M. N. *et al.* Deciphering the microRNA signature of pathological cardiac hypertrophy by engineered heart tissue- and sequencing-technology. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **81**, 1–9 (2015).
11. Van Rooij, E. *et al.* A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 18255–1860 (2006).
12. Ucar, A. *et al.* The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy. *Nat. Commun.* **3**, 1078–1088 (2012).
13. Kuosmanen, S. M. *et al.* MicroRNA profiling of pericardial fluid samples from patients with heart failure. *PLoS One* **10**, 1–23 (2015).
14. Bauters, C. *et al.* Circulating miR-133a and miR-423-5p fail as biomarkers for left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* **168**, 1837–1840 (2013).
15. Shen, X., Zheng, S., Metreveli, N. S. & Epstein, P. N. Protection of Cardiac Mitochondria by Overexpression of MnSOD Reduces Diabetic Cardiomyopathy. *Diabetes* **55**, 798–805 (2006).
16. Fertin, M. *et al.* 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.* **106**, 1410–1416 (2010).
17. Pinet, F. *et al.* Integrative network analysis reveals time-dependent molecular events underlying left ventricular remodeling in post-myocardial infarction patients. *BBA-Mol Bas Dis* **1862**, 1445–1453 (2017).
18. Sarrion, I. *et al.* Role of Circulating miRNAs as Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension: Possible Relevance of miR-23a. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, 1–10 (2015).
19. Dong, S. *et al.* microRNA-21 promotes cardiac fibrosis and development of heart failure with preserved left ventricular ejection fraction by up-regulating Bcl-2. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 565–574 (2014).
20. Thum, T. *et al.* MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* **456**, 980–984 (2008).
21. Duan, X. *et al.* Expression of MicroRNA-1 and MicroRNA-21 in different protocols of ischemic conditioning in an isolated rat heart model. *Cardiol.* **122**, 36–43 (2012).
22. Liu, X. *et al.* MiR-222 is necessary for exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. *Cell Metab.* **21**, 584–595 (2015).
23. Liu, X. *et al.* MicroRNA-222 regulates cell invasion by targeting matrix metalloproteinase 1 (MMP1) and manganese superoxide dismutase 2 (SOD2) in tongue squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Genomics and Proteomics* **6**, 134–139 (2009).
24. Kumarswamy, R. *et al.* Circulating Long Noncoding RNA, LIPCAR, Predicts Survival in Patients With Heart Failure Novelty and Significance. *Circ. Res.* **114**, (2014).
25. Karihtala, P., Porvari, K., Soini, Y. & Haapasaaari, K.-M. Redox Regulating Enzymes and Connected MicroRNA Regulators Have Prognostic Value in Classical Hodgkin Lymphomas. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 1–8 (2017).
26. Liu, Z. *et al.* Estradiol improves cardiovascular function through up-regulation of SOD2 on vascular wall. *Redox Biol.* **3**, 88–99 (2014).
27. Pfeffer, M. A., Pfeffer, J. M., Steinberg, C. & Finn, P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation* **72**, 406–412 (1985).
28. Mulder, P. *et al.* Early versus delayed angiotensin-converting enzyme inhibition in experimental chronic heart failure. *Effects on survival, hemodynamics, and cardiovascular remodeling.* *Circulation* **95**, 1314–1319 (1997).
29. Mulder, P. *et al.* Long-term heart rate reduction induced by the selective I(f) current inhibitor ivabradine improves left ventricular function and intrinsic myocardial structure in congestive heart failure. *Circulation* **109**, 1674–1679 (2004).

Acknowledgements

We thank Jean-Paul Henry for the surgical induction of MI in rats. This work was supported by grants from the E.U. FP7 HOMAGE (305507), F-CRIN INI-CRT, ANR 15-CEA-U16/DGOS 15-013 and “Fondation de France”. EDD was supported by grants from “region Hauts de France” and “Institut Pasteur de Lille”. TT was supported by the REBIRTH Excellence cluster and Leducq Foundation.

Author Contributions

E.D.D. designed the study, make experiments and wrote the paper. M.C., J.F., H.C., E.H., A.P., O.B. and M.C. make experiments. P.M. contributed to experimental model. P.A. designed the study. V.R., C.B., T.T. and F.P. designed the study and wrote the paper.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15011-6>.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

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

Running title: *MicroRNAs targeting SOD2 as new biomarkers of HF*

Emilie Dubois-Deruy, PhD^a, Marie Cuvellez, MSC^a, Jan Fiedler, PhD^b, Henri Charrier, MSC^a, Paul Mulder, PhD^c, Eleonore Hebbbar, MD^a, Angelika Pfanne^b, Olivia Beseme, MSC^a, Maggy Chwastyniak, MSC^a, Philippe Amouyel, MD PhD^{a,d}, Vincent Richard, PhD^c, Christophe Bauters, MD^{a,d}, Thomas Thum, MD PhD^b, and Florence Pinet, PhD^{a,*}.

^aINSERM, U1167, FHU-REMOD-HF, Institut Pasteur de Lille, University Lille Nord de France, 59800 Lille, France

^bInstitute of Molecular and Translational Therapeutic Strategies (IMTTS), IFB-Tx, Hannover Medical School, Hannover, Germany

^cNormandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1096, FHU-REMOD-HF, 76000 Rouen, France

^dCentre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, 59800 Lille, France

*Corresponding author:

Dr Florence PINET, INSERM U1167-IPL, 1 rue du professeur Calmette, 59019 Lille cedex, France

Tel: (33) 3 20 87 72 15

Fax: (33) 3 20 87 78 94

E-mail: florence.pinet@pasteur-lille.fr

Detailed Material and methods

All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations and all experimental protocols were approved by Inserm.

Animal models

All animal experiments were performed according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH publication NO1-OD-4-2-139, revised in 2011). Animals were used and experimental protocols performed under the supervision of a person authorized to perform experiments on live animals (F. Pinet: 59-350126 and E. Dubois-Deruy: 59-350253). Approval was granted by the institutional ethics review board (CEEA Nord Pas-de-Calais N°242011, January 2012).

Before surgery, rats were anaesthetized (sodium methohexital, 50 mg/kg IP), while analgesia was administered before (xylazine 5 mg/kg IP) and 1h after surgery (xylazine 50 mg/kg subcutaneously) as described¹. MI was induced in 10-week-old male Wistar rats (n=63) (Janvier, Le Genest St isle, France) by ligation of the left anterior descending coronary artery^{1,2}. Haemodynamic and echocardiographic measurements (Online Table 1) were taken 7 days and 2 months after surgery, followed by heart excision and plasma sampling, as previously described^{3,4}. Blood samples were collected in EDTA-treated tubes and then centrifuged for 15 min at 3000 rpm to remove cells and platelets. After centrifugation, the plasma was collected, aliquoted and stored at -80°C.

Human samples

REVE-2 was a multicenter study that enrolled 246 patients with anterior wall Q-wave MI from 8 centers in France from February 2006 to September 2008⁵. Inclusion criteria were hospitalization within 24 hours after symptom onset and at least 3 LV segments of the infarct zone that were akinetic at predischARGE echocardiography. Exclusion criteria were inadequate

echographic image quality, life-limiting noncardiac disease, significant valvular disease, or previous Q-wave MI. The research protocol was approved by the ethics committee of the Centre Hospitalier et Universitaire de Lille (CP05/91 of December 13th 2005, Lille, France), and written informed consent was obtained from each patient. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations. The protocol required serial echographic studies at hospital discharge (day 3 to day 7) and 3 months and 1 year after MI; serial blood sampling was performed at hospital discharge (day 3 to day 7) and 1 month, 3 months, and 1 year after MI. Plasma were processed within 2 hours, and samples were divided into aliquots and stored at -80°C . Baseline characteristics of REVE-2 population are summarized in Table 1.

Cell Culture

H9c2 cell line

The rat embryonic-heart derived H9c2 cell line (ATCC, CRL-1446) were seeded at a density 1×10^5 cells/well in 6-well plates at 37°C and 5% CO_2 in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Life technologies) supplemented with 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (ATCC), 1% penicillin and streptomycin (10,000 U/mL). Cells were then treated with Iso (10 μM) in a DMEM, 1% penicillin and streptomycin without serum for 24h and 48h.

Cytivia Plus Cardiomyocytes

The human embryonic-heart derived Cytivia Plus Cardiomyocytes (GE Healthcare, 29-0918-80) were seeded at a density 2×10^5 cells/well in 6-well plates coated with Matrigel 1:30 in RPMI (Life technologies) supplemented with 2% (v/v) B27 supplement (Life technologies) for 7 days at 37°C under 5% CO_2 atmosphere.

Proteomic and phosphoproteomic analysis

Proteomic and phosphoproteomic analysis were performed as already described^{3,6}. Briefly, LV proteins (100-500 µg) from sham- and 2 months MI-rats were analyzed by 2D-electrophoresis and specific staining. Detailed protocols as already been published^{3,6}.

Bioinformatical analysis

Differentially regulated proteins previously identified by mass spectrometry^{3,6} were further analyzed using Ingenuity Pathway Analysis (IPA, www.ingenuity.com, Winter Release 2012, Ingenuity Systems, Mountain View, CA). A protein interaction network was generated as follows: a dataset containing the up- and downregulated proteins, called focus proteins, was uploaded into the IPA tool (Online Table 2). These focus proteins were overlaid onto a global molecular network developed from the information in the Ingenuity Pathways Knowledge Base. Networks of these focus proteins were then algorithmically generated by including as many focus proteins as possible and other nonfocus proteins from the database that are needed to generate the network based on connectivity. Here, we focused our analysis on microRNAs with high predicted and experimentally observed selection.

RNA Extraction and qRT-PCR Analyses

Rat LV samples

RNA was extracted from LV (about 60mg) and homogenized with 2mL TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) in Ultra-Turrax®. To ensure complete dissociation of nucleoprotein complexes, samples were kept 5 min at room temperature before addition of 200 µL of chloroform per ml of TRI Reagent. Samples were then shaken vigorously for 15 sec before centrifugation at 12,000g for 12 min at 4°C to recuperate RNA in the upper aqueous phase. This phase was transferred to a fresh tube and same volume of 2-propanol was added for 2h at -20°C before centrifugation at 13,000g for 30 min at 4°C. The RNA pellet was washed by

adding 800 μ L of ethanol before centrifugation at 12,000g for 10 min at 4°C. Samples were dried and then solubilised in 40 μ L of RNase-free water and store at -80°C.

Rat and Human plasma samples

RNA was extracted from 50 μ L of plasma with miRNeasy Minikit (Qiagen, #217004), as previously described⁷. As an internal spiked-in control, *Coenorhabditis elegans* miR-39 (Cel-39-1) was added during the isolation process. Samples were dried and then solubilised in 10 μ L of RNase-free water and store at -80°C.

Cell samples

RNA was extracted from H9c2 and Cytivia 6-wells plate with miRNeasy Minikit (Qiagen, #217004). For Cytivia, Matrigel was previously digested by Corning Cell Recovery Solution (#354253) according to the manufacturer's instructions.

RT-qPCR analyses

Quality of LV RNA extraction was checked with Pico600 RNA (Agilent) to determine the RNA Integrity Number (RIN). Reverse-transcription was performed with 100 ng of rat LV and plasma total RNA using the miScript II RT kit (Qiagen) and the cDNA was amplified with QuantiTect® SYBR® Green PCR kit (Qiagen) for micro-RNAs and miScript SYBR Green PCR (Qiagen) for mRNA on a Mx3000P Q-PCR system (Agilent Technologies), according to the manufacturer's instructions.

The human plasma RNA was reverse transcribed with TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, #4366597) and specific miRNA Reverse Transcription Primers (Applied Biosystems, #4427975) for miR-21-5p, miR-23a-3p and miR-222-3p and Cel-39-1 as normalization control and RT-PCR analysis was performed using iQSupermix (Biorad, #170-8864) and specific miRNA Taqman Probes (Applied Biosystems, #4427975) using an automatic robotic pipetting device (Agilent).

Protein extraction

Proteins were extracted from 40 mg of LV frozen tissue with Dounce-Potter homogenization or from 6-well plates cell into ice-cold RIPA buffer (50 mmol/L Tris [pH7.4], 150 mmol/L NaCl, 1% Igepal CA-630, 50 mmol/L deoxycholate, and 0.1% SDS) containing anti-proteases (Complete™ EDTA-free, Roche Diagnostics), serine/threonine protein phosphatase inhibitors (Phosphatase inhibitor Cocktail 3, Sigma-Aldrich) and 1 mmol/L Na₃VO₄, as described previously³. Lysed cells were incubated for 1h at 4°C, centrifuged 15 min at 12 000 rpm to collect the soluble proteins. Protein concentrations were determined with a Lowry-based method protein assay (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) and samples were kept at -80°C.

Western blot

Soluble proteins (5-15 µg) were resolved on 15% SDS-PAGE and transferred on 0.2 µm nitrocellulose membranes (Trans-Blot® Turbo™ Transfert Pack, Bio-Rad). Equal total proteins loads were confirmed by Ponceau red (0.1% Ponceau , Sigma-Aldrich), 5% acetic acid (v/v)] staining of the membranes. The membranes were then blocked in 5% milk in TBS-Tween buffer for 1h before 4°C overnight incubation with SOD2 antibody (Abcam ab16956) or GAPDH (Santa-Cruz, sc-365062, diluted 1/10000 in 5% milk TBS-Tween buffer. Blots were then washed three times with TBS-Tween 0.1% buffer and incubated with mouse horseradish peroxidase-labelled secondary antibodies for 1h (1/10000) in blocking solution. The Chemidoc® camera (Biorad) was used for imaging and densitometry analysis after membranes were incubated with enhanced chemiluminescence (ECL™) western blotting detection reagents (GE Healthcare).

SOD2 ELISA Kit

SOD2 was quantified from 100 μ L of plasma diluted 1/50 with Human SOD2 ELISA Kit (Abnova), according to the manufacturer's instructions. SOD2 concentration was determined by average the duplicate readings for each standard, control, and samples and subtract the average zero standard optical density.

Immunofluorescence

Biphotonic confocal microscopy was used for the imaging of 4% paraformaldehyde and 0.1% Triton fixed/permeabilized cardiomyocytes. Immunofluorescence staining was performed by saturation for 30 min with 1% BSA before incubation with the alpha-actinin antibody (sc-7453, Santa-Cruz) overnight at 4°C at dilution 1/50. Alexa Fluor® 568 coupled anti-goat secondary antibody at dilution 1/500 was incubated for 30 min at room temperature before nuclei staining for 10 min at room temperature (Hoechst 33258, Invitrogen™) with mounting medium (H-1500, Vectashield).

Mitochondrial superoxide anion levels were measured using MitoSOX Red (DHE conjugated to a mitochondrial localization tag). Cardiomyocytes were incubated in HBSS with 10 μ M MitoSOX Red (Life Technologies) for 20 min at 37°C.

Stainings were visualized with a x40 objective on an LSM710 confocal microscope that used Zen image acquisition and analysis software (Zeiss). Images were acquired with a resolution of at least 1024 \times 1024.

Luciferase Reporter Assay

Human SOD2 3'UTR (824 bp) harboring three potential binding sites for miR-222-3p was cloned into Spe I and Hind III cloning site of pMIR-REPORT vector (Ambion). The resulting construct (20 ng) was co-transfected with control mirVana mimic or mirVana mimic miR-222-3p (each 30nM, ThermoFisher Scientific) and 20 ng of β -galactosidase control plasmid (Promega) into 48 well-plated HEK293 reporter cells by the use of Lipofectamine 2000

(Invitrogen). Cells were incubated for 24h before detecting luciferase and β -galactosidase activity applying different substrates (Promega).

Transfection

SOD2 siRNA

The specific siRNA specifically targeting rat SOD2 mRNA (SOD2 siRNA) and non-targeting control (NT siRNA) were used (ON-TARGETplus Rat Sod2 (24787) siRNA - SMARTpool, #L-080048-02-0010, Dharmacon, GE Healthcare). H9c2 were plated (300,000 cells/well) in 6-well plates and were allowed to grow for 24h without antibiotics. SOD2 or NT siRNA (25 nmol/L) were transfected with the DharmaFECT® reagent (4 μ L) according to the manufacturer's recommendations. Total cell extracts were collected 72h after transfection.

MiR-222-3p modulation

The specific miR-222 mimic and miR-222 inhibitor and negative control were used (miRVana, Life Technologies). Cytivia Plus cardiomyocytes were plated (200,000 cells/well) in 6-well plates and were allowed to grow for 1 week in RPMI supplemented with 2% (v/v) B27. miR-222 mimic, miR-222 inhibitor and their negative control (100 nmol/L) were transfected with the Lipofectamine 2000 (Life Technologies) reagent (4 μ L) in OptiMEM (Life Technologies). Medium was changed for RPMI supplemented with 2% (v/v) B27 6h after transfection. Cells were treated with Iso 10 μ M 24h after transfection. Total cell extracts were collected 72h after transfection.

Molecular data processing

The molecular REVE-2 network model was built based on the molecular data as described⁸, including 24 molecular variables (18 proteins, 6 non-coding RNAs (5 miRNAs and 1 long noncodingRNA), measured at 1 to 4 time points (depending on the variables, including baseline, 1 month, 3 months, and 1 year). To build the REVE-2 network model, the

knowledge platform EdgeBox (EdgeLeap's proprietary knowledge platform) was used as a resource of public knowledge on molecular interactions. The REVE-2 network model embeds the REVE-2 molecular variables in an integrated network of known interactions ("edges") between molecules ("nodes"). All visualizations of the REVE-2 network model were performed using Cytoscape, version 3.4.0.

For each node in the network the centrality measure "betweenness" was calculated using the igraph R package. The betweenness of a node is the normalized count of shortest paths between all other nodes in the network passing through that node. High betweenness of a node indicates that a molecule is crucial to maintain functionality and coherence of signaling mechanisms, while a low betweenness indicates a more peripheral role for the molecule.

Statistical analysis

For cell culture and animal model, data are expressed as means \pm SEM and analysed with GraphPad software. Data were compared using nonparametric Mann–Whitney test for 2 groups' comparison and using Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test for multiple groups' comparison. Statistical significance was accepted at the level of $P < 0.05$.

For Human studies, the levels of miRs and SOD2 were log-transformed and compared between high remodelers (>20% change in LVEDV between baseline and 1 year) and non remodelers (<20% change in LVEDV between baseline and 1 year). We used a logistic regression adjusted for age, sex, and baseline LVEDV. All statistical analyses were performed using the STATA 14.1 software (STATA Corporation, College Station, Texas, USA). For analyzing correlation between the circulating levels of SOD2 and miRNAs, we used the Pearson correlation coefficient test. Statistical significance was assumed at a p value < 0.05 .

References

1. Mulder, P. *et al.* Early versus delayed angiotensin-converting enzyme inhibition in experimental chronic heart failure. Effects on survival, hemodynamics, and cardiovascular remodeling. *Circulation* **95**, 1314–1319 (1997).
2. Pfeffer, M. A, Pfeffer, J. M., Steinberg, C. & Finn, P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation* **72**, 406–412 (1985).
3. Dubois, E. *et al.* Decreased Serine207 phosphorylation of troponin T as a biomarker for left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **32**, 115–123 (2011).
4. Mulder, P. *et al.* Long-term heart rate reduction induced by the selective I(f) current inhibitor ivabradine improves left ventricular function and intrinsic myocardial structure in congestive heart failure. *Circulation* **109**, 1674–1679 (2004).
5. Fertin, M. *et al.* 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.* **106**, 1410–1416 (2010).
6. Cieniewski-Bernard, C. *et al.* Proteomic Analysis of Left Ventricular Remodeling in an Experimental Model of Heart Failure. *J. Proteome Res.* **7**, 5004–5016 (2008).
7. Bauters, C. *et al.* Circulating miR-133a and miR-423-5p fail as biomarkers for left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* **168**, 1837–1840 (2013).
8. Pinet, F. *et al.* Integrative network analysis reveals time-dependent molecular events underlying left ventricular remodeling in post-myocardial infarction patients. *BBA-Mol Bas Dis* **1862**, 1445-1453 (2017).

Online Figures

Figure 1: MiRNAs expression in LV of HF-rats.

(A) Graphical representation of network built from the proteomic data analyzed with IPA focused on SOD2 protein. The full IPA network is described as Online Table 2. Continuous full arrow indicates direct interaction and dotted arrows non-direct interaction. Quantification by RT-qPCR of miR-145-5p (A, middle panel), miR-21-3p (A, right panel), miR-29b-3p (B), miR-338-3p (C), miR-133a (D), miR-483-3p (E), miR-320a (F) and miR-377-5p (G) in RNA extracted from LV of sham- and HF-rats after 7 days (circle) and 2 months (square) after MI. Data were normalized to miR-423-3p and graph shows mean \pm SEM values expressed as fold change ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). The protein identified for the interaction with miRNAs by IPA analysis is indicated for each miRNAs. ** $p < 0.01$ from at least 6 LV samples for 2 groups' comparison (nonparametric Mann–Whitney test) and #### $p < 0.001$, and for multiple groups' comparison (Kruskall-Wallis with Dunn's multiple comparison test).

Figure 2: Detailed molecular network of miR-222-3p.

Visualization of the REVE-2 molecular network model centralized on the molecules (nodes) interacting with miR-222-3p at baseline (top) and 3 months (bottom) post-MI. MiR-222-3p is circled in red, nodes are colored by cluster membership, based on the 12 clusters that contain REVE-2 variables⁸. Detailed information of the REVE-2 network is provided as online Table 3.

Figure 3: Circulating SOD2 and miRNAs plasma levels of REVE-2 patients.

REVE-2 patients (n=224) were divided as no remodelers (LVR < 20%, n=138) (white) and high remodelers (LVR > 20%, n=86) (grey) according to the LV remodeling determined as $((EDV_{1year} - EDV_{baseline}) / EDV_{baseline})$. (A) Quantification by RT-qPCR of miR-21-5p in plasma extracted from REVE-2 patients at baseline and after 3 months and 1 year post-MI for

all the population (left panel). Analysis were also performed by separating women (n=46, 24 no LVR and 20 high LVR) and men (n=200, 114 with no LVR and 66 with LVR) (right panel). Data were expressed as log (miR/cel39) and represented in box plot with the central rectangle for the interquartile range, the segment inside the rectangle for the median and the segment outside for the minimum and maximum (top panels). Pearson correlation analysis between SOD2 and miR-21-5p in plasma levels of REVE-2 patients at 3 month post-MI (bottom panels). *, p<0.05 compared to no LVR. The scatter plots show the correlation between SOD2 and miR-222-3p plasma levels of REVE-2 patients at 3 month post-MI for all REVE-2 population (n=246) (left panel) and for men (n=200) (right panel). **(B)** Quantification by RT-qPCR of miR-23a-3p) in plasma extracted from REVE-2 patients at baseline and after 3 months and 1 year post-MI. REVE-2 patients were divided as no remodelers (LVR < 20%) (white) and high remodelers (LVR > 20%) (grey) according to the LV remodeling determined as $((EDV_{1year} - EDV_{baseline}) / EDV_{baseline})$. for all the population (left panel). Analysis were also performed by separating women (n=46, 24 no LVR and 20 high LVR) and men (n=200, 114 with no LVR and 66 with LVR) (right panel). Data were expressed as log (miR/cel39) and represented in box plot with the central rectangle for the interquartile range, the segment inside the rectangle for the median and the segment outside for the minimum and maximum (top panels). *, p<0.05 compared to no LVR. Pearson correlation analysis between SOD2 and miR-23a-3p in plasma levels of REVE-2 patients at 3 month and 1 year post-MI (bottom panels). The scatter plots show the correlation between SOD2 and miR-222-3p plasma levels of REVE-2 patients at 3 month and 1 year post-MI for all REVE-2 population (n=246) (left panels) and for men (n=200) (right panels).

Online table 1: Echocardiographic, hemodynamic and morphometric parameters in sham and HF-rats.

Parameters	7 days		2 months	
	sham (n=8)	HF (n=7)	sham (n=25)	HF (n=23)
LVEDD, mm			6.7 ± 0.1	10.3 ± 0.3***
LVESD, mm			3.5 ± 0.1	8.7 ± 0.3***
LVEDP, mmHg			1.72 ± 0.41	6.15 ± 1.5**
LVESP, mmHg			126 ± 5	123 ± 3
dP/dt _{max} , 10 ⁻³ mmHg.sec ⁻¹			9.9 ± 0.4	7.9 ± 0.4**
dP/dt _{min} , 10 ⁻³ mmHg.sec ⁻¹			9.5 ± 0.6	6.6 ± 0.5**
FS, %			48 ± 2	17 ± 2***
SV, mL.beat ⁻¹			0.35 ± 0.01	0.31 ± 0.01*
CO, mL.min ⁻¹			147 ± 7	123 ± 7*
DPB, mmHg			105 ± 5	95 ± 6
BW, g	319 ± 14	311 ± 7	460 ± 6	459 ± 9
HW, g	0.97 ± 0.02	1.08 ± 0.03*	1.23 ± 0.03	1.58 ± 0.07***
HW/BW, mg/g	3.09 ± 0.19	3.48 ± 0.17	2.69 ± 0.07	3.46 ± 0.16***
RVW, mg	198 ± 8	213 ± 24	210 ± 9	279 ± 23**
LVW, g	0.7 ± 0.02	0.72 ± 0.01	0.92 ± 0.02	1.14 ± 0.05***
AW, mg	66 ± 6.3	143 ± 25.8**	97 ± 8.4	161 ± 18.9**
LW, g	0.93 ± 0.03	1.17 ± 0.09*	1.08 ± 0.02	1.26 ± 0.12

AW, atrial weight; BW, body weight; CO, cardiac output; DPB; diastolic blood pressure; dP/dt_{max}, cardiac contractility; dP/dt_{min}, cardiac relaxation; FS, fractional shortening; HW, heart weight; LVEDD, left ventricle end diastolic diameter; LVEDP, left ventricle end diastolic pressure; LVESD; left ventricle end systolic diameter; LVESP, left ventricle end systolic pressure; LVW, left ventricle weight; LW, lung weight, RVW, right ventricle weight; SV, stroke volume. *, p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 compared to sham.

Online table 2: Detailed proteins differentially expressed or phosphorylated in LV of HF-rats overlaid onto a global molecular network in the IPA Knowledge Base.

Accession number	Protein name	Fold-change (HF vs sham)		IPA	
		Expression	Phosphorylation	miRNA identified	predicted interaction
2-oxoglutarate metabolic process (GO:0006103)					
Q6P6R2	Dihydropyridin dehydrogenase, mitochondrial	x 2.2	ND		
Q99NA5	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	x 0.62	Induced		
Actin crosslink formation (GO:0051764)					
P50753	Troponin T, cardiac muscle	ND	/ 4.3		
Actin filament capping (GO:0051693)					
P04692	Tropomyosin alpha-1 chain	ND	/ 5.5	miR-29b-3p	Direct
				miR-338-3p	Direct
Activation of signaling protein activity involved in unfolded protein response (GO:0006987)					
P06761	78 kDa glucose-regulated protein	ND	Suppressed		
Acute-phase response (GO:0006953)					
P01048	T-kininogen 1	x 3	ND		
Acyl-CoA metabolic process (GO:0006637)					
O55171	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial	x 0.62	Induced		
Aerobic respiration (GO:0009060)					
Q68FY0	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	ND	Suppressed		
Age-dependent response to reactive oxygen species (GO:0001315)					
P07895	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial (SOD2)	x 2.1	ND	miR-21-3p	Indirect
				miR-21-5p	Indirect
				miR-23a-3p	Indirect
				miR-145-5p	Indirect
				miR-222-3p	Direct
Aging (GO:0007568)					
P23928	Alpha-crystallin B chain	x 6.2	/ 4.7		
P15429	Beta-enolase	ND	Suppressed		
P04041	Glutathione peroxidase 1	no	/ 4.6		
P63018	Heat shock cognate 71 kDa protein	ND	x 6.2		
Animal organ regeneration (GO:0031100)					
P67779	Prohibitin	ND	Suppressed		
P11980	Pyruvate kinase PKM	ND	Induced	miR-133a	Indirect

<i>Apopototic mitochondrial changes (GO:0008637)</i>					
Q66HF1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	ND	Suppressed		
<i>Apopototic process (GO:0006915)</i>					
P04797	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	x 1.6	ND		
<i>ATP metabolic process (GO:0046034)</i>					
P15999	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	x 4.7	Induced		
P10719	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	x 2.1	x 4.9		
P31399	ATP synthase subunit d, mitochondrial	x 3.3	/ 1.6		
<i>Carbohydrate metabolic process (GO:0005975)</i>					
P42123	L-lactate dehydrogenase B chain	ND	x 5.1		
O88989	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	ND	x 2.9		
P16617	Phosphoglycerate kinase 1	x 0.72	ND		
P48500	Triosephosphate isomerase	x 2	ND		
<i>Cardiac muscle contraction (GO:0060048)</i>					
P16409	Myosin light chain 3	ND	x 12.2		
P08733	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	ND	Suppressed		
<i>Cellular response to fatty acid (GO:0071398)</i>					
P11884	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	ND	/ 2.4		
<i>Cellular response to starvation (GO:0009267)</i>					
P02770	Serum albumin	ND	/ 10.5		
<i>Cell redox homeostasis (GO:0045454)</i>					
P35704	Peroxisredoxin-2	x 4	ND	miR-122-5p	Indirect
O35244	Peroxisredoxin-6	x 1.5	Induced	miR-377-5p	Direct
P04785	Protein disulfide-isomerase	x 3	ND	miR-210	Direct
				miR-122-5p	Indirect
<i>Fatty acid beta-oxidation (GO:0006635)</i>					
P14604	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	x 4.7	ND		
<i>Gluconeogenesis (GO:0006094)</i>					
P25113	Phosphoglycerate mutase 1	x 3.7	ND	miR-483-3p	Direct
<i>Glycolytic process (GO:0006096)</i>					
P04764	Alpha-enolase	ND	x 4.6		

Hydrogen sulfide biosynthetic process (GO:0070814)					
P97532	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	ND	x 12.8		
Intermediate filament organization (GO:0045109)					
P48675	Desmin	ND	x 5		
Mesenchyme migration (GO:0090131)					
P63269	Actin, gamma-enteric smooth muscle	ND	x 19.2		
Mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone (GO:0006120)					
Q68FT1	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial	ND	Suppressed		
Phosphocreatine biosynthetic process (GO:0046314)					
P00564	Creatine kinase M-type	ND	Induced		
Proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process (GO:0043161)					
P40112	Proteasome subunit beta type-3	x 2.7	ND		
Protein deubiquitination (GO:0016579)					
Q91Y78	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3	x 2.9	ND		
Regulation of muscle contraction (GO:0006937)					
P97541	Heat shock protein beta-6	x 1.5	ND	miR-320a	Indirect
Response to heat (GO:0009408)					
O35878	Heat shock protein beta-2	No	ND		
Q9QUK5	Heat shock protein beta-7	x 0.21	ND		
Serine-type endopeptidase inhibitor activity (GO:0004867)					
P05545	Serine protease inhibitor A3K	x 2.2	x 5.9		

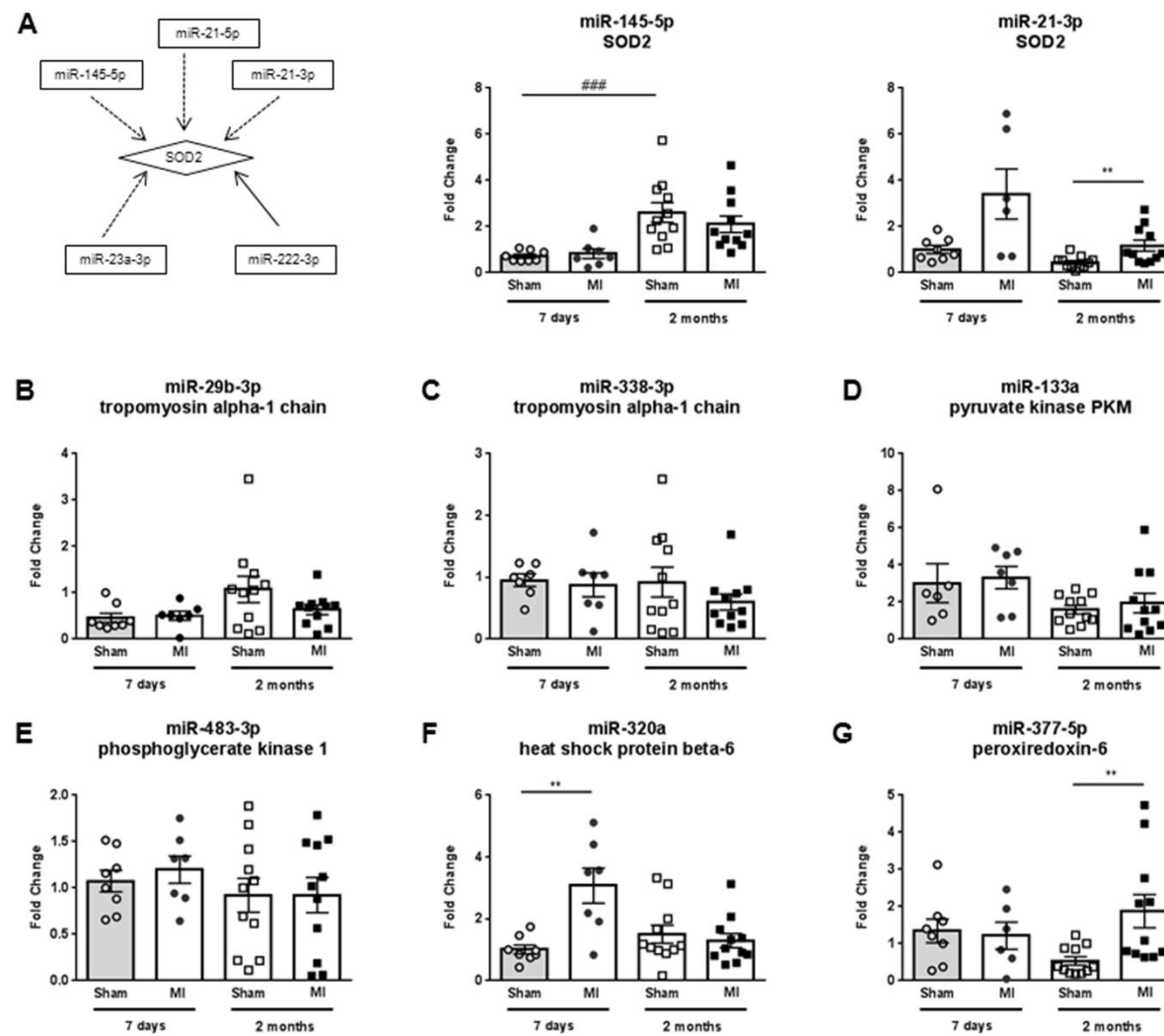
Accession number corresponded to Uniprot Knowledge base (UniProtKB, release of April 2014). Proteins were classified by first biological process in Gene Ontology (GO). ND: not detected. IPA: Ingenuity Pathway analysis (Winter release 2012).

Online table 3: Detailed list of components of REVE-2 molecular networks centralized on miR-222-3p identified by Cytoscape analysis⁸.

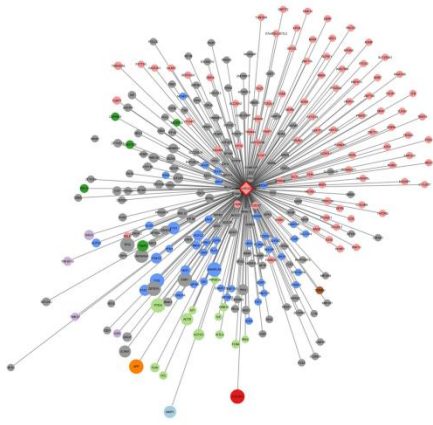
Description	Name	Betweenness	Degree	Cluster
collagen, type V, alpha 2	COL5A2	0.0144	49	cluster 3
FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	FOS	0.013	76	cluster 1
estrogen receptor 1	ESR1	0.0096	54	cluster 22
tumor protein p53	TP53	0.009	59	cluster 19
amyloid beta (A4) precursor protein	APP	0.0088	59	cluster 6
phosphatase and tensin homolog	PTEN	0.0085	27	cluster 4
matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	MMP1	0.0076	35	cluster 9
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	SMARCA4	0.0054	31	cluster 1
zinc finger and BTB domain containing 7A	ZBTB7A	0.0052	30	no cluster
heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	HSP90AA1	0.0045	42	cluster 15
actin, beta	ACTB	0.0036	42	cluster 4
v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1	ETS1	0.0036	32	cluster 1
intercellular adhesion molecule 1	ICAM1	0.0034	16	cluster 25
TIMP metalloproteinase inhibitor 3	TIMP3	0.0029	6	cluster 2
actin gamma 1	ACTG1	0.0029	27	cluster 4
signal transducer and activator of transcription 5A	STAT5A	0.0027	36	cluster 1
pyruvate kinase, muscle	PKM	0.0027	9	cluster 10
forkhead box O3	FOXO3	0.0025	23	cluster 1
host cell factor C1	HCFC1	0.0023	18	cluster 1
ribosomal protein L12	RPL12	0.0023	42	cluster 8
eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha, 35kDa	EIF2S1	0.0022	22	cluster 8
death-domain associated protein	DAXX	0.002	14	cluster 14
notchless homolog 1 (Drosophila)	NLE1	0.0019	22	cluster 1
trinucleotide repeat containing 6B	TNRC6B	0.0018	10	cluster 39
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (H)	HNRNPH1	0.0018	16	cluster 18
talin 1	TLN1	0.0016	23	cluster 4
dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1)	DAG1	0.0016	8	no cluster
splicing factor 3b, subunit 3, 130kDa	SF3B3	0.0015	15	cluster 18
karyopherin (importin) beta 1	KPNB1	0.0015	15	cluster 33
valosin containing protein	VCP	0.0014	13	cluster 32
minichromosome maintenance complex component 3	MCM3	0.0014	14	cluster 12
minichromosome maintenance complex component 7	MCM7	0.0014	14	cluster 12
ribosomal protein S2	RPS2	0.0014	32	cluster 8
interleukin-1 receptor-associated kinase 1	IRAK1	0.0013	18	cluster 21
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	TNFSF10	0.0013	17	cluster 14
cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	CDKN1B	0.0013	24	cluster 12
protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha	PPP2R1A	0.0013	33	cluster 8
eukaryotic translation initiation factor 3, subunit B	EIF3B	0.0012	27	cluster 8
ATPase, class VI, type 11B	ATP11B	0.0012	6	cluster 10
reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs	RECK	0.0011	4	cluster 2
autism susceptibility candidate 2	AUTS2	0.0011	6	cluster 1
excision repair cross-complementation group 6-like	ERCC6L	0.0011	14	cluster 15
filamin A, alpha	FLNA	0.0011	10	cluster 4
SEC24 family member C	SEC24C	0.001	8	no cluster
hes family bHLH transcription factor 1	HES1	0.001	7	cluster 37
KIT ligand	KITLG	0.001	14	cluster 4
family with sequence similarity 126, member B	FAM126B	0.001	4	cluster 2
zinc finger, FYVE domain containing 16	ZFYVE16	0.001	5	cluster 28
growth factor receptor-bound protein 10	GRB10	0.0009	14	cluster 4
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 21	DDX21	0.0009	8	cluster 10
proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 4	PSMC4	0.0009	10	cluster 12
ribosomal protein L8	RPL8	0.0009	30	cluster 8
high mobility group AT-hook 1	HMGA1	0.0009	14	cluster 1
cell cycle associated protein 1	CAPRIN1	0.0009	3	cluster 2
spectrin, beta, non-erythrocytic 2	SPTBN2	0.0008	9	no cluster
coronin, actin binding protein, 1A	CORO1A	0.0008	20	cluster 1
phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, alpha	PIP5K1A	0.0008	11	cluster 4
pericentrin	PCNT	0.0008	16	cluster 15
transmembrane protein 245	TMEM245	0.0008	2	cluster 5
ezrin	EZR	0.0008	13	cluster 14
dicer 1, ribonuclease type III	DICER1	0.0008	9	cluster 39
vinculin	VCL	0.0008	16	cluster 4

far upstream element (FUSE) binding protein 1	FUBP1	0.0008	3	cluster 5
intracisternal A particle-promoted polypeptide	IPP	0.0008	3	cluster 12
ALG3, alpha-1,3- mannosyltransferase	ALG3	0.0008	9	cluster 1
dedicator of cytokinesis 5	DOCK5	0.0008	3	cluster 12
v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	KIT	0.0007	16	cluster 4
transmembrane emp24 protein transport domain containing 7	TMED7	0.0007	12	cluster 14
nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	NOLC1	0.0007	5	no cluster
enolase 1, (alpha)	ENO1	0.0006	11	cluster 1
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma	YWHAG	0.0006	19	cluster 15
ubiquitin specific peptidase 15	USP15	0.0006	10	cluster 28
zinc finger protein 460	ZNF460	0.0006	14	cluster 1
kinesin family member 4A	KIF4A	0.0006	7	no cluster
homeodomain interacting protein kinase 2	HIPK2	0.0006	5	cluster 10
QKI, KH domain containing, RNA binding	QKI	0.0006	16	cluster 1
general transcription factor IIIc, polypeptide 5, 63kDa	GTF3C5	0.0006	5	no cluster
lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	LGALS3BP	0.0006	3	no cluster
eukaryotic translation elongation factor 2	EEF2	0.0005	18	cluster 8
transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2 (18kDa, elongin B)	TCEB2	0.0005	6	no cluster
interferon regulatory factor 2 binding protein 2	IRF2BP2	0.0005	10	cluster 1
replication factor C (activator 1) 1, 145kDa	RFC1	0.0005	10	cluster 32
GDP dissociation inhibitor 1	GDI1	0.0005	9	cluster 29
pellino E3 ubiquitin protein ligase family member 2	PEL12	0.0005	8	cluster 21
integrin-linked kinase	ILK	0.0005	10	cluster 4
centrosomal protein 250kDa	CEP250	0.0005	14	cluster 15
cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	CDKN1C	0.0005	7	cluster 22
protein phosphatase 2, regulatory subunit B, alpha	PPP2R2A	0.0005	14	cluster 8
isoleucyl-tRNA synthetase	IARS	0.0005	10	no cluster
ubiquitin specific peptidase 9, X-linked	USP9X	0.0004	7	cluster 1
BCL2 binding component 3	BBC3	0.0004	11	cluster 19
proline-rich coiled-coil 2A	PRRC2A	0.0004	3	cluster 5
zw 10 kinetochore protein	ZW10	0.0004	10	cluster 15
exosome component 1	EXOSC1	0.0004	7	cluster 8
ceramide synthase 2	CERS2	0.0004	3	no cluster
Obg-like ATPase 1	OLA1	0.0004	9	cluster 1
translocase of inner mitochondrial membrane 50 homolog (S. cerevisiae)	TIMM50	0.0004	4	cluster 30
misshapen-like kinase 1	MINK1	0.0004	8	cluster 10
acetyl-CoA carboxylase alpha	ACACA	0.0004	6	cluster 10
poly(rC) binding protein 2	PCBP2	0.0004	12	cluster 18
MYC-associated zinc finger protein (purine-binding transcription factor)	MAZ	0.0004	4	cluster 16
drebrin-like	DBNL	0.0004	5	cluster 26
GDP dissociation inhibitor 2	GDI2	0.0004	9	cluster 29
transmembrane and ubiquitin-like domain containing 1	TMUB1	0.0004	4	no cluster
cyclin-dependent kinase 18	CDK18	0.0004	5	cluster 10
topoisomerase (DNA) III alpha	TOP3A	0.0003	4	cluster 32
pantothenate kinase 3	PANK3	0.0003	5	cluster 10
thioredoxin	TXN	0.0003	7	cluster 33
chromosome 8 open reading frame 33	C8orf33	0.0003	4	cluster 5
bromodomain PHD finger transcription factor	BPTF	0.0003	5	no cluster
metastasis associated 1 family, member 2	MTA2	0.0003	7	no cluster
testis expressed 10	TEX10	0.0003	8	cluster 1
low density lipoprotein receptor-related protein 10	LRP10	0.0003	5	cluster 19
ubiquitin-like modifier activating enzyme 1	UBA1	0.0003	7	cluster 1
ribosomal protein S17	RPS17	0.0003	24	cluster 8
CASK interacting protein 2	CASKIN2	0.0003	6	no cluster
phosphorylated adaptor for RNA export	PHAX	0.0003	3	no cluster
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (AU-rich element RNA binding protein 1, 37kDa)	HNRNPD	0.0003	12	cluster 18
PAN2 poly(A) specific ribonuclease subunit	PAN2	0.0003	5	cluster 8
malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)	MDH2	0.0003	5	cluster 35
profilin 1	PFN1	0.0003	8	cluster 1

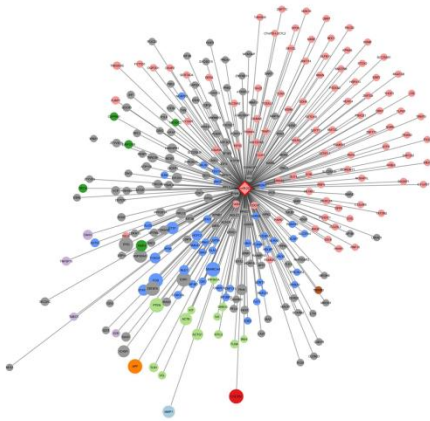
selectin E	SELE	0.0003	5	cluster 5
zinc finger, FYVE domain containing 9	ZFYVE9	0.0003	5	cluster 28
insulin receptor substrate 4	IRS4	0.0003	9	cluster 4
chondrosarcoma associated gene 1	CSAG1	0.0003	11	cluster 1
erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2	EPB41L2	0.0003	10	cluster 1
ATPase, Cu++ transporting, beta polypeptide	ATP7B	0.0003	5	cluster 10
importin 5	IPO5	0.0003	5	cluster 33
cancer susceptibility candidate 3	CASC3	0.0003	18	cluster 8
mortality factor 4 like 1	MORF4L1	0.0003	8	no cluster
claudin 23	CLDN23	0.0002	2	cluster 16
serine/arginine repetitive matrix 2	SRRM2	0.0002	4	cluster 5
pre-B-cell leukemia homeobox 2	PBX2	0.0002	3	no cluster
protein phosphatase 6, catalytic subunit	PPP6C	0.0002	3	cluster 20
eukaryotic translation initiation factor 3, subunit I	EIF3I	0.0002	19	cluster 8
HAUS augmin-like complex, subunit 8	HAUS8	0.0002	4	cluster 1
parkinson protein 7	PARK7	0.0002	3	cluster 5
microtubule-actin crosslinking factor 1	MACF1	0.0002	3	cluster 13
protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent, 1H	PPM1H	0.0002	3	cluster 20
ataxin 7-like 3	ATXN7L3	0.0002	3	cluster 37
methionyl-tRNA synthetase	MARS	0.0002	5	no cluster
RAN binding protein 10	RANBP10	0.0002	5	cluster 22
mesoderm development candidate 2	MESDC2	0.0002	3	cluster 2
exosome component 10	EXOSC10	0.0002	4	cluster 33
non-SMC condensin I complex, subunit D2	NCAPD2	0.0002	3	cluster 1
calcium binding tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated	CABYR	0.0002	2	cluster 16
superoxide dismutase 2, mitochondrial	SOD2	0.0002	5	cluster 1
SAP30-like	SAP30L	0.0002	3	no cluster
calpastatin	CAST	0.0002	3	cluster 16
kinesin family member 3B	KIF3B	0.0002	4	no cluster
synaptic vesicle glycoprotein 2A	SV2A	0.0002	2	cluster 16
plexin B2	PLXNB2	0.0002	4	cluster 1
casein kinase 1, gamma 1	CSNK1G1	0.0002	4	cluster 10
slingshot protein phosphatase 2	SSH2	0.0002	3	cluster 20
fatty acid synthase	FASN	0.0002	7	cluster 5
chromobox homolog 2	CBX2	0.0002	3	no cluster
folypolyglutamate synthase	FPGS	0.0002	4	cluster 10
phosphatidylethanolamine binding protein 1	PEBP1	0.0002	4	cluster 16
oxysterol binding protein-like 10	OSBPL10	0.0002	8	cluster 1
ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 2, E3 ubiquitin protein ligase	UHRF2	0.0002	4	cluster 13
Sad1 and UNC84 domain containing 2	SUN2	0.0002	6	cluster 1
polymerase (DNA directed), delta 2, accessory subunit	POLD2	0.0002	4	cluster 32
poly(A) binding protein interacting protein 2	PAIP2	0.0002	3	no cluster
UbiA prenyltransferase domain containing 1	UBIAD1	0.0001	2	no cluster
POM121 transmembrane nucleoporin	POM121	0.0001	5	cluster 33
maestro heat-like repeat family member 1	MROH1	0.0001	2	cluster 13
adaptor-related protein complex 1, beta 1 subunit	AP1B1	0.0001	3	no cluster
sortilin 1	SORT1	0.0001	4	cluster 1
lysine (K)-specific methyltransferase 2D	KMT2D	0.0001	3	cluster 5
pyridoxal-dependent decarboxylase domain containing 1	PDXDC1	0.0001	2	cluster 5
deoxyribose-phosphate aldolase (putative)	DERA	0.0001	2	cluster 5
SERTA domain containing 4	SERTAD4	0.0001	2	cluster 5
kinesin family member 5C	KIF5C	0.0001	4	cluster 5
cytoskeleton associated protein 2	CKAP2	0.0001	2	cluster 5
LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	LYN	0.0001	3	cluster 21
YY1 associated protein 1	YY1AP1	0.0001	3	cluster 5
microtubule-associated protein 1B	MAP1B	0.0001	3	no cluster
ring finger protein 215	RNF215	0.0001	4	cluster 1
cyclin-dependent kinase-like 5	CDKL5	0.0001	3	cluster 10

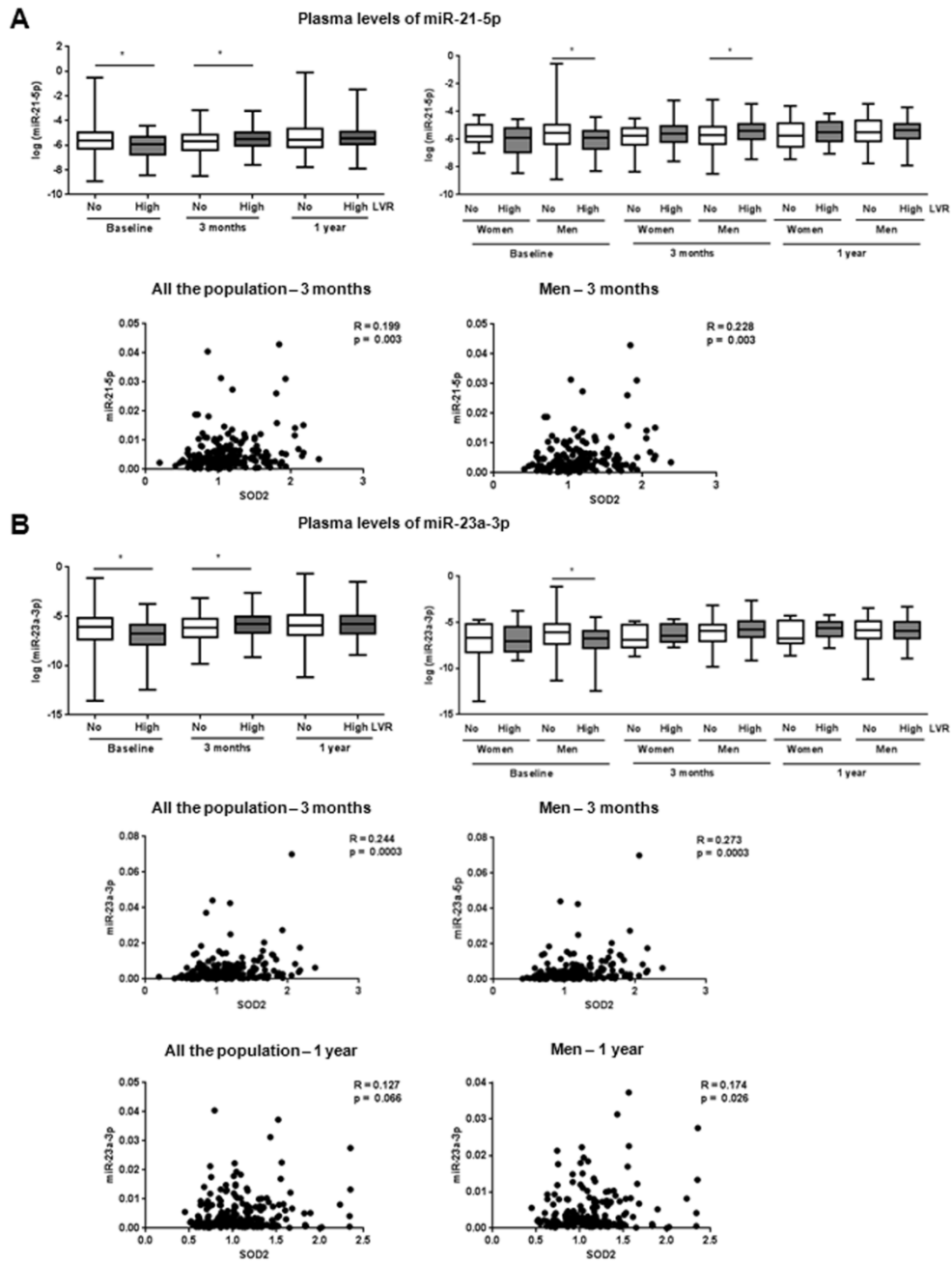


Online figure 1

Baseline

- Cluster 1 : sequence-specific DNA binding
- Cluster 2 : intrisec component of membrane
- Cluster 3 : endoplasmic reticulum lumen
- Cluster 4 : trans-membrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway
- Cluster 5 : RNA binding
- Cluster 6 : platelet alpha granule lumen
- Cluster 8 : nuclear-transcribed mRNA catabolic process
- Cluster 20 : protein targeting to mitochondrion

3 months**Online Figure 2**



Online figure 3

Review Article

Noncoding RNAs in Cardiac Autophagy following Myocardial Infarction

Annie Turkieh, Henri Charrier, Emilie Dubois-Deruy, Sina Porouchani, Marion Bouvet, and Florence Pinet 

Univ. Lille, Inserm, Institut Pasteur de Lille, U1167-RID-AGE, FHU-REMOD-VHF, F-59000 Lille, France

Correspondence should be addressed to Florence Pinet; florence.pinet@pasteur-lille.fr

Received 7 March 2019; Accepted 23 April 2019; Published 3 June 2019

Guest Editor: Reggiani Vilela Gonçalves

Copyright © 2019 Annie Turkieh et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Macroautophagy is an evolutionarily conserved process of the lysosome-dependent degradation of damaged proteins and organelles and plays an important role in cellular homeostasis. Macroautophagy is upregulated after myocardial infarction (MI) and seems to be detrimental during reperfusion and protective during left ventricle remodeling. Identifying new regulators of cardiac autophagy may help to maintain the activity of this process and protect the heart from MI effects. Recently, it was shown that noncoding RNAs (microRNAs and long noncoding RNAs) are involved in autophagy regulation in different cell types including cardiac cells. In this review, we summarized the role of macroautophagy in the heart following MI and we focused on the noncoding RNAs and their targeted genes reported to regulate autophagy in the heart under these pathological conditions.

1. Introduction

Myocardial infarction (MI) is a cardiovascular event caused by obstruction of one or more arteries supplying the heart. This area of the heart is therefore no longer supplied with oxygen and nutrients leading to the death of cardiomyocytes. Coronary reperfusion is the only recognized method to reduce the size of the infarct if it is performed within hours after MI. Despite its beneficial effect, several deleterious events such as increased oxidative stress and cell death are observed during the reperfusion process. If the infarcted zone is very extensive, there is a decrease in the contractile function of the heart. In order to compensate for this loss and maintain normal blood flow, the heart will undergo structural changes such as thinning of the infarcted zone, fibrosis, cardiomyocyte hypertrophy, and left ventricle (LV) dilatation [1]. Left ventricle remodeling (LVR) is initially a protective mechanism but in the long term can lead to heart failure (HF) [2–4]. Despite current therapy, acute MI and HF remain the leading causes of death and disability worldwide. New therapeutic strategies are therefore required to protect

the heart against the detrimental effects of acute ischemia/reperfusion (I/R) injury, in order to prevent cardiomyocyte death and reduce myocardial infarct size, preserve LV function, and prevent the onset of HF.

Macroautophagy is an important and nonselective proteolytic mechanism that regulates the homeostasis of long-lived proteins, macromolecules including lipids and cell organelles, by surrounding them in a double-membrane vesicle known as autophagosome in order to deliver them to the lysosome for degradation [5]. It plays an essential role for maintaining heart structure and function under baseline conditions [6–8]. Several studies showed that macroautophagy is upregulated in the heart following MI and suggested that this process may protect the heart against MI effects [9–11]. Recently, it was shown that noncoding RNAs (microRNAs (miRNA) and long noncoding RNAs (lncRNA)) are involved in autophagy regulation in different cell types including cardiac cells [12–14]. In this review, we summarized the role of macroautophagy in the heart following MI and we focused on the noncoding RNAs and their targeted genes reported to regulate autophagy in the heart under pathological conditions.

2. Macroautophagy Mechanism

Macroautophagy proceeds in several successive steps and involves different proteins as previously described [5]. In summary, autophagy induction is mainly regulated by the ULK (unc-51-like kinase) complex which is composed of ULK1/2, ATG13 (autophagy-related gene 13), ATG101, and FIP200 (focal adhesion kinase family interacting protein with a 200 kDa mass). Activation of the PI3K complex contributes to the vesicle nucleation, the first step of autophagosome formation. This complex is composed of Beclin-1, ATG14, VPS34 (phosphatidylinositol 3-kinase vacuolar protein sorting 34), and VPS15. Finally, two ubiquitin-like protein conjugation systems are required for the vesicle elongation, the first to form ATG12-ATG5-ATG16L1 complex and the second to form LC3II (microtubule-associated protein 1 light chain II), the lipidated form of LC3. For this latter step, ATG4 cleaves pro-LC3 to LC3I before its conjugation to phosphatidylethanolamine by ATG7, ATG3, and ATG12-ATG5-ATG16L1 complex. Several pathways were shown to regulate autophagy by activation or inactivation of one of these ATG proteins. For example, mTOR (mammalian target of rapamycin) activation inhibited autophagy by decreasing ULK1 activity [15] and ATG14/VSP34-35 complex formation [16]. AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase) positively regulated autophagy by increasing Beclin-1 phosphorylation leading to its interaction with VSP34 [17]. However, Bcl-2 interacts with Beclin-1 for blocking its interaction with VSP34 [18].

2.1. Macroautophagy during Ischemia/Reperfusion. The regulation of autophagy is different during ischemia and reperfusion [10]. During heart ischemia, nutrient and oxygen supplies to the cardiac cells decrease, inducing mitochondrial and cellular dysfunction that lead to cell death. To protect them, the cardiac cells induce autophagy via the AMPK/mTOR pathway in order to degrade/eliminate damaged organelles and proteins and provide the substrates necessary for their survival. During reperfusion, there is an increase of reactive oxygen species (ROS) production inducing a strong expression of Beclin-1 which on the one hand promotes the formation of autophagosomes and on the other hand inhibits the expression of genes involved in the fusion of autophagosomes with lysosomes [19]. In addition, ROS inhibit the expression of LAMP-2, a protein involved in the fusion of autophagosomes with lysosomes. Autophagy is then induced excessively during reperfusion but is inactive. Blocking the degradation of the contents of autophagosomes promotes oxidative stress, decreases mitochondrial permeability, and causes cell death. Partial inhibition of Beclin-1 expression (heterozygous mice) has been shown to protect against apoptosis induced during reperfusion while its total deletion is deleterious [10]. These data showed that autophagy is a protective mechanism during ischemia but its excessive induction during reperfusion is deleterious.

2.2. Macroautophagy during LVR in Post-MI. The activity of autophagy and its role in LVR post-MI have been studied in murine models with permanent ligation of the left coronary

artery. Autophagy is induced in noninfarcted area of the heart during the subacute (1 week) and chronic (3 weeks) stages after MI [11]. Inhibition of autophagy by bafilomycin (a pharmacological agent that blocks the fusion of the autophagosome with the lysosome) promoted LVR and worsens cardiac dysfunction. In contrast, administration of trehalose (a nonnaturally reduced disaccharide) in mice after ligation activated autophagy, reduced LVR, and improved cardiac function at 4 weeks post-MI [20]. However, this protective effect of trehalose on the heart was not observed in mice invalidated for the Beclin-1 gene, but an increase in the activity of mTOR was observed in the noninfarcted area of the heart. It has been shown that the inhibition of mTOR activity induced autophagy leading to a decrease of LVR and an improvement in cardiac function in post-MI [21]. All these data showed a protective role of autophagy in later stages in post-MI but its activity remained insufficient to prevent LVR and cardiac dysfunction.

3. Macroautophagy Regulation by Noncoding RNAs during and following MI

About 99% of the human genome do not encode proteins but are transcriptionally highly active and give rise to a broad spectrum of noncoding RNAs (ncRNAs) with regulatory and structural functions. Based on the size criteria of 200 nucleotides (nt), ncRNAs are divided into long (>200 nt) and short ncRNAs (<200 nt).

The ncRNAs are modulated in some cardiovascular diseases including MI [22, 23]. The significant changes in their expression pattern upon MI highlighted their contribution in the regulation of pathogenesis of MI. Furthermore, it was shown that ncRNAs could regulate autophagy in some cardiac disorders including MI, hypertrophy, and HF [12–14]. In this part, we summarized the noncoding RNAs which have been reported to regulate cardiac autophagy during and following MI and highlighted their specific autophagic targets and their importance as new therapeutic targets to protect the heart against I/R injury and prevent cardiac remodeling and dysfunction (Figure 1).

3.1. Macroautophagy Regulation by mRNAs. MiRNAs are defined as single-stranded noncoding RNAs around 22 nucleotides and are highly conserved between species [22]. Once synthesized and matured through several steps, these miRNAs bind to the complementary 3'UTR of their target mRNA and either degrade or silence them. A near-perfect match between the seed region of the miRNA (8 nucleotides at its 5'UTR end) and its target leads to complete degradation of mRNA, while a partial complementary results in the suppression of the gene expression. MiRNAs may have one or multiple mRNA targets and are involved in the regulation of numerous biological processes in the heart including autophagy.

3.1.1. Antiautophagic miRNAs with Protective Effects. Several miRNAs were modulated during I/R and seem to have a protective effect by decreasing excessive autophagy-induced cell apoptosis by targeting one of the ATG genes. MiR-188-3p

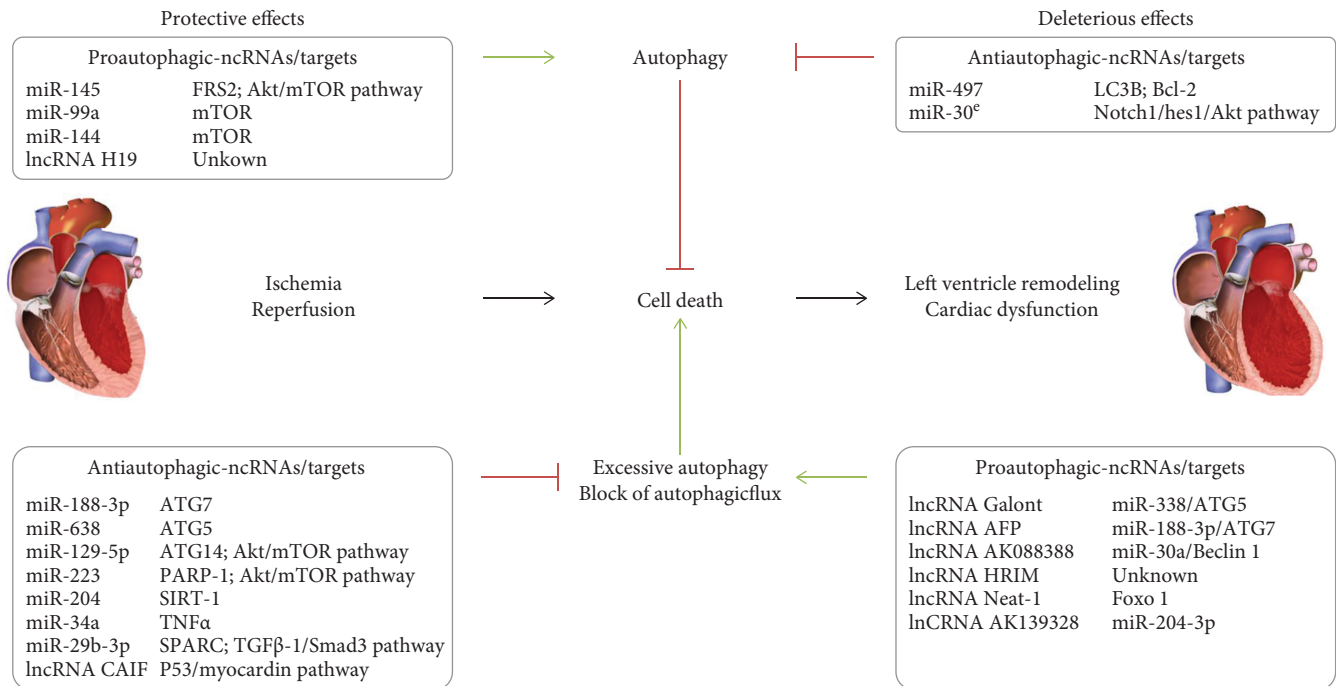


FIGURE 1: Outline summarizing the noncoding RNAs regulating cardiac autophagy and their targets and function. Green and red arrows indicate activation and inhibition, respectively.

levels are reduced in cardiomyocytes treated with anoxia/reoxygenation and in MI mice. Overexpression of miR-188-3p in MI mice attenuated autophagy by targeting autophagy mediator Atg7 and decreased the infarcted area size [24]. It was shown that miR-638 suppressed the expression of Atg5 by targeting its 3'UTR region. It is downregulated in human cardiomyocytes after hypoxia/reoxygenation (H/R), and its overexpression improves the viability of these cells. However, enforced expression of Atg5 reversed the effect of miR-638 on autophagy and cell apoptosis suggesting that miR-638 attenuated the effects of H/R treatment by regulating ATG5-mediated autophagy in human cardiomyocytes [25]. Also, overexpression of miR-129-5p in H9c2 cells treated by hydrogen peroxide inhibited autophagy by targeting the Atg14 gene and activating the PI3K/AKT/mTOR pathway resulting in decreased cell apoptosis [26].

Other miRNAs play their protective effect by regulating one of the pathways involved in autophagy regulation. The levels of miR-223 are significantly upregulated in the heart of post-MI HF rats and in hypoxia-treated neonatal rat cardiomyocytes (NRCMs) and H9c2 cells. The increased miR-223 levels protect NRCMs and H9c2 cells from hypoxia-induced apoptosis whereas decreasing miR-223 expression had contrasting effects. This protective effect of miR-223 is explained by the decrease of its target gene expression PARP-1 (poly(-ADP-ribose) polymerase 1) resulting in inhibition of excessive autophagy via the Akt/mTOR pathway [27]. However, miR-204 expression is decreased in the heart of rat upon I/R injury associated with increased autophagy as observed by the increased LC3II levels [28]. Also, it was shown that transfection of miR-204 in H9c2 cells attenuated cell apoptosis induced by H/R treatment. The protective effect of miR-

204 is explained by targeting SIRT1-mediated autophagy [29]. The expression of miR-34a is also decreased during I/R and overexpression of this miR decreased TNF α expression resulting in reduced autophagy and apoptosis levels on NRCMs after H/R [30]. Lower miR-29b-3p levels were found in HF patients and in hypoxia-stimulated H9c2 cells. The overexpression of miR-29b-3p inhibited autophagy and apoptosis induced in hypoxic-induced H9c2 cells through targeting SPARC and inhibiting TGF β -1/Smad3 pathway [31].

3.1.2. Antiautophagic miRNAs with Deleterious Effects. Some miRNAs contribute to ischemic/reperfusion injury by inhibiting the autophagy process. miR-497 is dramatically downregulated in the infarcted heart and in hypoxic cardiomyocytes, and its overexpression in murine MI model increased the infarcted size. It was shown that miR-497 inhibited autophagy by targeting the LC3B gene and induced cell apoptosis by targeting the Bcl-2 gene suggesting that decreasing miR-497 levels is a protective mechanism of the heart in response to MI [32]. The expression of miR-30e was also decreased after myocardial I/R. Its silencing in H9c2 cells increased autophagy and attenuated oxidative stress and cell apoptosis that are reversed by treating the cells with 3-methyladenine, an inhibitor of macroautophagy. These results suggest that decreasing the miR-30e levels protected the heart against I/R injury by autophagy induction [33].

3.1.3. Proautophagic miRNAs with Protective Effects. Higashi et al. [34] showed that 30 min of coronary occlusion followed by 2 days of reperfusion caused a significant decrease in the rabbit cardiac tissue expression of miR-145 in the border

and infarcted areas of the myocardium compared to the remote noninfarcted area. Injection of liposomes containing miR-145 after the beginning of reperfusion reduced the infarcted area size and improved the LV function and remodeling; these beneficial effects were abolished by chloroquine treatment. Further study showed that miR-145 promoted autophagy in cardiomyocyte by directly targeting FRS2 (fibroblast growth factor receptor substrate 2) mRNA resulting in the acceleration of the transition of LC3I to LC3II, an important step of autophagosome maturation [34]. The protective effect of miR-145 is also observed in H9c2 cells after H/R. In this study, the authors demonstrated that miR-145 inhibited H/R-induced apoptosis by promoting autophagy via the Akt3/mTOR signaling pathway [35]. miR-99a was shown to be downregulated in the infarcted heart and in neonatal mice ventricle myocytes exposed to hypoxia. Lentivirus-mediated overexpression of miR-99a in the infarcted heart inhibited cardiac remodeling and improved heart function at 1 and 4 weeks after its administration. It was shown that miR-99a decreased mTOR protein levels without any effect on its mRNA levels suggesting that miR-99a regulated mTOR expression at a posttranscriptional level. Consequently, the autophagy induced was associated with a decrease of cell apoptosis. This study demonstrated that overexpression of miR-99a improved post-MI cardiac function by upregulating autophagy via targeting mTOR pathways, inhibiting apoptosis, and attenuating pathological remodeling [36]. The miR-144 levels were reduced in the heart of MI mice with permanent left anterior descending artery (LAD) ligation. The miR-144 k/o mice showed a worse HF phenotype with ventricular dilatation and impaired contractility after LAD ligation. However, miR-144 administration decreased myocardial infarcted size and improved post-MI remodeling. Further study allowed authors to conclude that miR-144 increased autophagy and decreased fibrosis and apoptosis by targeting mTOR [37].

3.2. Macroautophagy Regulation by lncRNAs. lncRNAs are noncoding RNAs longer than 200 nucleotides that regulate both gene expression and protein translation [22]. Nuclear localized lncRNAs can regulate gene expression at both the epigenetic and transcriptional levels. Cytosol-based lncRNAs can modify protein translation by blocking, stabilizing/destabilizing, or sponging miRNAs. The lncRNAs are involved in the regulation of numerous biological processes including autophagy in cardiac and noncardiac cells.

3.2.1. Antiautophagic lncRNA with Protective Effects. Liu et al. [38] showed that the expression of lncRNA CAIF (cardiac autophagy inhibitory factor) was significantly decreased in a mice model of I/R injury and in cardiomyocytes treated with H₂O₂. Conversely, overexpression of CAIF inhibited autophagy inducing cardiomyocyte cell death and cardiac dysfunction caused by I/R. In this study, the authors demonstrate that CAIF directly binds to p53 protein and blocks its interaction with the myocardin promotor. Myocardin, a smooth muscle and cardiac muscle-specific transcriptional activator, is upregulated after I/R and H₂O₂ treatment and is involved in autophagy regulation in cardiomyocytes by

increasing Beclin-1 expression. These data suggest CAIF-P53-myocardin pathway as a novel regulator of autophagy in cardiomyocytes and as a potential therapeutic target in order to inhibit excessive autophagy and improve cardiac function after I/R [38].

3.2.2. Proautophagic lncRNA with Protective Effects. On the other hand, it was shown that the lncRNA H19 expression was decreased in a mice model of acute MI and that its overexpression decreased infarcted size and improved cardiac function associated with autophagy upregulation; however, the mechanisms by which autophagy is regulated by H19 are still unknown. These results suggest that H19 protects the heart from MI by increasing cardiac autophagy [39].

3.2.3. Proautophagic lncRNAs with Deleterious Effects. Some lncRNAs are upregulated after I/H and enhanced autophagy target gene expression by inhibiting miRNA expression. Yin et al. [40] showed that lncRNA Galont (GATA1 activated lncRNA) is upregulated in neonatal mice cardiomyocytes in response to anoxia/reoxygenation; however, miR-338 expression is downregulated. Overexpression of miR-338 directly decreased the formation of autophagic vesicles and induced cell death after anoxia/reoxygenation treatment without any effect on control cells. The antiautophagic effect of miR-338 is explained by its direct targeting of the autophagic mediator Atg5. It was shown that Galont directly bound to miR-338 and decrease its expression. Consequently, Atg5 expression is increased resulting in excessive cardiac autophagy and cell death [40]. Also, the lncRNA APF (autophagy-promoting factor) enhances cardiac autophagy and cell death by inhibiting miR-188-3p expression resulting in the increase of its target gene expression, Atg7 [24]. Furthermore, lncRNA AK088388 is upregulated during reoxygenation in mouse cardiac myocytes associated with the decreased miR-30a expression. Overexpression of miR-30a decreased the expression of its target gene Beclin-1 resulting in inhibition of autophagy induction and decreased cell death. The cooverexpression of lncRNA AK088388 inhibited the protective effect of miR-30a. However, the mutation of the miR30-a binding site in AK088388 failed to block the effect of this miRNA on autophagy and cell survival. These results suggest that lncRNA AK088388 regulates autophagy through miR-30a/Beclin-1 pathway to affect cardiomyocyte injury [41]. The lncRNA HRIM (hypoxia/reoxygenation injury-related factor in myocyte) was upregulated after H/R in H9c2 cells. HRIM silencing prevented death of cells by suppressing the autophagic activity in H/R-treated cells. However, the target genes of this lncRNA and the detailed mechanism of its autophagic effect need to be elucidated [42]. Other lncRNAs were highly expressed in diabetic murine heart and contributed to I/R injury by regulating autophagy. It was shown that Neat-1 (nuclear-enriched abundant transcript 1) and AK139328 seemed to induce autophagy by upregulating Foxo1 expression and decreasing miR-204-3p levels, respectively [43, 44].

lncRNA MALAT1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1) is expressed at high levels in patients with acute MI [45] and is closely associated with the

pathogenesis of myocardial I/R injury [46, 47]. It was shown, on the one hand, that MALAT1 contained binding site for miR-204 [48] and, in the other hand, that miR-204 protected the cardiomyocytes against I/R injury via inhibiting autophagic cell death [28]. Also, MALAT1 targeted miR-558 to enhance ULK1-mediated autophagy in isoproterenol-treated cardiomyocytes [49]. It will be important to know if lncRNA MALAT1 increased cardiomyocyte autophagy and myocardial injury during I/R by negatively regulating miR-204 or miR-558 expression.

4. Conclusion

Despite current therapies, acute MI and HF which often follow remain the leading causes of death and disability worldwide. New therapeutic strategies are therefore required to protect the heart against the detrimental effects of acute ischemia/reperfusion injury. Inhibition of macroautophagy during reperfusion prevented cardiomyocyte death and reduced myocardial infarct size; however, its induction during LVR preserved LV function and prevented the onset of HF. Most pharmacological agents used up to date for regulating macroautophagy are not specific and may interfere with other cellular processes, so it will be necessary to identify new therapeutic approaches to regulate autophagy. Several noncoding RNAs were shown to be modulated during I/R and involved on cardiac autophagy regulation. The tissue-specific expression of some noncoding RNAs and their easy manipulation show their potential as novel targets for clinical developments to treat autophagy-related diseases. Identification of specific cardiac noncoding RNAs that regulate autophagy could be a good opportunity to protect the heart from MI injury without affecting the autophagy activity in other organs.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

AT received a fellowship from Agence Nationale de la Recherche (ERA-NET Co-fund action ERA-CVD JTC2016 No. 680969) and EDD from “Fondation Lefoulon Delalande.” FP is a MC substitute member of European Cooperation in Science and Technology Action Transautophagy (CA15138) and is a MC member of European Cooperation in Science and Technology Action cardioRNA (CA1229).

References

- [1] M. A. Pfeffer and E. Braunwald, “Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications,” *Circulation*, vol. 81, no. 4, pp. 1161–1172, 1990.
- [2] M. St John Sutton, M. A. Pfeffer, T. Plappert et al., “Quantitative two-dimensional echocardiographic measurements are major predictors of adverse cardiovascular events after acute myocardial infarction. The protective effects of captopril,” *Circulation*, vol. 89, no. 1, pp. 68–75, 1994.
- [3] P. de Groote, M. Fertin, A. Duva Pentiah, C. Goéminne, N. Lamblin, and C. Bauters, “Long-term functional and clinical follow-up of patients with heart failure with recovered left ventricular ejection fraction after β -blocker therapy,” *Circulation. Heart Failure*, vol. 7, no. 3, pp. 434–439, 2014.
- [4] C. Bauters, E. Dubois, S. Porouchani et al., “Long-term prognostic impact of left ventricular remodeling after a first myocardial infarction in modern clinical practice,” *PLoS One*, vol. 12, no. 11, article e0188884, 2017.
- [5] Y. Ohsumi, “Historical landmarks of autophagy research,” *Cell Research*, vol. 24, no. 1, pp. 9–23, 2014.
- [6] A. Nakai, O. Yamaguchi, T. Takeda et al., “The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress,” *Nature Medicine*, vol. 13, no. 5, pp. 619–624, 2007.
- [7] B. Gan, X. Peng, T. Nagy, A. Alcaraz, H. Gu, and J.-L. Guan, “Role of FIP200 in cardiac and liver development and its regulation of TNF α and TSC-mTOR signaling pathways,” *The Journal of Cell Biology*, vol. 175, no. 1, pp. 121–133, 2006.
- [8] T. Kaizuka and N. Mizushima, “Atg13 is essential for autophagy and cardiac development in mice,” *Molecular and Cellular Biology*, vol. 36, no. 4, pp. 585–595, 2016.
- [9] L. Yan, D. E. Vatner, S.-J. Kim et al., “Autophagy in chronically ischemic myocardium,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 102, no. 39, pp. 13807–13812, 2005.
- [10] Y. Matsui, H. Takagi, X. Qu et al., “Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy,” *Circulation Research*, vol. 100, no. 6, pp. 914–922, 2007.
- [11] H. Kanamori, G. Takemura, K. Goto et al., “The role of autophagy emerging in postinfarction cardiac remodeling,” *Cardiovascular Research*, vol. 91, no. 2, pp. 330–339, 2011.
- [12] S. K. Gupta and T. Thum, “Non-coding RNAs as orchestrators of autophagic processes,” *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 95, pp. 26–30, 2016.
- [13] L. Yang, H. Wang, Q. Shen, L. Feng, and H. Jin, “Long non-coding RNAs involved in autophagy regulation,” *Cell Death & Disease*, vol. 8, no. 10, p. e3073, 2017.
- [14] T. Sun, M.-Y. Li, P.-F. Li, and J.-M. Cao, “MicroRNAs in cardiac autophagy: small molecules and big role,” *Cells*, vol. 7, no. 8, p. 104, 2018.
- [15] J. Kim, M. Kundu, B. Viollet, and K.-L. Guan, “AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1,” *Nature Cell Biology*, vol. 13, no. 2, pp. 132–141, 2011.
- [16] H.-X. Yuan, R. C. Russell, and K.-L. Guan, “Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress-induced autophagy,” *Autophagy*, vol. 9, no. 12, pp. 1983–1995, 2013.
- [17] J. Kim, Y. C. Kim, C. Fang et al., “Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy,” *Cell*, vol. 152, no. 1–2, pp. 290–303, 2013.
- [18] R. Kang, H. J. Zeh, M. T. Lotze, and D. Tang, “The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis,” *Cell Death and Differentiation*, vol. 18, no. 4, pp. 571–580, 2011.
- [19] X. Ma, H. Liu, S. R. Foyil et al., “Impaired autophagosome clearance contributes to cardiomyocyte death in ischemia/reperfusion injury,” *Circulation*, vol. 125, no. 25, pp. 3170–3181, 2012.
- [20] S. Sciarretta, D. Yee, N. Nagarajan et al., “Trehalose-induced activation of autophagy improves cardiac remodeling after myocardial infarction,” *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 71, no. 18, pp. 1999–2010, 2018.

- [21] S. J. Buss, S. Muenz, J. H. Riffel et al., "Beneficial effects of mammalian target of rapamycin inhibition on left ventricular remodeling after myocardial infarction," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 54, no. 25, pp. 2435–2446, 2009.
- [22] A. Das, A. Samidurai, and F. N. Salloum, "Deciphering Non-coding RNAs in cardiovascular health and disease," *Front Cardiovasc Med.*, vol. 5, p. 73, 2018.
- [23] W. Poller, S. Dimmeler, S. Heymans et al., "Non-coding RNAs in cardiovascular diseases: diagnostic and therapeutic perspectives," *European Heart Journal*, vol. 39, no. 29, pp. 2704–2716, 2018.
- [24] K. Wang, C.-Y. Liu, L.-Y. Zhou et al., "APF lncRNA regulates autophagy and myocardial infarction by targeting miR-188-3p," *Nature Communications*, vol. 6, no. 1, 2015.
- [25] P. Zhao, B.-L. Zhang, K. Liu, B. Qin, and Z.-H. Li, "Overexpression of miR-638 attenuated the effects of hypoxia/reoxygenation treatment on cell viability, cell apoptosis and autophagy by targeting ATG5 in the human cardiomyocytes," *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, vol. 22, no. 23, pp. 8462–8471, 2018.
- [26] H. Zhang, X. Zhang, and J. Zhang, "MiR-129-5p inhibits autophagy and apoptosis of H9c2 cells induced by hydrogen peroxide via the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway by targeting ATG14," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 506, no. 1, pp. 272–277, 2018.
- [27] X. Liu, Y. Deng, Y. Xu, W. Jin, and H. Li, "MicroRNA-223 protects neonatal rat cardiomyocytes and H9c2 cells from hypoxia-induced apoptosis and excessive autophagy via the Akt/mTOR pathway by targeting PARP-1," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 118, pp. 133–146, 2018.
- [28] J. Xiao, X. Zhu, B. He et al., "MiR-204 regulates cardiomyocyte autophagy induced by ischemia-reperfusion through LC3-II," *Journal of Biomedical Science*, vol. 18, no. 1, p. 35, 2011.
- [29] R. Qiu, W. Li, and Y. Liu, "MicroRNA-204 protects H9C2 cells against hypoxia/reoxygenation-induced injury through regulating SIRT1-mediated autophagy," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 100, pp. 15–19, 2018.
- [30] H. Shao, L. Yang, L. Wang, B. Tang, J. Wang, and Q. Li, "MicroRNA-34a protects myocardial cells against ischemia-reperfusion injury through inhibiting autophagy via regulating TNF α expression," *Biochemistry and Cell Biology*, vol. 96, no. 3, pp. 349–354, 2018.
- [31] S. Zhou, D. Lei, F. Bu, H. Han, S. Zhao, and Y. Wang, "MicroRNA-29b-3p targets SPARC gene to protect cardiocytes against autophagy and apoptosis in hypoxic-induced H9c2 cells," *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 2018.
- [32] X. Li, Z. Zeng, Q. Li et al., "Inhibition of microRNA-497 ameliorates anoxia/reoxygenation injury in cardiomyocytes by suppressing cell apoptosis and enhancing autophagy," *Oncotarget*, vol. 6, no. 22, pp. 18829–18844, 2015.
- [33] J. Zheng, J. Li, B. Kou, Q. Yi, and T. Shi, "MicroRNA-30e protects the heart against ischemia and reperfusion injury through autophagy and the Notch1/Hes1/Akt signaling pathway," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 41, no. 6, pp. 3221–3230, 2018.
- [34] K. Higashi, Y. Yamada, S. Minatoguchi et al., "MicroRNA-145 repairs infarcted myocardium by accelerating cardiomyocyte autophagy," *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, vol. 309, no. 11, pp. H1813–H1826, 2015.
- [35] L. Yan, N. Guo, Y. Cao et al., "miRNA-145 inhibits myocardial infarction-induced apoptosis through autophagy via Akt3/mTOR signaling pathway in vitro and in vivo," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 42, no. 3, pp. 1537–1547, 2018.
- [36] Q. Li, J. Xie, R. Li et al., "Overexpression of microRNA-99a attenuates heart remodelling and improves cardiac performance after myocardial infarction," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 18, no. 5, pp. 919–928, 2014.
- [37] J. Li, S. X. X. Cai, Q. He et al., "Intravenous miR-144 reduces left ventricular remodeling after myocardial infarction," *Basic Research in Cardiology*, vol. 113, no. 5, 2018.
- [38] C.-Y. Liu, Y.-H. Zhang, R.-B. Li et al., "LncRNA CAIF inhibits autophagy and attenuates myocardial infarction by blocking p53-mediated myocardial transcription," *Nature Communications*, vol. 9, no. 1, p. 29, 2018.
- [39] M. Zhou, Y.-G. Zou, Y.-Z. Xue et al., "Long non-coding RNA H19 protects acute myocardial infarction through activating autophagy in mice," *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, vol. 22, no. 17, pp. 5647–5651, 2018.
- [40] G. Yin, X. Yang, Q. Li, and Z. Guo, "GATA1 activated lncRNA (Galnt) promotes anoxia/reoxygenation-induced autophagy and cell death in cardiomyocytes by sponging miR-338," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 119, no. 5, pp. 4161–4169, 2018.
- [41] J. Wang, Z. Bie, and C. Sun, "Long noncoding RNA AK088388 regulates autophagy through miR-30a to affect cardiomyocyte injury," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 120, no. 6, pp. 10155–10163, 2019.
- [42] Z. Huang, B. Ye, Z. Wang et al., "Inhibition of lncRNA-HRIM increases cell viability by regulating autophagy levels during hypoxia/reoxygenation in myocytes," *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 46, no. 4, pp. 1341–1351, 2018.
- [43] M. Ma, J. Hui, Q. Zhang, Y. Zhu, Y. He, and X. Liu, "Long non-coding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1 inhibition blunts myocardial ischemia reperfusion injury via autophagic flux arrest and apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats," *Atherosclerosis*, vol. 277, pp. 113–122, 2018.
- [44] S. Yu, B. Dong, Z. Fang, X. Hu, L. Tang, and S. Zhou, "Knockdown of lncRNA AK139328 alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic mice via modulating miR-204-3p and inhibiting autophagy," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 22, no. 10, pp. 4886–4898, 2018.
- [45] M. Vausort, D. R. Wagner, and Y. Devaux, "Long noncoding RNAs in patients with acute myocardial infarction," *Circulation Research*, vol. 115, no. 7, pp. 668–677, 2014.
- [46] Z.-H. Zhao, W. Hao, Q.-T. Meng, X.-B. Du, S.-Q. Lei, and Z.-Y. Xia, "Long non-coding RNA MALAT1 functions as a mediator in cardioprotective effects of fentanyl in myocardial ischemia-reperfusion injury," *Cell Biology International*, vol. 41, no. 1, pp. 62–70, 2017.
- [47] H. Hu, J. Wu, D. Li, J. Zhou, H. Yu, and L. Ma, "Knockdown of lncRNA MALAT1 attenuates acute myocardial infarction through miR-320-Pten axis," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 106, pp. 738–746, 2018.
- [48] J. Li, J. Wang, Y. Chen et al., "LncRNA MALAT1 exerts oncogenic functions in lung adenocarcinoma by targeting miR-204," *American Journal of Cancer Research*, vol. 6, no. 5, pp. 1099–1107, 2016.
- [49] X. Guo, X. Wu, Y. Han, E. Tian, and J. Cheng, "LncRNA MALAT1 protects cardiomyocytes from isoproterenol-induced apoptosis through sponging miR-558 to enhance ULK1-mediated protective autophagy," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 234, no. 7, pp. 10842–10854, 2018.