



**HAL**  
open science

# Validation de biomarqueurs du remodelage de la matrice extracellulaire chez des patients ayant une insuffisance cardiaque : Données des études EPHESUS et CARE-HF

Wafae Iraqi

## ► To cite this version:

Wafae Iraqi. Validation de biomarqueurs du remodelage de la matrice extracellulaire chez des patients ayant une insuffisance cardiaque : Données des études EPHESUS et CARE-HF. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2009. Français. NNT : 2009NAN10083 . tel-01748321

**HAL Id: tel-01748321**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748321>**

Submitted on 29 Mar 2018

**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.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ - NANCY I**

**UFR MEDECINE**

**ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ  
ENVIRONNEMENT (BioSE)**

---

**Thèse**

**présentée pour l'obtention du titre de**

**Docteur de l'Université Henri Poincaré**

**en Pharmacologie**

**par Wafae IRAQI**

---

**VALIDATION DE BIOMARQUEURS DU REMODELAGE  
DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE CHEZ DES  
PATIENTS AYANT UNE INSUFFISANCE CARDIAQUE :  
DONNEES DES ETUDES EPHEBUS ET CARE-HF**

---

**Soutenance publique prévue le 16 octobre 2009**

**Membres du jury**

<b>Rapporteurs :</b>	Professeur Jean-Noël TROCHU	PU-PH, Nantes
	Professeur Alain COHEN-SOLAL	PU-PH Paris Lariboisière
<b>Examineurs :</b>	Professeur Pascal BOUSQUET	PU-PH, Strasbourg
	Docteur Patrick ROSSIGNOL	MCU-PH, Nancy (co-directeur de thèse)
	Pr Faiez ZANNAD	PU-PH, Nancy (directeur de thèse)

---

**CIC INSERM CHU de Nancy**  
Hôpital Jeanne d'Arc  
F -54200 DOMMARTIN LES TOUL

**INSERM U961 UFR Médecine**  
Faculté de Médecine  
9 avenue de la forêt de Haye - BP 184  
54500 Vandoeuvre-les-Nancy

# TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>6</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>10</b>
<b>1. LE PHENOMENE DE REMODELAGE</b>	
<b>VENTRICULAIRE .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1. LES MODIFICATIONS DE LA GEOMETRIE CARDIAQUE</b>	<b>12</b>
<b>1.2. L'HYPERTROPHIE MYOCYTAIRE ET LA DYSFONCTION</b>	
<b>CONTRACTILE .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2.1. LA DEFORMATION MECANIQUE (ETIREMENT/ TENSION PARIETALE).....</b>	<b>13</b>
<b>1.2.1.1 Les cardiomyocytes .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2.1.2 Les fibroblastes.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2.1.3 La dégradation du collagène .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2.2. LES IONS CALCIUM (Ca<sup>2+</sup>) .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2.3. L'ACTIVATION NEUROHORMONALE.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2.3.1 Les facteurs liés au Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone</b>	
<b>(SRAA) 14</b>	
<b>1.2.3.2 Les autres facteurs .....</b>	<b>15</b>
<b>1.3. LE REMODELAGE SUITE A UN IDM.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3.1. DEROULEMENT .....</b>	<b>15</b>
<b>1.3.2. MODIFICATIONS FONCTIONNELLES .....</b>	<b>16</b>
<b>1.4. LA PROGRESSION DE L'IC.....</b>	<b>16</b>
<b>2. L'EVALUATION DE LA FIBROSE PAR LES</b>	
<b>BIOMARQUEURS DU COLLAGENE DE LA MATRICE</b>	
<b>EXTRACELLULAIRE DANS L'INSUFFISANCE</b>	
<b>CARDIAQUE.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1. LES BIOMARQUEURS DANS LES PATHOLOGIES</b>	
<b>CARDIOVASCULAIRES .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.1. INTERETS DES BIOMARQUEURS .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.2. LES CRITERES D'EVALUATION D'UN BIOMARQUEUR.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.3. LES BIOMARQUEURS DANS L'INSUFFISANCE CARDIAQUE.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2. REMODELAGE VENTRICULAIRE, BIOMARQUEURS DU</b>	
<b>COLLAGENE DE LA MEC ET FIBROSE DANS L'INSUFFISANCE</b>	
<b>CARDIAQUE .....</b>	<b>26</b>
<b>2.2.1. LE REMODELAGE ET LA FIBROSE CARDIAQUE .....</b>	<b>26</b>
<b>2.2.1.1 L'aldostérone et la fibrose cardiaque.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2.1.2 Les interventions pharmacologiques sur la fibrose cardiaque.....</b>	<b>27</b>

2.2.1.2.1	<i>Les antagonistes de l'aldostérone</i> .....	27
2.2.1.2.2	<i>Les autres inhibiteurs du SRAA</i> .....	28
2.2.1.2.3	<i>Les autres traitements de l'IC</i> .....	28
2.2.2.	<b>LES BIOMARQUEURS DU COLLAGÈNE DE LA MEC</b> .....	31
2.2.2.1	<b>La fibrose et le turnover de la MEC</b> .....	31
2.2.2.2	<b>Les biomarqueurs de la MEC dans l'IC, statut des connaissances</b> ...	31
2.3.	<b>ASYNCHRONISME ET FIBROSE</b> .....	44
2.3.1.	<b>L'ASYNCHRONISME</b> .....	44
2.3.2.	<b>LA RELATION AVEC LA FIBROSE</b> .....	45
2.4.	<b>LA THÉRAPIE DE RESYNCHRONISATION CARDIAQUE</b> .	46
2.4.1.	<b>LES EFFETS DE LA TRC SUR LA FIBROSE</b> .....	46
2.4.2.	<b>LES LIMITES DE LA TRC</b> .....	47
3.	<b>HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL</b> .....	49
4.	<b>RESULTATS</b> .....	51
4.1.	<b>RESULTATS DE L'ÉTUDE EPHEBUS</b> .....	51
4.2.	<b>RESULTATS DE L'ÉTUDE CARE-HF</b> .....	62
4.3.	<b>RESULTATS ADDITIONNELS NON PUBLIÉS DANS LES</b>	
	<b>ARTICLES PRÉSENTÉS</b> .....	86
4.3.1.	<b>ÉTUDE EPHEBUS</b> .....	86
4.3.2.	<b>ÉTUDE CARE-HF</b> .....	87
4.3.2.1	<b>MMP-1</b> .....	87
4.3.2.1.1	<i>Concentrations initiales de MMP-1 dans l'étude CARE-HF</i> .....	87
4.3.2.1.2	<i>Cinétique de MMP-1 dans l'étude CARE-HF</i> .....	88
4.3.2.2	<b>Combinaison entre des concentrations de NT-ProBNP et PIIINP</b>	
	<b>supérieures et inférieures à la médiane pour évaluer la réponse à la TRC</b> .....	89
5.	<b>DISCUSSION</b> .....	90
5.1.	<b>DIFFÉRENCES ENTRE LES POPULATIONS EPHEBUS ET</b>	
	<b>CARE-HF</b> .....	91
5.2.	<b>UTILISATION DES BIOMARQUEURS DE LA FIBROSE</b>	
	<b>COMME INDICE PRONOSTIQUE</b> .....	94
5.2.1.	<b>DANS L'IC CHRONIQUE, ÉTUDE CARE-HF</b> .....	94
5.2.2.	<b>DANS L'IC EN PHASE AIGUË, ÉTUDE EPHEBUS</b> .....	99
5.3.	<b>LES BIOMARQUEURS COMME OUTIL D'EXPLORATION</b>	
	<b>DE PROCESSUS PATHOLOGIQUES</b> .....	100
5.3.1.	<b>DANS L'IC CHRONIQUE, ÉTUDE CARE-HF</b> .....	100
5.3.1.1	<b>Les biomarqueurs de la MEC et la fibrose</b> .....	100
5.3.1.2	<b>Les biomarqueurs de la MEC et l'inflammation</b> .....	101
5.3.1.3	<b>Les biomarqueurs de la MEC et la fonction rénale</b> .....	102
5.3.2.	<b>DANS L'IC EN PHASE AIGUË, ÉTUDE EPHEBUS</b> .....	103
5.3.2.1	<b>Les biomarqueurs de la MEC et la fibrose</b> .....	103
5.3.2.2	<b>Les biomarqueurs de la MEC et l'inflammation</b> .....	104
5.3.2.3	<b>Les biomarqueurs de la MEC et la fonction rénale</b> .....	105
5.4.	<b>UTILISATION DES BIOMARQUEURS DE LA FIBROSE</b>	
	<b>DANS LE MONITORING THÉRAPEUTIQUE DE L'IC</b> .....	105
5.4.1.	<b>DANS L'IC CHRONIQUE, ÉTUDE CARE-HF</b> .....	105
5.4.2.	<b>DANS L'IC EN PHASE AIGUË, ÉTUDE EPHEBUS</b> .....	107
5.4.3.	<b>PREDICTEUR DE LA RÉPONSE AU TRAITEMENT</b> .....	108

5.5.	AVANTAGES ET LIMITES DE NOS TRAVAUX .....	109
5.5.1.	POPULATIONS.....	109
5.5.2.	CHOIX DES BIOMARQUEURS .....	110
6.	PERSPECTIVES .....	111
6.1.	HYPOTHESES ET OBJECTIFS .....	111
6.1.1.	LA COMPREHENSION DES MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE.....	111
6.1.1.1	Dans l'IC suite à une HTA .....	111
6.1.1.2	Dans l'IC suite à une ischémie chronique .....	112
6.1.1.3	Dans l'IC suite à un IDM.....	112
6.1.2.	LE LIEN ENTRE LES BENEFICES CLINIQUES DU TRAITEMENT ET LE REMODELAGE MATRICIEL .....	112
6.1.3.	L'ESTIMATION PRONOSTIQUE ET LA STRATIFICATION DU RISQUE .....	113
6.1.4.	LA DECISION ET LA SURVEILLANCE THERAPEUTIQUE.....	114
6.2.	APPROCHES .....	115
6.2.1.	CHOIX DES BIOMARQUEURS .....	115
6.2.2.	CHOIX DES POPULATIONS .....	116
6.2.2.1	Réseau European In Genius HyperCare Network of Excellence (NoE) .....	117
6.2.2.2	Cohorte Stanislas.....	118
6.2.2.3	Etude Epidémiologie et Pronostic de l'IC Aigue en Lorraine II (Epical II) .....	119
6.2.2.4	Etude Multicenter, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled study to Evaluate the Long term Efficacy and Safety of Oral Tolvaptan Tablets in Subjects Hospitalized with Worsening Congestive Heart Failure (EVEREST).....	120
6.2.2.5	Etude A Study to Evaluate the Use of Rosuvastatin in Subjects on Regular Haemodialysis: An Assessment of Survival and Cardiovascular Events (AURORA).....	121
6.2.2.6	Etude Heart Failure : A Controlled Trial Investigating Outcomes of Exercise Training (HF-ACTION).....	122
	CONCLUSION .....	124
	BIBLIOGRAPHIE .....	125

## **LISTE DES FIGURES**

<b>Figure 1 : Les critères d'évaluation des biomarqueurs cardiovasculaires en clinique et le statut des biomarqueurs du collagène en 2009 .....</b>	<b>21</b>
<b>Figure 2 : Les applications cliniques des biomarqueurs cardiovasculaires et la place potentielle des biomarqueurs du collagène .....</b>	<b>22</b>
<b>Figure 3 : Les biomarqueurs, leurs effets et leurs traitements .....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 4 : Mécanismes de formation de la fibrose induite par l'aldostérone dans le cœur (74) .....</b>	<b>30</b>
<b>Figure 5 : Evolution de BNP pendant les 9 mois de suivi dans l'étude EPHEBUS .....</b>	<b>86</b>
<b>Figure 6 : Evolution de MMP-1 pendant les 18 mois de suivi dans l'étude CARE-HF ...</b>	<b>88</b>

## **LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau 1: Concentrations initiales de MMP-1.....</b>	<b>87</b>
<b>Tableau 2 : Association entre les concentrations initiales des biomarqueurs et le critère de réponse basée sur la survie à 18 mois sans hospitalisation pour aggravation de l'insuffisance cardiaque .....</b>	<b>89</b>
<b>Tableau 3: Comparaison des caractéristiques initiales des patients avec biomarqueurs des groupes placebo et contrôle des études EPHEBUS et CARE-HF.....</b>	<b>92</b>
<b>Tableau 4: Comparaison des caractéristiques initiales des patients avec biomarqueurs des groupes placebo et contrôle des études RALES et CARE-HF et des patients de l'étude RECOVER avec biomarqueurs .....</b>	<b>95</b>



## LISTE DES ABREVIATIONS

**95IC:** Intervalle de confiance à 95 %

**AATI :** Antagoniste du Récepteur ATI de l'angiotensine II

**ADN:** acide désoxyribonucléique

**ARN:** acide ribonucléique

**AURORA:** A Study to Evaluate the Use of Rosuvastatin in Subjects on Regular Haemodialysis: An Assessment of Survival and Cardiovascular Events

**AV :** Auriculo-ventriculaire

**BBG :** Bloc de Branche Gauche

**BNP:** peptide natriurétique de type B

**CARE-HF:** Cardiac Resynchronisation in Heart Failure Study

**CASHMERE:** Carotid Atorvastatin Study in Hyperlipidemic post-MENopausal women: a Randomized Evaluation of atorvastatin versus placebo

**CHARM:** Candesartan in Heart failure-Assessment of Reduction in Mortality and morbidity

**CIBIS:** Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study

**CIC:** Centre d'Investigation Clinique

**CMP:** Centre de Médecine Préventive

**CNAM :** Caisse Nationale d'Assurance Maladie

**CRP:** protéine réactive C

**DCI :** Défibrillateur Cardiaque Implantable

**DC :** Débit Cardiaque

**DFG:** débit de filtration glomérulaire

**DS :** Déviation standard

**ECG:** Electrocardiogramme

**ELITE:** Losartan Heart Failure Survival Study

**EPHESUS:** Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study

**EPICAL:** Epidémiologie et Pronostic de l'IC Aigue en Lorraine

**ESC:** Société Européenne de Cardiologie

**EVEREST:** Multicenter, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled study to Evaluate the Long term Efficacy and Safety of Oral Tolvaptan Tablets in Subjects Hospitalized with Worsening Congestive Heart Failure

**FDA:** US Food and Drug Administration

**FE:** Fraction d'Ejection

**FEVG :** Fraction d'Ejection du Ventricule Gauche

**FHS:** Framingham Heart Study

**Gal-3:** Galectine-3

**GRACE:** Global Registry of Acute Coronary Events

**hs-CRP :** protéine réactive C ultrasensible

**HF-ACTION:** Heart Failure: A Controlled Trial Investigating Outcomes of Exercise Training

**HTA:** Hypertension Artérielle

**IC:** Insuffisance Cardiaque

**ICH :** International Conference on Harmonisation

**ICTP :** Téllopeptide carboxy-terminal du collagène de type I

**IDM :** Infarctus du Myocarde

**IEC :** Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion

**IIQ :** Intervalle Interquartile

**IL :** Interleukine

**IR:** Insuffisance Rénale

**JRP:** Joint Research Project

**LDL:** Low Density Lipoprotein

**MEC :** Matrice Extracellulaire

**MMP :** Matrix Metalloproteinase

**NCEP-ATPIII:** National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III

**Ng/ml:** nanogramme par millilitre

**NGAL:** neutrophil gelatinase-associated lipocalin

**NHANES:** National Health and Nutrition Examination Survey

**NHLBI:** National Heart, Lung and Blood Institute

**NIH:** National Institutes of Health

**NO:** oxyde nitrique

**NT-ProBNP:** fragment N-terminal du propeptide natriurétique de type B

**NYHA:** New York Heart Association

**OD:** Oreillette Droite

**OG:** Oreillette Gauche

**OPTIMAAL:** The Optimal Trial in Myocardial Infarction with the Angiotensin II Antagonist Losartan

**OR:** Odds Ratio

**PCRD:** Project for Conflict Resolution and Development

**Pg/ml :** picogramme par millilitre

**PGE-2:** prostaglandine E2

**PICP :** Peptide carboxy-terminal du procollagène de type I

**PINP :** Peptide amino-terminal du procollagène de type I

**PIIINP :** Peptide amino-terminal du procollagène de type III

**Pro-ANP:** propeptide N-terminal du facteur atrial natriurétique

**PROSPECT:** Predictors of response to cardiac resynchronization therapy

**RALES:** Randomized ALdactone Evaluation Study

**RECOVER:** Research into Etanercept: CytOkine antagonism in VEntriculaR dysfunction

**SAU :** Service d'Accueil des Urgences

**SCA :** syndrome coronarien aigu

**SICA :** syndrome d'IC Aiguë

**SM :** syndrome métabolique

**SRAA:** Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone

**ST2:** thrombomoduline 2

**TAPSE :** Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion

**TIMP:** Tissue Inhibitor of Metalloproteinase

**TGF- $\beta$ :** Transforming growth factor beta

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

**TRC:** thérapie de resynchronisation cardiaque

**Val-HeFT:** Valsartan Heart Failure Trial

**VD :** Ventricule Droit

**VG :** Ventricule Gauche

# INTRODUCTION

## DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES

L'insuffisance cardiaque (IC) est définie comme l'incapacité du cœur à pomper suffisamment de sang pour répondre aux besoins de l'organisme. Il s'agit d'une des maladies cardiovasculaires les plus importantes dans les pays industrialisés (1-9), en termes de santé publique et de mobilisation de ressources de santé. C'est la seule maladie cardiovasculaire dont l'incidence et la prévalence augmentent encore à cause du vieillissement de la population, de la prévention des évènements coronaires et de l'amélioration de la prise en charge, augmentant la survie des patients qui subissent un évènement coronaire.

D'après la Société Européenne de Cardiologie (ESC), qui représente 51 pays comptant plus de 900 millions d'habitants, au moins 15 millions de personnes seraient atteintes d'IC (7, 10). La prévalence de l'IC est comprise entre 2 et 3 % et augmente brutalement à partir de 75 ans pour atteindre 10 à 20 % chez les personnes âgées de 70 à 80 ans (7, 8, 10). Malgré un traitement optimal, la moitié des patients chez qui un diagnostic d'IC a été porté, meurt dans un délai de 4 ans, et 40 % des patients hospitalisés pour IC décèdent ou sont ré hospitalisés dans l'année (2, 7, 8). L'âge moyen des patients IC dans les pays industrialisés est de 75 ans et la survenue d'épisodes aigus d'IC est à l'origine de 5 % des hospitalisations. L'IC est présente chez 10 % des patients hospitalisés et représente environ 2 % des dépenses de santé principalement du fait du coût des hospitalisations (2, 7, 8).

D'après les résultats de l'étude National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) sur la cohorte Framingham Heart Study (FHS) suivie pendant 44 ans, et sur la cohorte formée par leurs descendants suivie pendant 20 ans, 80 % des hommes et 70 % des femmes (de moins de 65 ans) présentant une IC mouraient dans les 8 années suivantes (11). L'étude National Health and Nutrition Examination Survey : NHANES (1999-2004) a montré que 5 300 000 américains âgés de 20 ans ou plus souffraient d'une IC et que 660 000 autres développaient une IC chaque année (12, 13). L'incidence et la prévalence de l'IC chronique sont directement corrélées à l'âge, le taux annuel de survenue d'une IC pour 1000 personnes chez les femmes et les hommes est respectivement de 15,2 et 8,2 chez les 65-74 ans, 31,7 et 19,8 chez les 75-84 ans et 65,2 et 45,6 chez les 85 ans et plus (12, 13). L'incidence de la mort subite chez les patients IC chroniques est 6 à 9 fois supérieure à celle de la population générale avec un taux de mortalité de 20 % par an (12, 13). Avec les progrès des moyens thérapeutiques et chirurgicaux, les hospitalisations des patients IC chroniques ont augmenté de 400 000 à

1 084 000 entre 1979 et 2005 aux Etats-Unis, et le taux de mortalité due à l'IC chronique demeure aussi important en 2004 qu'en 1994 avec 284 365 et 284 087 décès respectivement (12, 13).

### **ETIOLOGIES**

La maladie coronaire [dont la complication majeure est l'infarctus du myocarde (IDM)] et l'hypertension artérielle (HTA) sont les causes les plus fréquentes d'IC, 70 % des IC faisant suite à une maladie coronaire (10). Dix pour cent des IC sont dues à des cardiomyopathies [d'origine familiale ou non, hypertrophique, dilatée, restrictive, due à une arythmie du ventricule gauche (VG) ou non classée] et 10 % à des valvulopathies (10). Le diabète, le tabagisme, le surpoids, le sexe masculin et la sédentarité sont également associés à un risque accru d'IC (7, 9).

Si les maladies coronaires représentent l'étiologie la plus courante d'IC, l'IC, fréquente lors des syndromes coronariens aigus (SCA), aggrave de façon significative le pronostic des patients souffrant d'une pathologie cardiaque ischémique (14). L'étude GRACE (Global Registry of Acute Coronary Events), qui était une étude prospective sur des patients hospitalisés pour un SCA, a montré que les patients qui avaient une IC à l'admission présentaient un taux de mortalité 3 fois supérieur au cours des 6 mois suivant la sortie d'hôpital (8.5 % contre 2.8 % respectivement ;  $p < 0.0001$ ) et également un risque accru d'être ré hospitalisés (23.6 % contre 15.7 % ;  $p < 0.001$ ) par rapport aux patients qui n'avaient pas d'IC compliquant le SCA (15).

L'origine de l'IC peut être soit unique comme c'est le cas dans les cardiomyopathies hypertrophiques familiales, soit représenter un contexte complexe réunissant plusieurs conditions comme la coronaropathie et l'HTA.

# **1. LE PHENOMENE DE REMODELAGE VENTRICULAIRE**

La plupart des maladies liées à des défaillances myocardiques sont généralement précédées par une hypertrophie cellulaire et du cœur lui-même. Le développement de cette hypertrophie myocardique représente initialement un mécanisme de compensation face au stress hémodynamique (16, 17).

Les apports bénéfiques initiaux de cette hypertrophie comprennent l'augmentation du nombre d'éléments contractiles, une diminution de la tension pariétale à cause d'une augmentation de l'épaisseur de la paroi de façon concentrique et d'une augmentation du volume d'éjection (16).

Cette hypertrophie s'accompagne de modifications structurales au niveau des cardiomyocytes qui se traduisent par des altérations de la taille et de la géométrie cardiaque (18), qu'on appelle le phénomène de remodelage.

Le remodelage cardiaque peut survenir après un IDM, une surcharge en pression (sténose aortique, HTA), une maladie inflammatoire du muscle cardiaque (myocardite), une cardiomyopathie dilatée idiopathique ou une surcharge en volume (régurgitation valvulaire). Même si les causes de ces pathologies sont différentes, elles partagent plusieurs voies en termes d'évènements moléculaires, biochimiques et mécaniques (1).

## **1.1. LES MODIFICATIONS DE LA GEOMETRIE CARDIAQUE**

Le remodelage cardiaque peut être défini par des modifications moléculaires, cellulaires, matricielles et de l'expression du génome qui se manifestent cliniquement par des modifications de la taille, de la forme et de la fonction du cœur à la suite d'une lésion cardiaque (1). En effet, comme le cœur se remodèle, sa géométrie change ; il devient moins elliptique et plus sphérique (19). Des modifications de la masse, de la composition et du volume ventriculaire, avec des conséquences défavorables sur la fonction cardiaque surviennent également (16, 20, 21).

## **1.2. L'HYPERTROPHIE MYOCYTAIRE ET LA DYSFONCTION CONTRACTILE**

Dans l'hypertrophie faisant suite à une surcharge en pression, de nouveaux sarcomères vont s'assembler en parallèle, aboutissant à un élargissement des cardiomyocytes, à une hypertrophie concentrique et à une fonction systolique initialement conservée.

A l'inverse, dans les surcharges en volume, de nouveaux sarcomères s'assemblent en série aboutissant à un allongement des cardiomyocytes, une dilatation ventriculaire et une dysfonction plus précoce.

L'hypertrophie myocytaire et myocardique est stimulée par plusieurs voies de signalisation, qui aboutissent à un processus hypertrophique pathologique avec une dysfonction contractile et un mauvais pronostic (17).

### **1.2.1. LA DEFORMATION MECANIQUE (ETIREMENT/ TENSION PARIETALE)**

Un stress hémodynamique augmenté est perçu par les myocytes, entraînant des modifications de l'expression des gènes myocardiques. Il a été suggéré que la déformation mécanique active les canaux ioniques, se transmettant alors à la membrane nucléaire par le biais du cytosquelette (22).

#### **1.2.1.1 Les cardiomyocytes**

Les cardiomyocytes sont très impliqués dans le processus de remodelage. De tous les composants de la paroi cardiovasculaire, les myocytes sont ceux qui ont été le plus étudiés au vu de leur activité contractile et de leur nombre dans le cœur.

En réponse à une lésion, le nombre de myocytes diminue et les myocytes survivants deviennent plus allongés ou hypertrophiés prenant part à un processus initial de compensation pour maintenir le volume d'éjection systolique après une perte du tissu contractile. L'épaisseur de la paroi ventriculaire augmente également (21).

Les modifications des conditions de charge étirent les membranes cellulaires et pourraient jouer un rôle en induisant l'expression de gènes associés à l'hypertrophie. Dans les cardiomyocytes, cela peut entraîner la synthèse de nouvelles protéines contractiles et l'assemblage de nouveaux sarcomères. L'augmentation de la tension pariétale peut précipiter le déséquilibre énergétique et l'ischémie, qui est l'un des déterminants majeurs de la demande myocardique en oxygène. On pense que ceci aboutit à un cercle vicieux avec augmentation de la tension pariétale et de l'épaisseur de la paroi puis déséquilibre énergétique et ischémie.

### **1.2.1.2 Les fibroblastes**

Les fibroblastes et les cellules endothéliales sont activés en réponse à une lésion ischémique. Dans les modèles animaux et humains, la stimulation des fibroblastes augmente la synthèse du collagène et cause la fibrose à la fois de la zone infarctée du ventricule mais également de la zone non infarctée, contribuant donc au remodelage (23). Une étude récente a révélé une fonction paracrine des fibroblastes cardiaques de régulation de la prolifération des cardiomyocytes (24).

### **1.2.1.3 La dégradation du collagène**

Le rôle de la dégradation du collagène et le remodelage fibrotique seront abordés au chapitre 2.2.

## **1.2.2. LES IONS CALCIUM ( $Ca^{2+}$ )**

Les ions calcium ( $Ca^{2+}$ ) intracellulaires régulent l'hypertrophie myocytaire via la voie de la calcineurine, une phosphatase sensible au  $Ca^{2+}$ , ou encore de la calmoduline kinase. Ces 2 voies sont activées par une augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire, et elles peuvent être impliquées dans des réponses hypertrophiques suite à des anomalies des mécanismes de transport du  $Ca^{2+}$ , ou en réponse à un signal neurohormonal-cytokinique (25-27).

## **1.2.3. L'ACTIVATION NEUROHORMONALE**

L'activation neurohormonale dans l'IC est connue pour réguler les modifications compensatoires en réponse à la diminution du débit cardiaque (DC), mais elle est aussi un composant majeur de la progression de l'IC et du processus de remodelage (28-30). Les médiateurs neurohormonaux et les facteurs autocrines/paracrines incluent la norépinéphrine, l'angiotensine II, l'endothéline-1, le Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), les cytokines pro-inflammatoires Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ ) et interleukines (IL). Ils vont entraîner une modification de l'expression de gènes induisant des modifications des protéines contractiles (31).

L'hypertrophie ne dépend donc pas seulement d'une augmentation quantitative des protéines contractiles mais plutôt de modifications qualitatives de l'expression des gènes entraînant une altération de la fonction contractile (32).

### **1.2.3.1 Les facteurs liés au Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA)**

Les concentrations de norépinéphrine plasmatique, qui reflètent une activation adrénergique, sont élevées chez les patients IC (29) et liées au pronostic (28).



En culture cellulaire, l'angiotensine II augmente la synthèse d'ADN dans les fibroblastes cardiaques, et augmente la synthèse des protéines dans les fibroblastes et les myocytes (33). Il semble qu'il s'agisse d'un important médiateur de la réponse cellulaire au stretch, avec une production locale aboutissant à une prolifération et une croissance cellulaire (34). L'angiotensine II augmente également la perméabilité des artères coronaires, permettant la diffusion de facteurs de croissance dans l'interstitium myocardique (35). Ceci cause la nécrose et la fibrose à travers ses effets cytotoxiques sur les myocytes cardiaques.

L'augmentation de la production d'aldostérone comme conséquence de l'augmentation de l'angiotensine II a des conséquences hémodynamiques et stimule la synthèse de collagène par les fibroblastes myocardiques (36). Les concentrations augmentées d'aldostérone peuvent aussi jouer un rôle sur la mort des myocytes à travers un effet de balance électrolytique.

### **1.2.3.2 Les autres facteurs**

Les effets sur le remodelage de facteurs autres que ceux liés spécifiquement au SRAA et au système sympathique comprennent la production d'endothéline, de cytokines, d'oxyde nitrique (NO), et le stress oxydant.

## **1.3. LE REMODELAGE SUITE A UN IDM**

Dans les modèles post-infarctus le processus de remodelage du VG débute rapidement \_habituellement dans les premières heures après la survenue de l'infarctus\_ et continue à progresser (1, 37). Le déroulement de ces événements dans le temps est influencé cependant par la sévérité de la pathologie sous-jacente, les événements secondaires (comme les récives d'IDM), d'autres facteurs comme l'ischémie ou l'activation neurohormonale, le génotype et le traitement (20, 38).

### **1.3.1. DEROULEMENT**

Les modifications observées (21, 35, 39) après une lésion myocardique sont les suivantes :

- Allongement des cardiomyocytes
- Rétrécissement de la paroi ventriculaire
- Elargissement de la zone infarctée (plutôt qu'allongement)
- Inflammation du tissu nécrotique
- Cicatrisation
- Elargissement de la zone infarctée qui continue
- Dilatation et remodelage du VG

- Hypertrophie myocytaire
- Perte continue de myocytes
- Accumulation excessive de collagène dans la matrice extracellulaire (MEC)

Même si une vision exacte de l'ensemble des voies et cellules impliquées dans le remodelage du VG n'est pas encore totalement connue, le scénario suivant a été suggéré au niveau moléculaire : avec l'étirement des myocytes, l'activité locale de la norépinéphrine et la libération locale d'angiotensine et d'endothéline augmentent. Ces modifications vont stimuler l'expression de protéines modifiées et l'hypertrophie myocytaire. Le résultat final de cette séquence d'évènements est une dégradation de la performance cardiaque et une activation neurohormonale augmentée. De plus, une activation augmentée de l'aldostérone et des cytokines pourrait aussi stimuler la synthèse de collagène, entraînant ainsi une fibrose et un remodelage de la MEC (développée dans le chapitre 2).

### **1.3.2. MODIFICATIONS FONCTIONNELLES**

La phase initiale de remodelage conduisant à la réparation de la région nécrotique et à la cicatrisation, pourrait dans une certaine mesure être considérée comme bénéfique. Ce réarrangement cellulaire de la paroi ventriculaire est associé à un maintien voire une amélioration du DC mais aussi à une augmentation du volume du VG. L'ampleur des modifications du remodelage est grossièrement reliée à la taille de l'infarctus. Après un mois de suivi, il a été observé qu'un infarctus important provoquait une dilatation plus importante et des stress systoliques et diastoliques supérieurs, en comparaison d'infarctus moins étendus (21).

## **1.4. LA PROGRESSION DE L'IC**

Le remodelage cardiaque a été décrit comme étant à la fois un processus d'adaptation et de décompensation, avec une composante adaptative (compensatoire) permettant au cœur de maintenir sa fonction en réponse à une lésion cardiaque (40). Les augmentations de la charge cardiaque, comme celles observées dans l'insuffisance mitrale, modulent le remodelage du ventricule pour maintenir le débit, mais souvent après une lésion cardiaque (comme l'IDM), ce remodelage peut ne pas assurer l'intégrité de la circulation. Dans de telles circonstances, le remodelage peut être considéré comme un évènement défavorable qui aboutit à une décompensation progressive.

La progression du remodelage peut toujours être considérée comme délétère et associée à un mauvais pronostic (41).

Les thérapeutiques modernes de l'IC doivent une grande partie de leur effet au fait qu'elles agissent sur le remodelage (voir chapitre 2.2.1.2.).

Les mécanismes responsables de la transition de l'hypertrophie de compensation (adaptative) à l'IC ne sont pas encore élucidés, mais plusieurs mécanismes ont été proposés et étudiés, dont les anomalies du métabolisme énergétique, les modifications de l'expression ou de la fonction des protéines contractiles, les anomalies du couplage excitation-contraction (dans la physiopathologie de l'IC diastolique), les anomalies du cytosquelette, les altérations de la transduction du signal adrénérgique, la formation de fibrose interstitielle ou encore l'apoptose (32).

Une hypothèse pour le rôle de l'apoptose dans l'IC est qu'une dysfonction progressive du VG se produit en partie comme la conséquence de la mort cellulaire continue des myocytes (42). L'importance de ce type de mort cellulaire dans le remodelage cardiaque humain n'est pas encore fermement établie, mais il a été démontré comme se produisant de façon plus importante après une lésion due à une ischémie, une reperfusion et un IDM (43). L'apoptose pourrait être un mécanisme de régulation important impliqué dans la réponse adaptative à une surcharge de pression dans laquelle l'apoptose est liée à l'hypertrophie cardiaque. D'autres mécanismes connus de l'apoptose incluent les cytokines (surtout le TNF- $\alpha$  et les ILs), le stress oxydant et les lésions mitochondriales (44).

## **2. L'ÉVALUATION DE LA FIBROSE PAR LES BIOMARQUEURS DU COLLAGÈNE DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE DANS L'INSUFFISANCE CARDIAQUE**

### **2.1. LES BIOMARQUEURS DANS LES PATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES**

#### **2.1.1. INTÉRÊTS DES BIOMARQUEURS**

La morbi-mortalité importante liée aux maladies cardiovasculaires ainsi que le poids qu'elles représentent en terme de dépenses de santé en ont fait un but primordial de recherche pour la santé publique. Malgré des facteurs de risques bien établis (comme le sexe ou l'âge) connus dans les maladies cardiovasculaires, tous les patients à risque ne peuvent pas être encore identifiés. En conséquence les recherches sur le développement de nouveaux biomarqueurs cardiovasculaires qui pourraient diagnostiquer, prévenir et/ou participer à la stratification du risque des pathologies cardiovasculaires, et/ou discuter et adapter le traitement se multiplient depuis ces 10 dernières années (45-48).

Les biomarqueurs comprennent à la fois des marqueurs du risque encouru, des marqueurs de détermination du stade de la maladie ou encore des critères de substitution ou surrogate endpoints. Ces derniers sont obligatoirement des paramètres biologiques, dont l'objectif est uniquement de se substituer à un critère clinique dans un essai clinique. D'après les critères définis par l'International Conference on Harmonisation (ICH) « Statistical principles for Clinical Trials (46), pour qualifier un surrogate endpoint il faut montrer (i) une plausibilité biologique de la relation avec le processus de la pathologie, (ii) une valeur pronostique du surrogate endpoint sur la survenue d'évènements dans la maladie et (iii) des résultats issus d'essais cliniques prouvant qu'ils sont capables de détecter la dépendance du véritable critère clinique sur l'intervention (traitement à l'étude) (45, 46).

Pour qu'un biomarqueur soit reconnu comme un surrogate endpoint valide, il faut d'abord qu'il ait reçu l'approbation de la FDA pour pouvoir servir en pratique clinique et dans le processus d'approbation de nouvelles thérapeutiques. C'est le cas des low density protein (LDL), acceptés comme un surrogate endpoint cardiovasculaire.

Dans la littérature, le terme « biomarqueur » renvoie généralement à des molécules circulant dans le sang ou dans les urines, mais la définition établie lors de la conférence consensus

« Advancing Clinical Research and Applications » organisée par la US Food and Drug Administration (FDA) et le National Institutes of Health (NIH) en avril 1999, désigne un biomarqueur comme un « critère qui est mesuré et évalué comme un inducteur de processus physiologiques normaux, de processus pathologiques ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique » (49). Ainsi l'électrocardiogramme (ECG) ou la mesure de la densité osseuse sont considérés également comme des biomarqueurs.

Il faut distinguer 2 processus d'acceptation d'un biomarqueur (45):

- La validation, qui consiste à analyser la méthode de mesure et ses caractéristiques et à déterminer les conditions suivant lesquelles la méthode pourra donner des résultats reproductibles et précis.
- La qualification, qui est le processus prouvant une relation significative entre le biomarqueur et les processus biologiques et critères d'évaluation clinique.

Les nouveaux biomarqueurs sont découverts

- soit par le biais de la connaissance de la physiopathologie sous jacente (approche ciblée) comme cela a été le cas pour la protéine réactive C (CRP) (48), un biomarqueur de l'inflammation qui est l'une des voies impliquées dans la physiopathologie de l'athérosclérose, ou encore le peptide natriurétique de type B (BNP) et le fragment N-terminal du propeptide natriurétique de type B (NT-ProBNP) (48) qui ont été validés comme biomarqueurs diagnostiques et pronostiques dans l'IC congestive en soins intensifs (50-52). Ils apportent également une information pronostique indépendante chez les patients IC en ambulatoire (53, 54).
- soit par la surveillance systématique du sang ou du plasma de sujets présentant ou non la pathologie d'intérêt (approche « non biaisée ») (47), ce qui a été réalisé pour la thrombomoduline 2 (ST2) qui est un biomarqueur de stress myocytaire dans l'IC (47, 55).

### **2.1.2. LES CRITERES D'EVALUATION D'UN BIOMARQUEUR**

Face à cet arsenal d'outils, Morrow DA et de Lemos JA. ont rappelé les critères de référence permettant d'évaluer la pertinence et la qualité d'un biomarqueur cardiovasculaire ainsi que les applications cliniques de ces biomarqueurs (Figures 1 et 2) (56). Même si peu des biomarqueurs étudiés et cités dans le présent document ne remplissent pas les 3 critères définis dans l'article de Morrow et de Lemos (56), ils n'en restent pas moins des outils

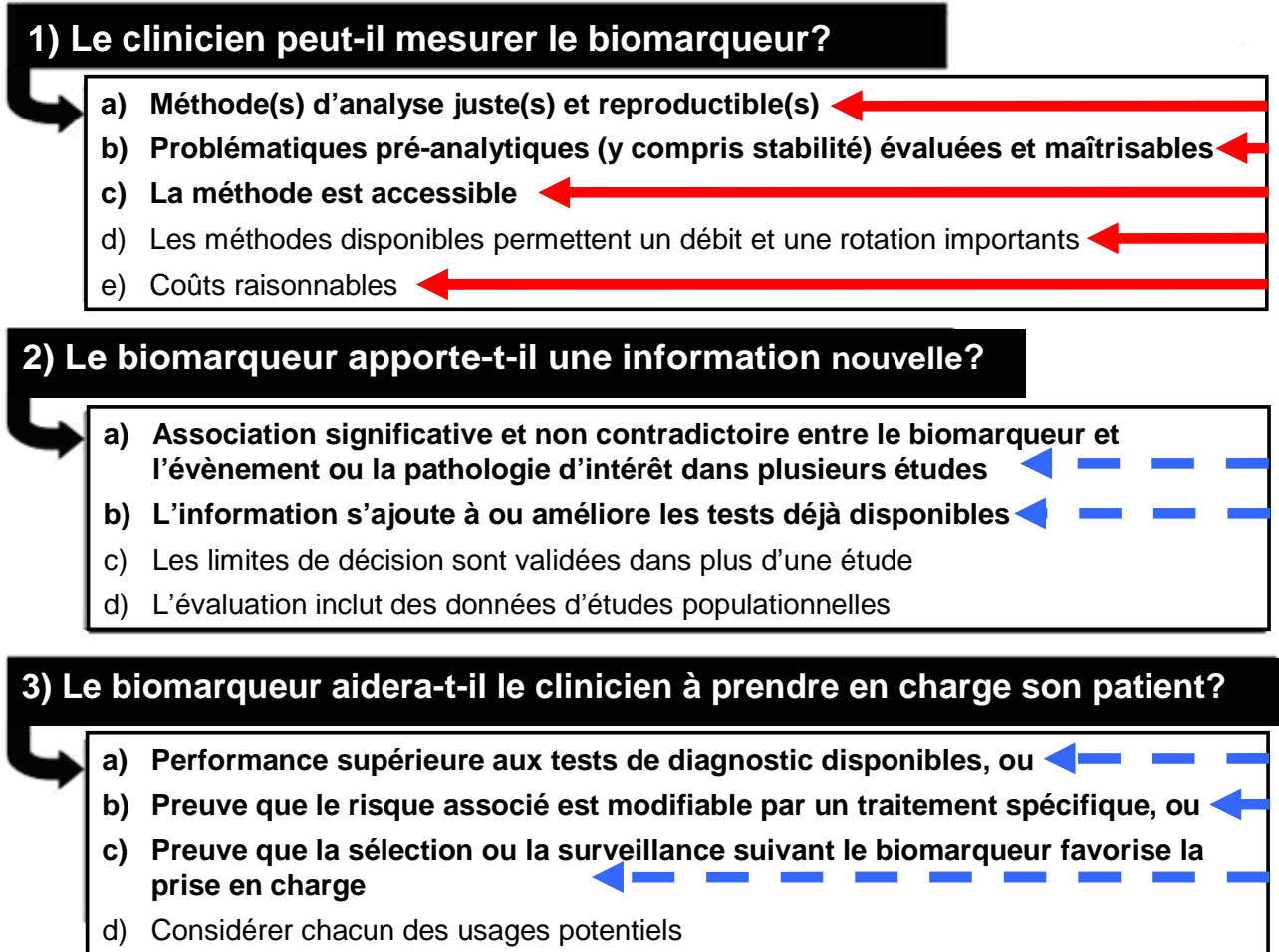
apportant une information importante sur la physiopathologie, le diagnostic, la stratification du risque encouru par les patients ou encore le suivi de l'effet du traitement dans l'IC.

L'approche traditionnelle pour évaluer l'IC se basait sur les étiologies de l'insuffisance de la pompe cardiaque (comme la maladie artérielle coronaire chronique), les caractéristiques physiopathologiques (comme l'IC systolique), et la sévérité de l'IC (55). Une approche par les biomarqueurs pourrait compléter ce principe. Les biomarqueurs de l'IC résumés au chapitre 2.1.3 de ce travail sont généralement évalués de façon individuelle. Une stratégie regroupant plusieurs marqueurs s'est montrée utile pour affiner la stratification du risque chez des patients présentant des SCA (57), chez des participants de l'étude Framingham (58) et la même stratégie commence à être étudiée dans l'IC (59).

Les biomarqueurs de l'IC présentés dans ce travail (chapitre 2.1.3) apportent en majorité une information sur le pronostic, mais l'analyse d'un groupe diversifié de biomarqueurs dans une cohorte importante de patients avec une IC suivis de façon prospective pourrait identifier ceux qui parmi eux pourraient indépendamment prédire la survenue d'évènements. De plus, à l'intérêt des biomarqueurs utilisés comme marqueurs de la stratification du risque, pourrait s'ajouter l'intérêt de réaliser des études évaluant leur rôle dans la surveillance thérapeutique et la sélection du traitement le plus efficace. Seuls les peptides natriurétiques sont pour l'instant reconnus comme utiles dans ces objectifs.

**Figure 1: Les critères d'évaluation des biomarqueurs cardiovasculaires en clinique et le statut des biomarqueurs du collagène en 2009**

*Modifiée à partir de Morrow DA et de Lemos JA. Circ. 2007 (56)*



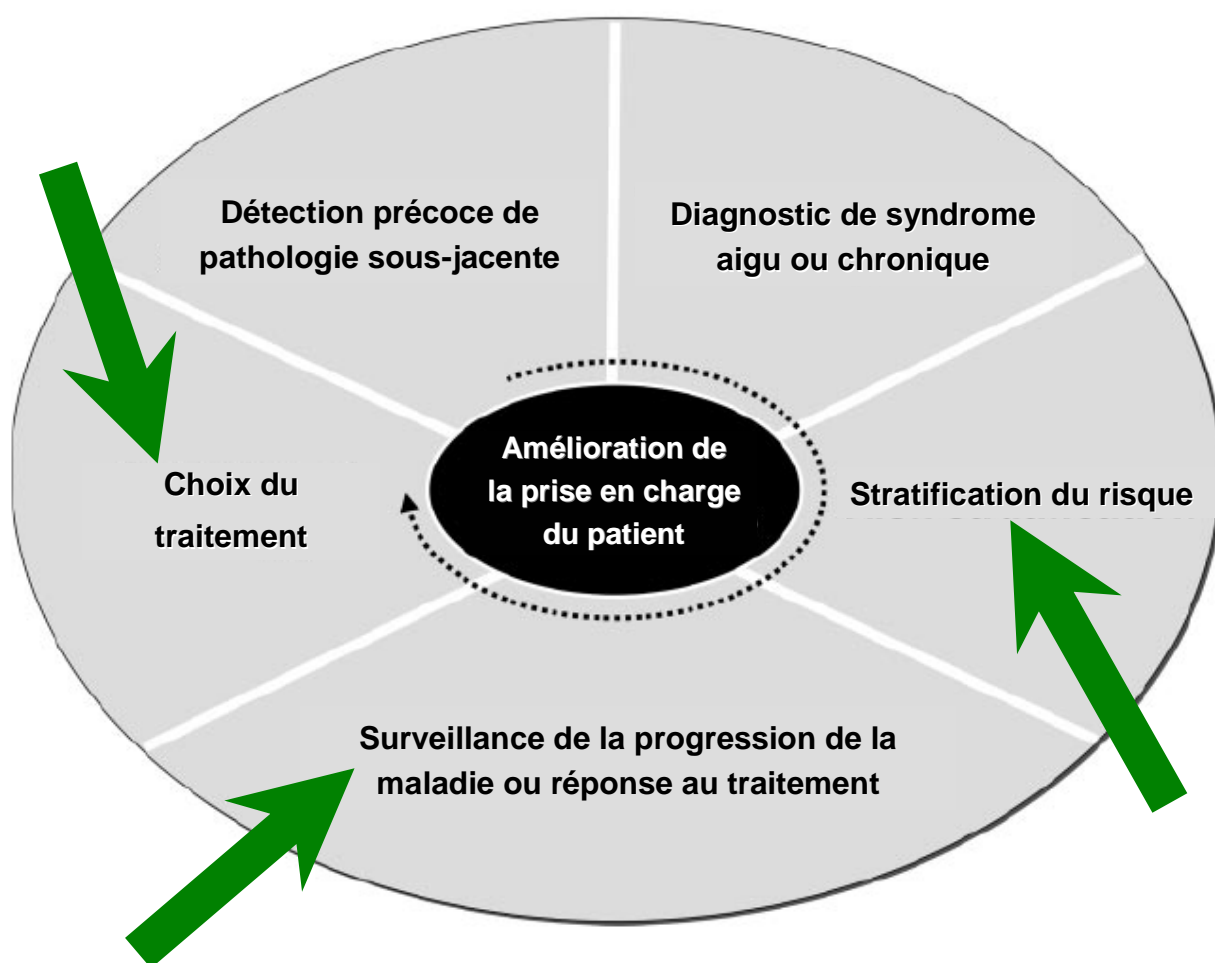
*Les assertions **en gras** représentent les critères prioritaires.*

*Les **flèches rouges** correspondent aux étapes déjà franchies pour les biomarqueurs du collagène de la matrice extracellulaire cardiaque.*

*Les **flèches bleues** correspondent aux étapes que nous essayons de franchir à travers nos travaux.*

**Figure 2 : Les applications cliniques des biomarqueurs cardiovasculaires et la place potentielle des biomarqueurs du collagène**

*Modifiée à partir de Morrow DA et de Lemos JA. Circ. 2007 (56)*



Les **flèches vertes** correspondent aux utilisations potentielles pour les biomarqueurs du collagène de la matrice extracellulaire cardiaque.

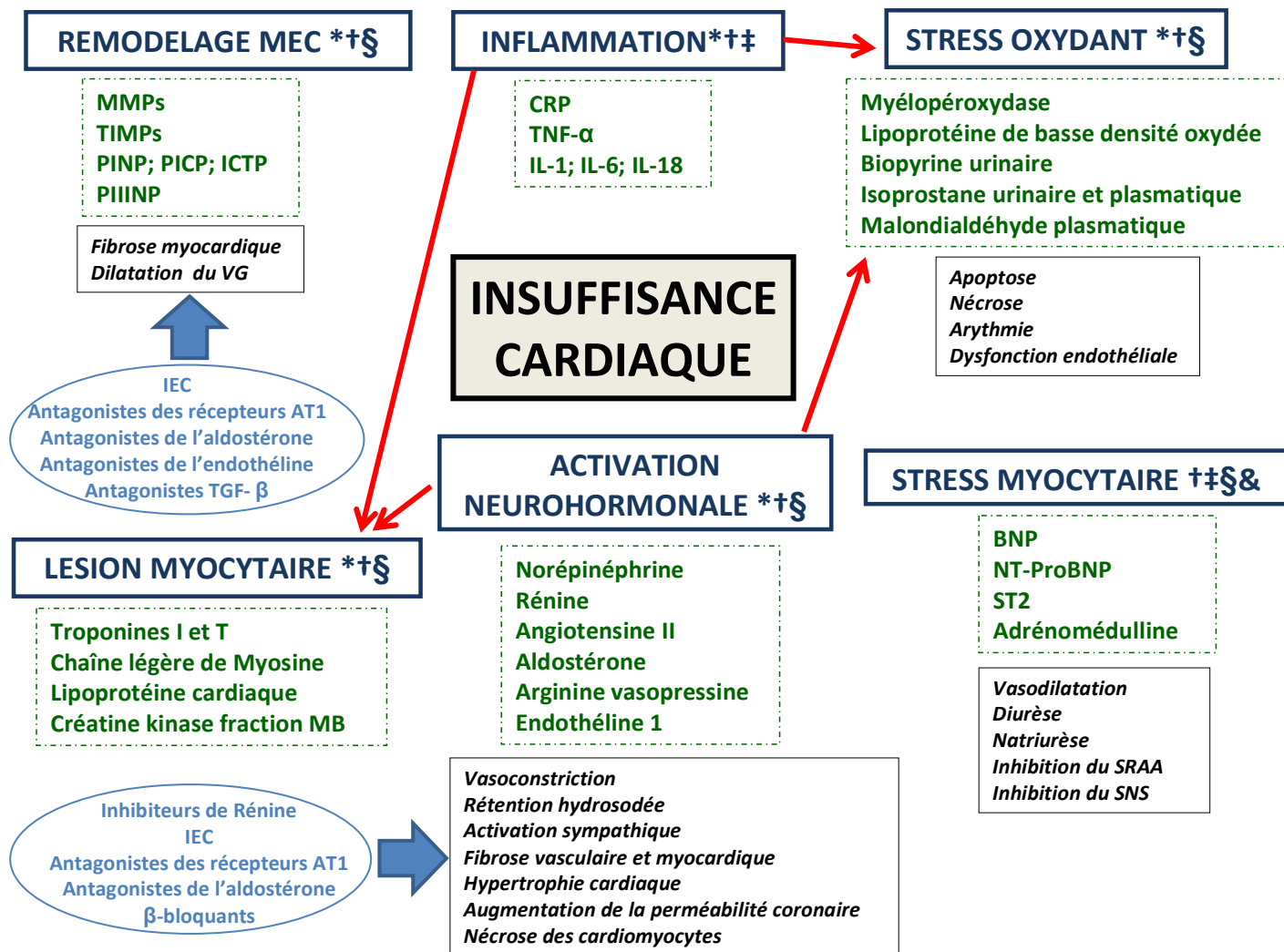


### **2.1.3. LES BIOMARQUEURS DANS L'INSUFFISANCE CARDIAQUE**

Les facteurs impliqués dans le remodelage sont nombreux. En clinique, ils peuvent être évalués par le dosage des biomarqueurs (60, 61). Les biomarqueurs de l'IC peuvent être des médiateurs neurohormonaux (comme le BNP), des indicateurs de la réponse inflammatoire (très nombreux mais sans spécificité : IL-1, IL-2, IL-18 et autres cytokines, CRP), et des marqueurs de l'agression myocytaire (comme la Troponine) et du remodelage (32, 55, 61-63). La figure 3 résume les biomarqueurs utilisés dans l'insuffisance cardiaque, leurs effets et les traitements de l'IC agissant sur ces biomarqueurs.

**Figure 3 : Les biomarqueurs, leurs effets et leurs traitements**

Réalisée à partir de Braunwald E. N Engl J Med. 2008 (55)



#### « CATEGORIE » DU BIOMARQUEUR

- ‡ *Biomarqueurs permettant d'identifier les sujets à risque de développer une IC*
- § *Biomarqueurs représentant une cible thérapeutique potentielle*
- \* *Biomarqueurs contribuant à élucider la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque*
- † *Biomarqueurs donnant une information pronostique et permettant la stratification du risque*
- & *Biomarqueurs utiles pour le diagnostic de l'IC et la surveillance du traitement*

#### BIOMARQUEUR

#### Effets



SNS : système nerveux sympathique

Les autres abréviations sont les mêmes que celles utilisées dans le texte.

Les **flèches rouges** indiquent les stimulations potentielles d'une voie vers une autre.

## **2.2. REMODELAGE VENTRICULAIRE, BIOMARQUEURS DU COLLAGENE DE LA MEC ET FIBROSE DANS L'INSUFFISANCE CARDIAQUE**

### **2.2.1. LE REMODELAGE ET LA FIBROSE CARDIAQUE**

Le remodelage cardiaque aboutit à une fibrose cardiaque. Elle est à l'origine des troubles du rythme ventriculaire et également d'une rigidité ventriculaire responsable d'une dysfonction diastolique puis systolique (64). Ces mécanismes sont à l'origine des symptômes congestifs qui contribuent à la progression de l'IC et aboutissent à une hétérogénéité tissulaire, un asynchronisme et des arythmies (22). La fibrose myocardique est l'un des acteurs principaux de la morbi-mortalité liée à l'IC (65). Elle est la conséquence de processus pathologiques variés mettant en jeu des facteurs mécaniques, inflammatoires et neurohormonaux (66-71).

#### **2.2.1.1 L'aldostérone et la fibrose cardiaque**

L'aldostérone est un minéralocorticoïde puissant qui favorise la rétention sodée et l'augmentation de la pression artérielle. Indépendamment des effets indirects de l'angiotensine II et de l'aldostérone sur la fonction cardiaque au cours de l'IC, effets résultants de la rétention de sodium, de l'expansion des espaces extra-vasculaires et de l'hypervolémie, des preuves expérimentales et cliniques suggèrent que l'aldostérone et l'angiotensine II pourraient également jouer un rôle dans l'hypertrophie cardiaque (72, 73). Il existe en effet des études montrant que le cœur est équipé d'une synthèse fonctionnelle d'aldostérone qui pourrait participer à la fibrose myocardique et est régulée par l'angiotensine II (74).

Dans le cœur, l'aldostérone agit via les récepteurs minéralocorticoïdes pour augmenter la MEC et le dépôt de collagène. L'aldostérone favorise la fibrose myocardique dans plusieurs modèles expérimentaux (75, 76). Les formes pathologiques de la géométrie du VG ont été associées avec des augmentations des concentrations plasmatiques d'aldostérone chez des patients avec une HTA et un début précoce d'hypertrophie du VG a été décrit chez des patients avec un aldostéronisme primaire.

La production d'aldostérone est stimulée dans le ventricule humain insuffisant de façon proportionnelle à la sévérité de l'IC (77). L'angiotensine II modifie les concentrations cardiaques d'aldostérone, exerçant par conséquent des modifications dans l'accumulation du collagène. La production d'aldostérone est également sous le contrôle d'autres facteurs comme le potassium et la corticotrophine, indépendamment de l'angiotensine II. Ceci suggère

la possibilité que des variations locales d'aldostérone, même quand le SRAA est bloqué, peuvent participer au contrôle du turnover de la MEC (75).

### **2.2.1.2 Les interventions pharmacologiques sur la fibrose cardiaque**

La fibrose peut être réversible, du moins avant la cicatrisation. Les médicaments anti-fibrotiques comme les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC), les antagonistes du récepteur AT1 de l'angiotensine (AATI), les antagonistes de l'aldostérone, et les statines peuvent jouer un rôle thérapeutique en augmentant le turnover du collagène myocardique et le processus de fibrose chez les patients IC (78).

#### *2.2.1.2.1 Les antagonistes de l'aldostérone*

Des observations expérimentales et cliniques avec la spironolactone, un antagoniste des récepteurs minéralocorticoïdes, ont mis en évidence les effets délétères potentiels de l'aldostérone sur les structures et fonctions cardiaques.

Dans plusieurs études, la spironolactone s'oppose à l'action de l'aldostérone qui favorise la fibrose myocardique (75, 76, 79). Une faible dose de spironolactone, sans effet sur la pression artérielle et peu ou pas d'effet sur la masse ventriculaire, peut prévenir de façon sélective l'accumulation du collagène dans des modèles d'hypertension rénovasculaire et aldostéronique chez le rat (80).

La fibrose induite par l'aldostérone est présente dans les 2 ventricules et est indépendante des facteurs hémodynamiques. L'augmentation cardiaque et aortique, liée à l'âge, de l'accumulation de la MEC ne peut être empêchée par les IEC tandis qu'un traitement par spironolactone peut la prévenir sans affecter la pression artérielle chez des rats âgés normotendus (81).

La densité ventriculaire des récepteurs AT1 est augmentée chez des rats traités pendant un mois avec de l'aldostérone et un régime haut en sel, cette augmentation étant empêchée par la spironolactone et le losartan (76).

Les effets cardioprotecteurs de la spironolactone peuvent expliquer les bénéfices sur la survie d'un traitement anti-aldostérone chez des patients avec une IC chronique sévère évalués dans l'étude Randomized ALdactone Evaluation Study (RALES) (82). Il a été suggéré que différents mécanismes pouvaient y contribuer. La spironolactone pourrait être bénéfique car elle s'oppose aux effets de l'aldostérone comme la rétention sodée, la perte de magnésium et de potassium, l'activation sympathique, l'inhibition parasympathique, la fonction barorécepteur, les altérations vasculaires et la compliance artérielle (83-85). La spironolactone pourrait aussi s'opposer à la fibrose cardiaque favorisée par l'aldostérone (75).

Dans quelle mesure les effets bénéfiques de l'éplérénone, un antagoniste sélectif des récepteurs minéralocorticoïdes, sur la morbi-mortalité chez des patients avec un IDM compliqué par une IC et une dysfonction du VG, pourraient passer par une amélioration du remodelage matriciel dans l'étude Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) fait l'objet d'une partie de ce travail (86).

#### 2.2.1.2.2 Les autres inhibiteurs du SRAA

Les autres inhibiteurs du SRAA comme les IEC et les AATI préviennent le remodelage et réduisent la fibrose dans l'hypertrophie cardiaque hypertensive et après un IDM, ce qui contribue probablement de façon importante à leurs bénéfices cliniques (74). Les IEC et les AATI (mais pas des récepteurs AT2), diminuent le dépôt de collagène dans le cœur chez les rats spontanément hypertendus.

Les mécanismes cardioprotecteurs de l'action des IEC peuvent être attribués au blocage local de la formation d'angiotensine II, à la dégradation de la bradykinine ou à la libération de NO et/ou d'eicosanoïdes. Les IEC diminuent également le dépôt de collagène dans le cœur des rats après un IDM suggérant que ce dépôt de collagène pourrait être dû en partie à des mécanismes autres que ceux passant par les récepteurs AT1. Néanmoins, d'autres recherches sont nécessaires pour résoudre les différents mécanismes impliqués dans l'action des IEC ou des AATI sur le dépôt de collagène dans le cœur (72).

Dans un modèle génétique de rat hypertendu, l'administration d'un antagoniste AATI entraînait la stimulation de la dégradation du collagène et inversait le processus de fibrose myocardique (87). Les facteurs produits par les myocytes sont nécessaires à la régulation des gènes du collagène *in vitro*. L'interaction fibroblastes-myocytes est également indispensable à la régulation du collagène produit par l'action de l'angiotensine II (88). Le blocage des récepteurs AT1 par le losartan aboutit à l'inhibition de l'expression de l'inhibiteur tissulaire naturel des métalloprotéinases de type 1 (TIMP-1) et à la stimulation de l'activité des collagénases dans le VG de rats spontanément hypertendus (87). Il a été suggéré que l'angiotensine II pourrait faciliter la fibrose myocardique chez des rats spontanément hypertendus en diminuant la dégradation extracellulaire des fibres de collagène par des collagénases.

#### 2.2.1.2.3 Les autres traitements de l'IC

Les autres médicaments comme la digoxine, les bêta-bloquants ( $\beta$ -bloquants), les agonistes des récepteurs du TNF- $\alpha$  et les antagonistes de l'endothéline pourraient exercer des effets via

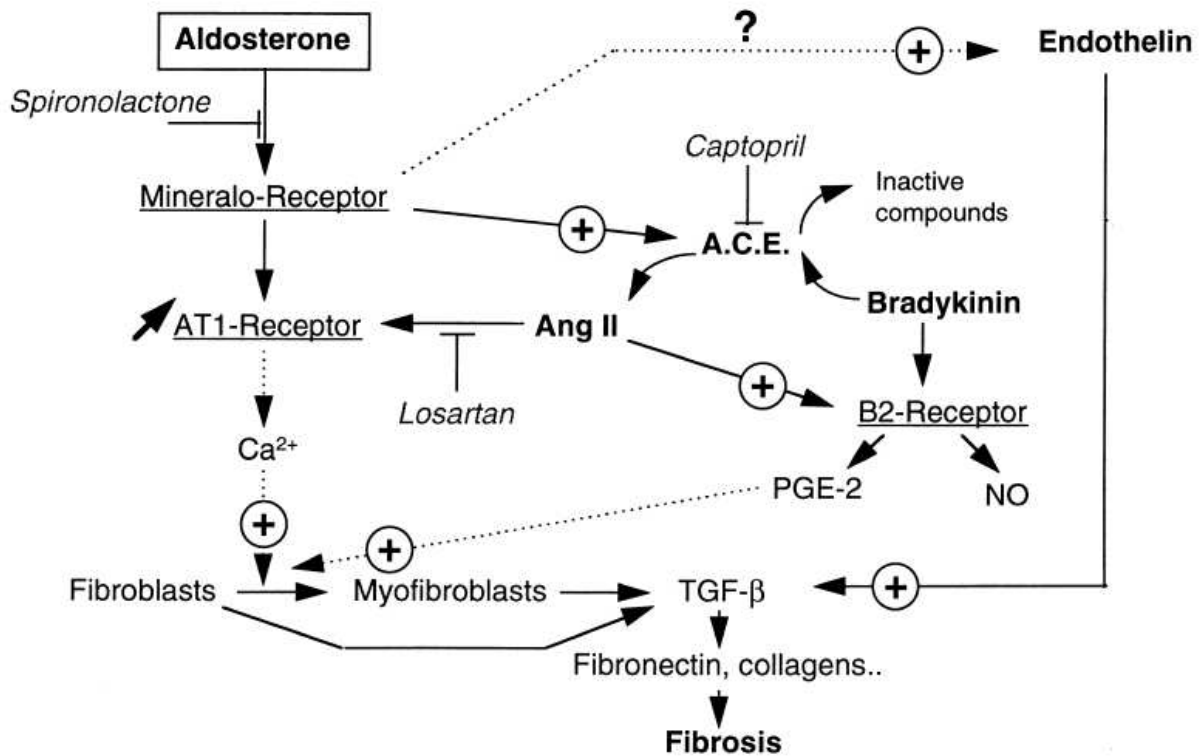
la modulation du turnover de la MEC. Chez des patients présentant une maladie cardiaque hypertensive, le lisinopril, un IEC, réduit la fibrose myocardique, indépendamment de la régression de l'hypertrophie du VG (89). Cette action s'accompagnait d'une amélioration de la fonction diastolique du VG (89).

L'endothéline 1 semble médier les effets de l'angiotensine II sur le cœur. Elle est synthétisée par les cardiomyocytes et les fibroblastes et stimule la synthèse des collagènes de type I et III (90). Chez des rats avec une IC chronique, le blocage des récepteurs de l'endothéline réduit l'accumulation du collagène dans le VG. Il reste à étudier si un mécanisme similaire s'opère dans le cœur humain insuffisant.

La figure 4 (76) résume les mécanismes de formation de la fibrose myocardique induite par l'aldostérone et les médicaments agissant sur ces mécanismes.

**Figure 4 : Mécanismes de formation de la fibrose induite par l'aldostérone dans le cœur (74)**

*Modifiée à partir de Delcayre C et Silvestre JS. Cardiovasc Res. 1999.*



*Les mécanismes de formation de l'aldostérone dans le cœur sont détaillés dans le chapitre 2.2.1.1.*

*Il semble que ces actions et interactions hormonales ne sont pas réalisées dans le même type de cellule et dans le même temps.*

*Les flèches en pointillés indiquent des voies identifiées mais qui ne sont pas encore totalement connues.*

*Abréviations : AT1-R: antagoniste du récepteur de type 1 de l'angiotensine II; ACE: Enzyme de conversion de l'angiotensine; PGE-2: prostaglandine E2; TGF-β: Transforming growth factor-β.*



## **2.2.2. LES BIOMARQUEURS DU COLLAGÈNE DE LA MEC**

Les modifications de la géométrie, du volume et de la fonction du VG, conséquences du remodelage, peuvent être évaluées par imagerie cardiaque (91, 92). La radiographie thoracique permet de reconnaître la silhouette cardiaque et de faire la part de la dilatation des différentes cavités. L'examen clé de l'évaluation des patients en IC, est l'échocardiographie Doppler. Elle permet d'estimer les fonctions systoliques et diastoliques du VG, le DC ou encore d'apprécier le diamètre du VG ...

### **2.2.2.1 La fibrose et le turnover de la MEC**

Mais si l'imagerie classique permet d'avoir une approche correcte du remodelage ventriculaire myocytaire, celui de la MEC ne peut être à ce jour montré par ce biais.

La fibrose myocardique est le résultat d'une augmentation de la synthèse des collagènes de type I et III de la MEC par les fibroblastes ou d'une dégradation du collagène extracellulaire par les métalloprotéinases (MMPs) inchangée ou diminuée (93, 94). Les fibroblastes altèrent ainsi l'équilibre entre les MMPs et leurs inhibiteurs tissulaires naturels (TIMPs) et favorisent la fibrose (95). De plus l'activation du SRAA et les concentrations augmentées de TGF- $\beta$  vont mobiliser les fibroblastes et stimuler le dépôt de la MEC, contribuant à la fibrose et l'amplification du statut pro-fibrotique (96).

Le turnover de la MEC est influencé par différentes conditions pathologiques comme l'inflammation, le stretch ou les phénomènes ischémiques. Des mesures non invasives de ce turnover au moyen des marqueurs sériques du collagène de la MEC permettent de surveiller « à distance » la réparation du tissu cardiaque et la fibrose, à la fois dans les modèles expérimentaux et dans les conditions cliniques (60, 97-114) telles que l'IC chronique (113, 115), l'IC diastolique (116, 117), l'obésité (118), l'HTA (119), les cardiomyopathies hypertrophique (120) et diabétique (121), les pathologies de la conduction cardiaque (122), et chez les patients à risque élevé (123).

### **2.2.2.2 Les biomarqueurs de la MEC dans l'IC, statut des connaissances**

Notre équipe a participé comme laboratoire central pour les biomarqueurs du collagène dans plusieurs essais cliniques multicentriques comme OPTIMAAL (The Optimal Trial in Myocardial Infarction with the Angiotensin II Antagonist Losartan) (124), EPHEBUS (86), RALES (113, 115), RECOVER (Research into Etanercept: Cytokine antagonism in VEntriculaR dysfunction) (115), CARE-HF (Cardiac Resynchronisation in Heart Failure Study) (246), CASHMERE (Carotid Atorvastatin Study in Hyperlipidemic post-MENopausal

women: a Randomized Evaluation of atorvastatin versus placebo) (125), EVEREST (Multicenter, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled study to Evaluate the Long term Efficacy and Safety of Oral Tolvaptan Tablets in Subjects Hospitalized with Worsening Congestive Heart Failure) (126)...

Notre équipe a publié le 29 avril 2009 dans le journal Heart Failure Review un article intitulé : « Extracellular matrix fibrotic markers in heart failure », qui constitue un rapport de l'état actuel des connaissances sur les biomarqueurs du collagène de la MEC dans l'IC (127).

Cet article présente les différents biomarqueurs de synthèse et de dégradation des collagènes de type I et III de la MEC (60, 74, 97, 98, 128-134) et justifie l'utilisation de ces biomarqueurs pour l'évaluation de la fibrose, reflet du remodelage cardiaque, dans différentes conditions cliniques dont l'IC chronique et à la suite d'un IDM (60, 74, 86, 97, 98, 115, 128-134). Il rappelle aussi les résultats probants retrouvés avec ces biomarqueurs utilisés comme critère pronostique et critère intermédiaire de réponse au traitement de la fibrose par un antagoniste de l'aldostérone à travers les résultats de l'étude RALES sur les biomarqueurs (113).

# Extracellular matrix fibrotic markers in heart failure

Faiez Zannad · Patrick Rossignol · Wafae Iraqi

© Springer Science+Business Media, LLC 2009

**Abstract** Given the importance of fibrous tissue in leading to myocardial dysfunction, non-invasive assessment of fibrosis could prove a clinically useful tool in heart failure (HF) patients. Biomarkers may be used for early detection of otherwise subclinical disease, diagnostic assessment of an acute or chronic clinical syndrome, risk stratification of patients with a suspected or confirmed diagnosis, selection of an appropriate therapeutic intervention and monitoring the response to therapy. Extracellular matrix (ECM) biomarkers in HF are promising biomarkers. They are able to detect early changes in heart and large vessel structure and function and transition to HF. High ECM biomarker levels have been associated with poor outcome. The ability of treatment to reduce myocardial fibrosis in HF patients may be monitored by the measurement of various serum peptides arising from the metabolism of collagen types. Biomarkers may be selectively influenced by pharmacological agents.

**Keywords** Biomarkers · Collagen peptides · Extracellular matrix · Heart failure · Hypertension · Myocardial infarction

## Abbreviations

ACE	Angiotensin converting enzyme
baPWV	Brachial-ankle pulse wave velocity
BNP	Brain natriuretic peptide
CHF	Congestive heart failure
DCT	Deceleration time of the mitral E wave
ECM	Extracellular matrix
HD	Patients with Hypertension and type II Diabetes
ICTP	Type I pyridinoline cross-linked C-terminal telopeptide
LV	Left ventricular
LVH	Left ventricular hypertrophy
LVM	Left ventricular mass
LVMi	Left ventricular mass index
MMPs	Matrix MetalloProteinases
PICP	Procollagen type I C-terminal propeptide
PINP	Procollagen type I N-terminal propeptide
PIIINP	N terminal type III collagen peptide
SHR	Spontaneously hypertensive rats
TIMP	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases

F. Zannad · P. Rossignol  
Hypertension and Heart Failure Unit, Department of Cardiology,  
Hôpital Brabois, CHU de Nancy, Nancy F-54000, France

F. Zannad (✉) · P. Rossignol · W. Iraqi  
Centre d'Investigation Clinique (CIC) INSERM-CHU, Inserm-  
CHU, Centre d'Investigation Clinique (CIC) de Nancy CIC-P  
9501, Hôpital Jeanne d'Arc, B.P. 90303, Dommartin-lès-Toul  
F-54201, France  
e-mail: f.zannad@chu-nancy.fr

F. Zannad · P. Rossignol · W. Iraqi  
Inserm U684, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-les-Nancy  
F-54505, France

F. Zannad · P. Rossignol · W. Iraqi  
Faculté de Médecine, Nancy-Université, Vandoeuvre-les-Nancy  
F-54505, France

## Introduction

Extracellular matrix composition and potential monitoring by blood biomarkers

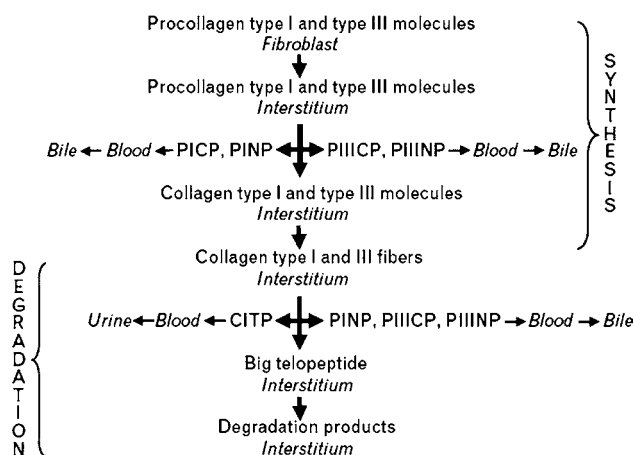
Myocytes and fibroblasts are supported by the extracellular matrix (ECM), which consists of a macromolecular network of fibres. Collagen is the principal structural protein.

Its synthesis and degradation result from a balance among ischaemia, stretch, inflammation and biochemical mediators. Collagen types I and III are the most abundant in the myocardium. Type I has a poor specificity, but represents the majority of cardiac collagen (85%) and confers tensile strength and resistance to stretch and deformation. Type III, less abundant but more specific to the heart, confers resilience [1–3].

Fibrillar collagens within the myocardium are substrates for matrix metalloproteinases (MMPs). Among the MMPs, MMP-1 has the highest affinity for fibrillar collagen and preferentially degrades collagens I and III [3]. MMP-1 accounts for the degradation of up to 40% of the newly synthesized collagen in different tissues. The net level of MMP-1 activity is dependent on the relative concentrations of active enzyme and of a family of naturally occurring tissue inhibitors of metalloproteinases, namely tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). MMP-1 and TIMP-1 are co-expressed in cardiac fibroblasts and are tightly regulated for maintaining the architecture of the ECM [4]. ECM remodelling is an essential process in cardiac remodelling, hypertensive cardiac hypertrophy, dilated cardiomyopathy and post-infarction healing [5]. CITP is a pyridinoline—cross-linked telopeptide produced as a result of the hydrolysis of collagen type I fibrils by matrix metalloproteinase-1 and is a marker of collagen type I degradation [5].

Changes in ECM matrix turnover may lead to cardiac fibrosis. Cardiac fibrosis is a major determinant of diastolic dysfunction and pumping capacity, and it may provide the structural substrate for arrhythmogenicity, thus potentially contributing to the progression of congestive heart failure (CHF) and to sudden death. The proliferation, the phenotypic transformation and/or the stimulation of activity of fibroblasts are associated with variations in MMPs expression and are important processes of ventricular remodelling in the pathophysiology of hypertension, myocardial infarction and heart failure (HF).

Given the importance of fibrous tissue in leading to myocardial dysfunction and failure, non-invasive assessment of fibrosis could prove a clinically useful tool, particularly given the potential for cardioprotective and cardioreparative pharmacological strategies. Evaluation of cardiac collagen turnover by measurement of biological markers is a useful tool for monitoring “at a distance” cardiac tissue repair and fibrosis [6], both in experimental models [5] and in clinical conditions. The measurement of various serum peptides arising from the metabolism of collagen types I and III may provide information on the extent of myocardial fibrosis [7]. Since procollagen type I C-terminal propeptide (PICP) and aminoterminal propeptides of type-I procollagen (PINP), and N-terminal type III collagen peptide (PIIINP) are released with collagen type I



**Fig. 1** Diagrammatic representation of the origin and destination of fibrillar collagen-derived peptides. *PICP* procollagen type I carboxy-terminal propeptide, *PINP* procollagen type I amino-terminal propeptide, *CITP* collagen type I cross-linked carboxy-terminal telopeptide, *PIIICP* procollagen type III carboxy-terminal propeptide, *PIIINP* procollagen type III amino-terminal propeptide

or III molecules in a stoichiometric manner during collagen biosynthesis, they are considered as markers of this process (Fig. 1) [6, 8, 9].

These markers are not specific to the myocardium. In particular, hypertension and diabetes affect various organs, especially vascular tissues, from which procollagen fragments could be released. However, Querejeta et al. [10] showed a correlation between myocardial collagen content and serum concentration of PICP in hypertension. More recently, they have demonstrated that serum PICP was secreted by the heart through the coronary sinus in patients with hypertensive heart disease [11]. The PIP/CITP ratio, an index of coupling between the synthesis and degradation of collagen type I, was found to be higher in hypertensive patients with increased collagen accumulation in myocardial tissue than in those with normal collagen accumulation [12]. Thus, the PICP/CITP serum levels ratio serves as a serum marker of myocardial collagen accumulation. In patients with dilated cardiomyopathy, Izawa et al. [13] demonstrated that both collagen volume fraction and the abundance of collagen types I and III mRNAs in the LV myocardium were higher in the patients with an increased PICP/CITP serum level ratio than in those with a lower PIP/CITP ratio. This is a direct evidence linking serum ECM markers to the heart ECM content, thus providing rationale for their use as potentially useful biomarkers of ECM remodelling in cardiac disease. Furthermore, in order to explore the potential usefulness of the MMP-1:TIMP-1 serum levels' ratio as a marker of myocardial collagen degradation, myocardial expression of MMP-1 and its tissue inhibitor MMP (TIMP-1) and the amount and distribution of fibrillar collagen deposits have been assessed

concomitantly to measurements of the serum levels of MMP-1 and TIMP-1 in the same patients with hypertension. The values of MMP-1 and TIMP-1 in coronary sinus blood were higher than in peripheral vein blood in hypertensive patients, but not in normotensive subjects. In addition, direct correlations were found between MMP-1 and TIMP-1 in coronary sinus blood and peripheral vein blood in all hypertensive patients. The authors did not report on associations between serological markers and myocardial expression of MMP-1 and TIMP-1 or the amount and distribution of fibrillar collagen [14].

### Pathophysiology of ECM remodelling in hypertension and HF

Changes in the composition of cardiac tissue develop in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy (LVH, i.e., hypertensive heart disease) and in HF patients and lead to structural remodelling of the myocardium. One of these changes is related to the disruption of the equilibrium between the synthesis and degradation of collagen types I and III molecules, which results in an excessive accumulation of collagen types I and III fibres within the myocardium. Myocardial fibrosis is the consequence of a number of pathologic processes mediated by mechanical, neurohormonal and cytokine routes. The clinical relevance of fibrosis is that it may contribute to HF and other cardiac complications in patients with hypertensive heart disease [15]. A number of investigators have used serological markers of collagen turnover to address myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats (SHR) [16, 17] and in patients with essential hypertension [5, 18] with LVH. Serum concentrations of PICP, a marker of collagen type I synthesis, were higher in each setting of hypertensive heart disease, and there was a direct correlation between histological evidence of myocardial fibrosis and serum PICP in SHR and hypertensive patients. In experimental models of HF, mechanical load increases collagen synthesis by fibroblasts, as indicated by an increase in procollagen type III mRNA [19–21]. Findings from a number of experimental and clinical studies suggest an initial inhibition of MMP activity, during pressure overload hypertrophy. However, over time, it has been shown in SHRs that MMP levels and activity increase within the myocardium and this is associated with development of left ventricular (LV) dilation and failure.

Nakahara et al. [22] showed that serum PIIINP concentration was significantly correlated with relative wall thickness in hypertensive patients with LVH. Interestingly, despite the fact that the eccentric and concentric LVH subgroups showed no differences in relation to LV mass index or brain-type natriuretic peptide, the serum PIIINP

concentration was significantly higher in the concentric hypertrophy group than in the essential hypertension group. They suggested that aldosterone, which blood concentrations were associated with PIIINP, may be the cause of eccentric hypertrophy by promoting cardiac fibrosis.

The pathophysiology of diastolic HF is poorly understood. One potential explanation is an active fibrotic process that produces increased ventricular stiffness, which compromises filling. Experimental and clinical data have demonstrated serological and morphometric evidence of increased myocardial fibrosis in hypertensive patients with diastolic HF. Ahmed et al. [23] have demonstrated an association between elevated levels of tissue inhibitor of MMP (TIMP)-1 and diastolic dysfunction.

The results of a recent study [24] provide further information on collagen metabolism in patients with asymptomatic diastolic dysfunction. Elevated levels of PICP and PIIINP and a trend towards an increase in PINP levels indicate increased collagen synthesis in diastolic HF. In addition, elevated serum levels of ICTP, MMP-2 and MMP-9 suggest increased degradation of myocardial collagen and other components of the ECM. Furthermore, greater collagen turnover is seen in more severe phases of diastolic dysfunction, which suggests a direct relationship between diastolic dysfunction and collagen excess.

Plasma TIMP-1 was significantly elevated in another hypertensive cohort as were ICTP and PICP. TIMP-1 was significantly elevated in patients with diastolic dysfunction and correlated with markers of diastolic filling, namely E:A ratio and E Dec. A plasma TIMP-1 level of >500 ng/ml had a specificity of 97% and a positive predictive value of 96% in predicting diastolic dysfunction [25].

Structural components within the arterial wall, mainly collagen and elastin, are considered to be major determinants of arterial stiffness. Thus, quantitative and qualitative alterations of collagen and elastin fibres are involved in arterial stiffening that is associated with the ageing process and disease states such as hypertension, diabetes, atherosclerosis and chronic renal failure [26]. Arterial stiffness may involve ECM collagen metabolism. In high-risk older hypertensive patients, Ishikawa et al. [27] evaluated the association between collagen metabolism markers and brachial-ankle pulse wave velocity (baPWV) as a measure of arterial stiffness, in older hypertensive patients with LVH. BaPWV was correlated with the plasma level of PICP and ICTP and the total TIMP-1/MMP-1 ratio, an index of collagen turnover. BaPWV was negatively correlated with the E/A ratio of LV inflow but not with left ventricular mass index (LVMI). The measures of hypertensive heart disease, such as the E/A ratio, deceleration time of the mitral E wave (DCT) or LVMI were not correlated with any collagen markers in this study. In multiple regression analysis adjusted for confounding factors such

as age, sex, pulse pressure, mean blood pressure, pulse rate, LVMI, E/A ratio and DCT, the positive correlation between baPWV and total TIMP-1/MMP-1 ratio remained significant.

### Pathophysiology of ECM remodelling in myocardial ischaemia and post-infarction cardiac healing and remodelling

Collagen-I is generally involved in thick collagen fibres showing numerous cross-links and associated with high tensile strength, whereas collagen-III is mainly observed in much thinner and elastic fibres [28]. Collagen-I is, therefore, more efficient for structural support and is much more abundant in the healthy heart, as well as in the mature infarct scar [28, 29]. In contrast, collagen-III seems to be the main component of “reactive” ischaemic-related fibrosis, since it can be synthesized in a more rapid and reactive way and could play an important role in the development of new areas of myocardial fibrosis in different clinical settings. Synthesis of collagen-III has been shown to be predominantly enhanced in ischaemic cardiomyopathies where an enhanced collagen-III synthesis is observed within viable myocardium, outside infarct areas [28].

We have investigated whether serum markers of collagen synthesis or degradation indicate signs of active remodelling in chronic coronary artery disease (CAD) patients with exercise-SPECT-ischaemia despite current medications. Exercise ischaemia was associated with increased collagen-III turnover, independently of concomitant medications and even when LV ejection fraction is normal. We suggest that active ischaemia may promote cardiac fibrosis which may relate to chronic adverse cardiac remodelling in CAD and play a role in ischaemic cardiomyopathy [30].

In the post-myocardial infarction heart, there is a time-dependent damage to myocytes and ECM in the infarct zone, followed by gradual reparation with fibrosis. The non-infarct zone exhibits reactive hypertrophy, interstitial fibrosis and increased collagen, leading to cardiac dysfunction and progressive dilation. Therefore, in such pathological conditions, ECM remodelling may lead to myocardial fibrosis and has deleterious effects on pumping capacity and diastolic function. After myocardial infarction [28], new collagen is mostly thin type III, whereas subsequent collagen maturation involves a conversion to thick type I that provides an increased resistance to distension. Synthesis of collagen-III has been shown to be enhanced in the days following an acute myocardial infarction [31, 32], especially when revascularization is unsuccessful [31].

Available evidence supports differential time-dependent ECM degradation after acute myocardial infarction. Very early after MI (first 24 h), collagen degradation clearly

exceeds synthesis as shown by increased MMP1 [29]. In the later stages after MI (2 weeks to 1 year or more) healing and scarring processes to actively repair the damaged site [28, 33] exceed ECM degradation, as shown by decreased MMP and increased TIMP or decreased MMP/TIMP ratio [29, 33].

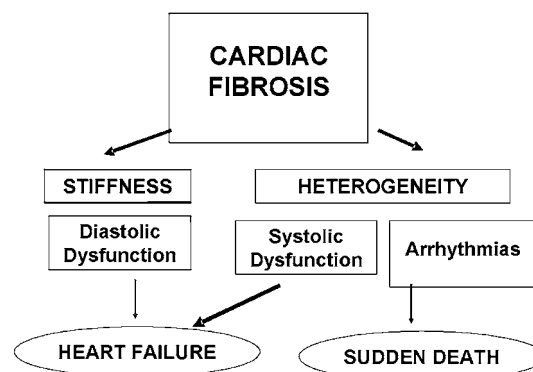
### Do ECM biomarkers add new diagnostic/prognostic information?

The main criterion with regard to the potential clinical value of a candidate biomarker is the consistency and strength of the association between the biomarker and the outcome or disease of interest, and the extent to which it is an improvement on (either adding to or replacing) established tools.

Contrary to what has been reported in patients with HF [2, 34] as well as in patients with myocardial infarction, there is no report on associations between ECM biomarkers and clinical outcome in hypertensive patients. However, consistent findings have been reported from multiple studies that utilize prospectively collected samples among patients with well-characterized clinical phenotypes. Biomarkers were found to be independently associated with various phenotypes with established association with the risk of clinical events.

#### Hypertension, LVH and transition to HF

In hypertension, it has been suggested that excessive collagen deposition causes stiffness of the heart during the chronic phase of hypertrophy, especially during the transition to HF and subsequent altered cardiac function (Fig. 2). In spontaneously hypertensive HF (SHHF) rats [35] collagen mRNA levels were elevated compared to age-matched controls, but collagen volume fraction was elevated only in 13-month-old SHHFs. Only MMP-2 mRNA levels



**Fig. 2** Schematic diagram of the possible involvement of cardiac fibrosis in hypertensive heart disease and cardiac failure



increased significantly with HF. However, MMP-2 and MMP-9 zymographic activity, and MMP-13 protein levels increased. TIMP-1 and TIMP-2 mRNA and protein levels increased, and TIMP-4 protein levels decreased. In another study in SHHF types I and III collagen levels were measured at 2 and 8 months, and at CHF. type I collagen levels increased while type III levels decreased in the SHHF rats in CHF relative to the age-matched controls [36].

In patients with hypertension, in a number of studies there is consistent evidence of increased collagen synthesis and inhibition of degradation resulting in fibrosis. In a study examining myocardial fibrosis in relation to blood pressure, left ventricular mass (LVM) and diastolic function, compared with the normotensive group, PICP was elevated and LV diastolic function was impaired in the hypertensive groups, with little difference between patients with and without LVH. PICP related to blood pressure, and a number of LV filling parameters, but not to LVM. Therefore, it appears that myocardial fibrotic markers are raised in hypertension before LVH develops and are associated with diastolic dysfunction [37].

The presence of HF in hypertensive patients has been attributed to isolated diastolic LV dysfunction caused by changes in myocardial relaxation and stiffness. In these patients, accumulation of fibrillar collagens is shown to lead to increased stiffness and abnormal cardiac function. In addition, perivascular accumulation of collagen fibres may impair the vasodilator capacity of the intramyocardial coronary arteries and contribute to impaired coronary flow reserve seen in the hypertensive heart. Non-invasive monitoring of myocardial fibrosis by use of serological markers of collagen types I and III turnover provides indirect diagnostic information on the extent and the ability of antihypertensive treatment to reduce myocardial fibrosis. Poulsen et al. [38] reported a significant association between serum PIIINP and reduced LV longitudinal contractility as assessed by tissue Doppler echocardiography mean strain. Lopez et al. [14] have shown that the pattern of collagen deposits and the balance of the MMP-1/TIMP-1 system are different in the myocardium of systolic HF and diastolic HF hypertensive patients. An excess of MMP-1 relative to TIMP-1 was present in the myocardium of systolic HF hypertensive compared with diastolic HF hypertensive patients while up-regulated expression of MMP-1 is detected at both the cardiomyocyte and the interstitial levels in systolic HF hypertensive patients. Increased serum MMP-1:TIMP-1 ratio was associated with LV dilatation and systolic dysfunction.

#### Patients with high CV risk

Patients with both arterial hypertension and diabetes have a high risk of HF. Whether these patients have changes in

cardiac ECM has not been studied previously. We compared blood markers of collagen turnover among patients with CHF, patients with hypertension and type II diabetes (HD) and healthy individuals. Measurements were performed in 239 CHF patients; 64 HD patients and 92 healthy subjects. We showed by adjusted ANOVA that PIIINP levels were significantly higher in CHF and HD patients than in controls, and higher in CHF patients than in HD patients. MMP-1 levels were significantly lower in CHF and HD patients than in controls. Collagen type I markers (PICP and PINP) were not influenced by CHF, but were lower in HD patients as compared to controls ( $P < 0.05$  for all comparisons).

Therefore, in HF, markers of cardiac collagen synthesis are increased and markers of degradation are decreased, potentially contributing to cardiac fibrosis and thus to poor outcome. Changes in collagen turnover may also occur early in the disease process in high-risk patients before HF is clinically detectable [39].

#### Obesity

Obesity is an independent predictor of LVM and is associated with disturbances in cardiac structure. We assessed the differential impact of insulin resistance, leptin and body composition on myocardial mass and serum markers of cardiac fibrosis in obese subjects, without cardiovascular disease, hypertension, cardiac hypertrophy or diabetes [40]. We found that serum levels of markers of cardiac collagen synthesis were significantly associated with insulin resistance and not related to the LVM. Therefore, it is suggested that PIIINP could be a very early marker of ventricular dysfunction in these patients.

#### HF with systolic dysfunction

Synthesis of collagen III has been shown to be predominantly enhanced in severe and/or uncompensated cardiomyopathy of various origins [41, 42]. In 1,009 patients with CHF enrolled in the Research into Etanercept CytOkine Antagonism in VentriculaR dysfunction (RECOVER) trial, a multivariable analysis adjusted for clinical correlates (age, sex, NYHA class, heart rate, beta-blocker use, ischaemic etiology), revealed that PIIINP ( $P = 0.03$ ) and MMP-1 ( $P = 0.048$ ) had a negative association with exercise capacity assessed with the 6-min walk test, accounting for 28% of variance in the model, PIIINP ( $P = 0.001$ ) also independently predicted survival and event-free survival [43]. Importantly, a positive correlation was detected between the ECM and inflammatory markers (PIIINP to IL-18, MMP-1 and TIMP-1 to CRP, TIMP-1 to IL-18, MMP-1 to IL-10). PIIINP was the only biomarker independently associated with death and CHF hospitalization, which is consistent with results from a previous

similar study [34]. Also, in the adjusted multivariable model including all biomarkers, PIIINP ( $P = .03$ ) and MMP-1 ( $P = .048$ ) were independent predictors of 6-min walk test, a measure of functional capacity and disease severity. The independent associations of ECM functional capacity and PIIINP with CHF morbi-mortality suggest that excessive ECM turnover may be associated with functional capacity deterioration and poor outcome.

### Myocardial infarction

The effect of remodelling on cardiac general structure and function may be assessed by cardiac imaging (ultrasound and magnetic resonance imaging) and by measuring brain natriuretic peptide (BNP). However, the extent to which the remodelling is a consequence of changes in tissue structure (i.e., ECM synthesis or degradation) cannot be assessed by classical cardiac imaging. In a substudy of EPHEBUS, which evaluated the effects of the selective aldosterone-receptor antagonist eplerenone versus placebo, serum levels of collagen biomarkers were measured in 476 patients with CHF following AMI complicated with LVSD. Baseline collagen biomarkers were correlated with serum BNP and hs-CRP ( $P < 0.0001$ ). Important changes in biomarkers levels occurred within the first month post-AMI. PINP levels increased significantly from baseline to month 1 ( $P < 0.0001$ ) and declined modestly thereafter. The overall profile was similar for PIIINP, but remained above baseline through to month 9. At baseline, ICTP levels were significantly higher than reference levels. There was a sustained and statistically significant fall in ICTP levels from baseline to month 1 ( $P < 0.0001$ ) and subsequent stabilization at levels slightly lower ( $5.3 \pm 2.8$  ng/ml) than the upper reference value ( $5.6$  ng/ml) through month 9 [44]. In other recent studies, ICTP levels were reported to increase in the 10 days following acute MI [45]. High baseline levels of ICTP of  $6.9 \pm 3.6$  ng/ml in post-MI patients were associated with LV remodelling [46]. Serum levels of collagen type I telopeptide (ICTP) were strongly associated with long-term outcome independently from BNP levels. Risks for all-cause death and cardiovascular death increased by 17 and 21% ( $P = 0.035$  and  $P = 0.017$ , respectively), with each increment of 2 ng/ml in baseline ICTP levels.

### Arrhythmias and sudden death

Ventricular arrhythmias are the main cause of sudden cardiac death. Intracardiac strain, myocardial and ECCM remodelling and subsequent myocardial fibrosis are involved in arrhythmia pathogenesis. We have investigated the relationship between cardiac fibrosis, BNP, inflammation [high sensitivity [hs, #42]-C-reactive protein] serum

markers, and the incidence of ventricular tachycardia (VT) in implantable cardioverter-defibrillators (ICD) recipients in 121 patients implanted for spontaneous sustained VT and a prior history of myocardial infarction [47]. In a multivariate analysis, an LV ejection fraction  $<0.35$ , an increased serum BNP, hs-C-reactive protein, PINP and a decreased PIIINP were associated with a higher VT incidence. However, despite a sound rationale for a pathophysiological role of cardiac fibrosis in VT as well as atrial arrhythmias, there is little clinical data on the relationship between ECM biomarkers and arrhythmias.

### May ECM biomarkers help monitor the effects of treatment?

The ability of antihypertensive and HF treatment to reduce myocardial fibrosis may be monitored by the measurement of various serum peptides arising from the metabolism of collagen types [7].

#### Angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers

Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition has been shown to prevent collagen deposition and fibrosis in experimental studies [48]. Together with decreased collagen synthesis, proMMP1 and MMP-1 activity also decreased as the result of the effects of ACE inhibition, probably in relation to decreased ECM turnover [49].

Blockade of the angiotensin II type 1 receptor has been shown to be associated with inhibition of collagen type I synthesis and regression of myocardial fibrosis in hypertensive patients. In a study comparing losartan to amlodipine, losartan-treated patients, biopsy-proven myocardial fibrosis decreased concomitantly to the reduction in serum procollagen type I peptides. Neither collagen volume fraction nor serum procollagen type I peptides changed significantly in amlodipine-treated patients. These results further suggest that the ability of antihypertensive treatment to regress fibrosis in hypertensives is independent of its antihypertensive efficacy [7].

A substudy of the LIFE trial compared the effects of an angiotensin II receptor antagonist with a beta-blocker on myocardial collagen volume (assessed by echoreflectivity and serum collagen markers) in 219 hypertensive patients with echocardiographically documented LVH. Echoreflectivity, previously shown to correlate directly with collagen volume fraction on endomyocardial biopsies, was measured concomitantly with serum markers of collagen synthesis (PICP, PIIINP) or degradation (ICTP) as secondary outcome variables. Losartan but not atenolol was associated with an increased echoreflectivity. Collagen



markers also changed in the direction of decreased collagen in patients receiving losartan, but differences between groups were not statistically significant [50].

In another small trial (SILVHIA), patients with hypertensive LVH, irbesartan and atenolol reduced PICP similarly. Only in the irbesartan group did changes in PICP relate to changes in isovolumic relaxation time, and LVM. The findings with irbesartan suggest a role for angiotensin II in the control of myocardial fibrosis and diastolic function in patients with hypertension with LVH [37].

In CHF patients, there is no clinical report so far of the effects of ACE inhibitors or angiotensin receptor blockers on ECM biomarkers.

#### Beta-blocker therapy

Despite evidence of the involvement of the sympathetic system in LVH, cardiac remodelling and fibrosis [51], there is little information on the effects of beta-blocker therapy on the prevention of cardiac fibrosis in experimental models or clinical studies of hypertension, HF or MI. In hypertension studies with ACE inhibitors or angiotensin receptor blockers reported here above, a beta-blocker was commonly used as a control treatment and was not associated to significant anti-fibrotic effect. However, beta-blockers may differ as to their pharmacological effects. Third generation vasodilating beta-blocker celiprolol used at subdepressor doses significantly decreased perivascular fibrosis, myocardial fibrosis and type I collagen mRNA and improved myocardial remodelling in DOCA-salt hypertensive rats. This was related to increased eNOS expression in the left ventricle [52].

In an established LVH rat model of supra-avalvular aortic banding and cardiac fibroblasts, treatment with carvedilol, another vasodilating beta-blocker, but not metoprolol nor prazosin, was accompanied by a decrease in laminin, fibronectin, collagen I and III in vivo, irrespective of LVH. The effects of carvedilol may be due to the antiproliferative or antioxidative properties of this unselective beta-adrenergic receptor antagonist. These changes of the ECM represent a new mechanism of carvedilol that may contribute to the observed beneficial effects in CHF [53].

Using a rat model of MI, induced by left coronary ligation, the effects of 11 weeks of therapy with oral carvedilol, metoprolol or captopril were compared. At equivalent beta-adrenoceptor blocking doses, carvedilol, but not metoprolol, attenuated the increase in collagen content in non-infarcted regions and its effect was similar to captopril [54].

#### Aldosterone antagonists

Aldosterone has been shown to promote cardiac fibrosis in experimental models and in men [55, 56]. Aldosterone

antagonists may have beneficial effects on LVH in hypertensive patients [57]. In a small number of patients with essential hypertension treated with spironolactone and an ACE inhibitor for 24 weeks, both blood pressure and serum PIIINP levels were significantly decreased by treatment. There was a statistical significant correlation between the changes in LVMI and those in PIIINP. The results suggest that spironolactone limits cardiac collagen turnover in patients with high baseline PIIINP levels. Larger studies may provide definitive evidence for the involvement of aldosterone in LVH in patients with abnormally high PIIINP levels [58].

A sample of 261 patients from the Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES) were randomized to placebo or spironolactone (12.5 to 50 mg daily). At 6 months, serum PICP and PIIINP markers decreased in the spironolactone group but remained unchanged in the placebo group. The spironolactone effect on outcome was significant only in patients with above-median baseline levels of markers. These results suggest that limitation of the excessive ECM turnover may be one of the various extrarenal mechanisms contributing to the beneficial effect of spironolactone in patients with CHF [34].

More recently, Izawa et al. [13] investigated the effects of spironolactone in patients with dilated cardiomyopathy. The patients were divided into two groups on the basis of the serum PIP/CITP ratio ( $\leq 35$ , group A,  $n = 12$ ;  $> 35$ , group B,  $n = 13$ ), an index of myocardial collagen accumulation. LV diastolic chamber stiffness, the collagen volume fraction and abundance of collagen types I and III mRNAs in biopsy tissue were greater, and the LV early diastolic strain rate (tissue Doppler echocardiography) was smaller in group B than in group A at baseline. These differences and the difference in PIP/CITP were greatly reduced after treatment of patients in group B with spironolactone, with treatment having no effect on these parameters in group A. The collagen volume fraction was significantly correlated with PIP/CITP, LV early diastolic strain rate and LV diastolic chamber stiffness for all patients before and after treatment with spironolactone. Therefore, spironolactone ameliorated LV diastolic dysfunction and reduced chamber stiffness in association with regression of myocardial fibrosis in mildly symptomatic patients with DCM. Interestingly, these effects appeared limited, however, to patients with increased myocardial collagen accumulation.

In summary, it appears that a particularly important determinant for the therapeutic benefit of mineralocorticoid receptor antagonists seems to be their ability to prevent and reverse cardiac fibrosis. Mineralocorticoid receptor antagonists improve clinical outcome only in HF patients with high cardiac collagen deposition, whereas patient prognosis correlates with the extent by which cardiac collagen levels

are reduced. This raises the interesting hypothesis that patients most likely to benefit from mineralocorticoid receptor antagonists may be screened by the measurement of ECM biomarkers [2, 59].

In patients with AMI, Hayashi et al. [60] demonstrated that aldosterone was extracted through the infarct heart and extracting aldosterone-stimulated post-infarct LV remodelling. They randomized 134 patients with first anterior acute myocardial infarction to receive potassium canrenoate (the active metabolite of spironolactone) on top of an ACE inhibitor or control treatment. LV ejection fraction was significantly improved and LV end-diastolic volume dilatation was significantly suppressed in the aldosterone antagonist group compared with the control group. Transcardiac extraction of aldosterone through the heart was significantly suppressed and plasma PIIINP level was significantly lower in the aldosterone antagonist group. The authors suggest that aldosterone antagonist therapy, combined with ACE inhibitor, can prevent post-infarct LV remodelling better than ACE inhibitor alone in association with the suppression of a marker of collagen synthesis.

In a substudy of EPHEBUS, important changes in biomarkers levels occurred within the first month post-AMI and were blunted with the use of eplerenone and remained lower in the eplerenone than the placebo group throughout long-term follow-up implying that treatment with eplerenone suppresses collagen turnover [44]. Therefore, the results of this substudy with eplerenone are consistent with and extend the results of previous experimental and clinical observations with aldosterone antagonists in HF and post-AMI, and suggest that the effect of aldosterone receptor blockade on ECM remodelling may contribute to the clinical benefits of this therapy.

### Statins

In DOCA-salt hypertensive rats, rosuvastatin attenuated hypertension-induced cardiovascular remodelling without affecting blood pressure [61]. In this way, statins could favourably modify the relation between contractile and interstitial myocardial tissues, which may improve elasticity of myocardium and diastolic filling. However, there is no clinical report of statin affecting cardiac fibrosis. In one recent study, atorvastatin decreased serum N-terminal telopeptide of type I collagen in patients with hypercholesterolemia, which was interpreted as the result of potentially beneficial effects on bone metabolism [62], which could as well have been related to an effect on cardiovascular ECM. This particular study points out to the non-specificity limitation of serum ECM biomarkers. In another study [63] valsartan/simvastatin combination did not alter fibrosis markers, as compared to valsartan in patients with hyperlipidemia and hypertension.

### Limitations of the use of ECM biomarkers in cardiovascular disease

A thorough understanding of the pathobiology of a putative novel marker is not essential to the establishment of its diagnostic or prognostic performance. However, pathophysiological information may be very useful in providing support for the validity of the clinical and epidemiological observations. Indeed, besides cardiovascular remodelling, any pathophysiological condition involving ECM remodelling (including pregnancy, cancer, infectious diseases, inflammatory connective disease, kidney disease, bone disorders, etc.) alters MMP/TIMP circulating levels [64]. Similarly, altered collagen peptides circulating levels have been reported in patients presenting with cancer, bone diseases, liver diseases and inflammatory connective diseases [65]. It appears thus of the paramount importance to take care of these potentially confounding conditions before evaluating the usefulness of such biomarkers at an individual or epidemiological level. Additionally, preanalytical potential pitfalls should be taken into account, since for example serum and plasma MMP-9 levels significantly differ, the former being higher because of the release of MMP-9 by polymorphonuclears during the blood clotting [66]. Another potential drawback is the influence of long-term freezing storage in cohorts, which has not been systematically assessed so far. Additionally, the anticoagulant used to sample blood may also alter MMP/TIMP plasma levels [67]. At the analytical level, as pointed out by Zucker [68], among the difficulties in comparing results using different commercial ELISA kits is the absence of individual purified MMP standards for use in producing calibration curves. Similarly, quantifying MMP/TIMP as well as collagen fragments measurements can give different absolute results depending on the specific antibody combinations employed in the assay kit [68, 69]. It appears thus crucial to define standardized procedures before translating these experimental biomarkers into clinical practice.

### Conclusion

Given the importance of fibrous tissue in leading to myocardial dysfunction and failure in hypertensive heart disease, non-invasive assessment of fibrosis could prove a clinically useful tool. Characterization of patients according to the severity of cardiac fibrosis, as assessed by ECM biomarkers, may prove useful for selecting appropriate drug regimen. The available data set the stage for large and long-term trials to definitively validate this approach.

## References

1. Bishop JE, Laurent GJ (1995) Collagen turnover and its regulation in the normal and hypertrophying heart. *Eur Heart J* 16(Suppl C):38–44
2. Zannad F, Dousset B, Alla F (2001) Treatment of congestive heart failure: interfering the aldosterone-cardiac extracellular matrix relationship. *Hypertension* 38:1227–1232. doi:10.1161/hy1101.099484
3. D'Armiento J (2002) Matrix metalloproteinase disruption of the extracellular matrix and cardiac dysfunction. *Trends Cardiovasc Med* 12:97–101. doi:10.1016/S1050-1738(01)00160-8
4. Visse R, Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92:827–839. doi:10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D
5. Laviades C, Varo N, Fernandez J et al (1998) Abnormalities of the extracellular degradation of collagen type I in essential hypertension. *Circulation* 98:535–540
6. Weber KT (1997) Monitoring tissue repair and fibrosis from a distance. *Circulation* 96:2488–2492
7. Lopez B, Gonzalez A, Querejeta R et al (2005) The use of collagen-derived serum peptides for the clinical assessment of hypertensive heart disease. *J Hypertens* 23:1445–1451
8. Risteli J, Risteli L (1995) Analysing connective tissue metabolites in human serum. Biochemical, physiological and methodological aspects. *Journal of Hepatology* 22:77–81. doi:10.1016/0270-9139(95)94132-0
9. Jensen LT, Horslev-Petersen K, Toft P et al (1990) Serum aminoterminal type III procollagen peptide reflects repair after acute myocardial infarction. *Circulation* 81:52–57
10. Querejeta R, Varo N, Lopez B et al (2000) Serum carboxy-terminal propeptide of procollagen type I is a marker of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease. *Circulation* 101:1729–1735
11. Querejeta R, Lopez B, Gonzalez A et al (2004) Increased collagen type I synthesis in patients with heart failure of hypertensive origin: relation to myocardial fibrosis. *Circulation* 110:1263–1268. doi:10.1161/01.CIR.0000140973.60992.9A
12. Diez J, Querejeta R, Lopez B et al (2002) Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients. *Circulation* 105:2512–2517. doi:10.1161/01.CIR.0000017264.66561.3D
13. Izawa H, Murohara T, Nagata K et al (2005) Mineralocorticoid receptor antagonism ameliorates left ventricular diastolic dysfunction and myocardial fibrosis in mildly symptomatic patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: a pilot study. *Circulation* 112:2940–2945
14. Lopez B, Gonzalez A, Querejeta R et al (2006) Alterations in the pattern of collagen deposition may contribute to the deterioration of systolic function in hypertensive patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 48:89–96. doi:10.1016/j.jacc.2006.01.077
15. Diez J (2007) Mechanisms of cardiac fibrosis in hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 9:546–550. doi:10.1111/j.1524-6175.2007.06626.x
16. Diez J, Panizo A, Gil MJ et al (1996) Serum markers of collagen type I metabolism in spontaneously hypertensive rats: relation to myocardial fibrosis. *Circulation* 93:1026–1032
17. Varo N, Etayo JC, Zalba G et al (1999) Losartan inhibits the post-transcriptional synthesis of collagen type I and reverses left ventricular fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 17:107–114. doi:10.1097/00004872-199917010-00016
18. Diez J, Laviades C, Mayor G et al (1995) Increased serum concentrations of procollagen peptides in essential hypertension. Relation to cardiac alterations. *Circulation* 91:1450–1456
19. Carver W, Nagpal ML, Nachtigal M et al (1991) Collagen expression in mechanically stimulated cardiac fibroblasts. *Circ Res* 69:116–122
20. Chapman D, Weber KT, Eghbali M (1990) Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium. *Circ Res* 67:787–794
21. Mukherjee D, Sen S (1990) Collagen phenotypes during development and regression of myocardial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 67:1474–1480
22. Nakahara T, Takata Y, Hirayama Y et al (2007) Left ventricular hypertrophy and geometry in untreated essential hypertension is associated with blood levels of aldosterone and procollagen type III amino-terminal peptide. *Circ J* 71:716–721. doi:10.1253/circj.71.716
23. Ahmed SH, Clark LL, Pennington WR et al (2006) Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases: relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease. *Circulation* 113:2089–2096. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.573865
24. Martos R, Baugh J, Ledwidge M et al (2007) Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction. *Circulation* 115:888–895. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.638569
25. Lindsay MM, Maxwell P, Dunn FG (2002) TIMP-1: a marker of left ventricular diastolic dysfunction and fibrosis in hypertension. *Hypertension* 40:136–141. doi:10.1161/01.HYP.0000024573.17293.23
26. Diez J (2007) Arterial stiffness and extracellular matrix. *Adv Cardiol* 44:76–95. doi:10.1159/000096722
27. Ishikawa J, Kario K, Matsui Y et al (2005) Collagen metabolism in extracellular matrix may be involved in arterial stiffness in older hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *Hypertens Res* 28:995–1001. doi:10.1291/hypres.28.995
28. Jugdutt BI (2003) Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation* 108:1395–1403. doi:10.1161/01.CIR.0000085658.98621.49
29. Jugdutt BI (2003) Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 3:1–30. doi:10.2174/1568006033337276
30. Radauceanu A, Moulin F, Djabballah W et al (2007) Residual stress ischaemia is associated with blood markers of myocardial structural remodelling. *Eur J Heart Fail* 9:370–376. doi:10.1016/j.ejheart.2006.09.010
31. Uusimaa P, Risteli J, Niemela M et al (1997) Collagen scar formation after acute myocardial infarction: relationships to infarct size, left ventricular function, and coronary artery patency. *Circulation* 96:2565–2572
32. Poulsen SH, Host NB, Jensen SE et al (2000) Relationship between serum amino-terminal propeptide of type III procollagen and changes of left ventricular function after acute myocardial infarction. *Circulation* 101:1527–1532
33. Papadopoulos DP, Moysakis I, Makris TK et al (2005) Clinical significance of matrix metalloproteinases activity in acute myocardial infarction. *Eur Cytokine Netw* 16:152–160
34. Zannad F, Alla F, Dousset B et al (2000) Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). *Rales Investigators. Circulation* 102:2700–2706
35. Li H, Simon H, Bocan TM et al (2000) MMP/TIMP expression in spontaneously hypertensive heart failure rats: the effect of ACE-

- and MMP-inhibition. *Cardiovasc Res* 46:298–306. doi:[10.1016/S0008-6363\(00\)00028-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00028-6)
36. Medeiros DM, Velleman SG, Jarrold BB et al (2002) Ontogeny of enhanced decorin levels and distribution within myocardium of failing hearts. *Connect Tissue Res* 43:32–43. doi:[10.1080/713713431](https://doi.org/10.1080/713713431)
  37. Muller-Brunotte R, Kahan T, Lopez B et al (2007) Myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in patients with hypertension: results from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation versus Atenolol (SILVHIA). *J Hypertens* 25:1958–1966. doi:[10.1097/HJH.0b013e3282170ada](https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e3282170ada)
  38. Poulsen SH, Andersen NH, Heickendorff L et al (2005) Relation between plasma amino-terminal propeptide of procollagen type III and left ventricular longitudinal strain in essential hypertension. *Heart* 91:624–629. doi:[10.1136/hrt.2003.029702](https://doi.org/10.1136/hrt.2003.029702)
  39. Alla F, Kearney-Schwartz A, Radauceanu A et al (2006) Early changes in serum markers of cardiac extra-cellular matrix turnover in patients with uncomplicated hypertension and type II diabetes. *Eur J Heart Fail* 8:147–153. doi:[10.1016/j.ejheart.2005.06.008](https://doi.org/10.1016/j.ejheart.2005.06.008)
  40. Quilliot D, Alla F, Bohme P et al (2005) Myocardial collagen turnover in normotensive obese patients: relation to insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* 29:1321–1328. doi:[10.1038/sj.ijo.0803022](https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803022)
  41. Mukherjee D, Sen S (1991) Alteration of collagen phenotypes in ischemic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 88:1141–1146. doi:[10.1172/JCI115414](https://doi.org/10.1172/JCI115414)
  42. Klappacher G, Franzen P, Haab D et al (1995) Measuring extracellular matrix turnover in the serum of patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy and impact on diagnosis and prognosis. *Am J Cardiol* 75:913–918. doi:[10.1016/S0002-9149\(99\)80686-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(99)80686-9)
  43. Radauceanu A, Ducki C, Virion JM et al (2008) Extracellular matrix turnover and inflammatory markers independently predict functional status and outcome in chronic heart failure. *J Card Fail* 14:467–474. doi:[10.1016/j.cardfail.2008.02.014](https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2008.02.014)
  44. Iraqi W, Rossignol P, Fay R, Nuée J, Ketelslegers JM, Vincent J, Pitt B, Zannad F (2009) Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with acute myocardial infarction complicated by left ventricular dysfunction and heart failure: insights from the EPHEBUS study. *Circulation* (in press)
  45. Murakami T, Kusachi S, Murakami M et al (1998) Time-dependent changes of serum carboxy-terminal peptide of type I procollagen and carboxy-terminal telopeptide of type I collagen concentrations in patients with acute myocardial infarction after successful reperfusion: correlation with left ventricular volume indices. *Clin Chem* 44:2453–2461
  46. Cerisano G, Pucci PD, Sulla A et al (2007) Relation between plasma brain natriuretic peptide, serum indexes of collagen type I turnover, and left ventricular remodeling after reperfused acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 99:651–656. doi:[10.1016/j.amjcard.2006.09.114](https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2006.09.114)
  47. Blangy H, Sadoul N, Dousset B et al (2007) Serum BNP, hs-C-reactive protein, procollagen to assess the risk of ventricular tachycardia in ICD recipients after myocardial infarction. *Europace* 9:724–729. doi:[10.1093/europace/eum102](https://doi.org/10.1093/europace/eum102)
  48. Albaladejo P, Bouaziz H, Duriez M et al (1994) Angiotensin converting enzyme inhibition prevents the increase in aortic collagen in rats. *Hypertension* 23:74–82
  49. Weber KT (1997) Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation* 96:4065–4082
  50. Ciulla MM, Paliotti R, Esposito A et al (2004) Different effects of antihypertensive therapies based on losartan or atenolol on ultrasound and biochemical markers of myocardial fibrosis: results of a randomized trial. *Circulation* 110:552–557. doi:[10.1161/01.CIR.0000137118.47943.5C](https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000137118.47943.5C)
  51. Briest W, Holz A, Rassler B et al (2001) Cardiac remodeling after long term norepinephrine treatment in rats. *Cardiovasc Res* 52:265–273. doi:[10.1016/S0008-6363\(01\)00398-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(01)00398-4)
  52. Kobayashi N, Mori Y, Nakano S et al (2001) Celi-prolol stimulates endothelial nitric oxide synthase expression and improves myocardial remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens* 19:795–801. doi:[10.1097/00004872-200104000-00017](https://doi.org/10.1097/00004872-200104000-00017)
  53. Grimm D, Huber M, Jabusch HC et al (2001) Extracellular matrix proteins in cardiac fibroblasts derived from rat hearts with chronic pressure overload: effects of beta-receptor blockade. *J Mol Cell Cardiol* 33:487–501. doi:[10.1006/jmcc.2000.1321](https://doi.org/10.1006/jmcc.2000.1321)
  54. Wei S, Chow LT, Sanderson JE (2000) Effect of carvedilol in comparison with metoprolol on myocardial collagen postinfarction. *J Am Coll Cardiol* 36:276–281. doi:[10.1016/S0735-1097\(00\)00671-9](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(00)00671-9)
  55. Funder JW (2006) Minireview: aldosterone and the cardiovascular system: genomic and nongenomic effects. *Endocrinology* 147:5564–5567. doi:[10.1210/en.2006-0826](https://doi.org/10.1210/en.2006-0826)
  56. Young MJ (2008) Mechanisms of mineralocorticoid receptor-mediated cardiac fibrosis and vascular inflammation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17:174–180. doi:[10.1097/MNH.0b013e3282f56854](https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e3282f56854)
  57. Pitt B, Reichek N, Willenbrock R et al (2003) Effects of eplerenone, enalapril, and eplerenone/enalapril in patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy: the 4E-left ventricular hypertrophy study. *Circulation* 108:1831–1838. doi:[10.1161/01.CIR.0000091405.00772.6E](https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000091405.00772.6E)
  58. Sato A, Takane H, Saruta T (2001) High serum level of procollagen type III amino-terminal peptide contributes to the efficacy of spironolactone and angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy on left ventricular hypertrophy in essential hypertensive patients. *Hypertens Res* 24:99–104. doi:[10.1291/hypres.24.99](https://doi.org/10.1291/hypres.24.99)
  59. Zannad F, Radauceanu A (2005) Effect of MR blockade on collagen formation and cardiovascular disease with a specific emphasis on heart failure. *Heart Fail Rev* 10:71–78. doi:[10.1007/s10741-005-2351-3](https://doi.org/10.1007/s10741-005-2351-3)
  60. Hayashi M, Tsutamoto T, Wada A et al (2003) Immediate administration of mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone prevents post-infarct left ventricular remodeling associated with suppression of a marker of myocardial collagen synthesis in patients with first anterior acute myocardial infarction. *Circulation* 107:2559–2565. doi:[10.1161/01.CIR.0000068340.96506.0F](https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000068340.96506.0F)
  61. Loch D, Levick S, Hoey A et al (2006) Rosuvastatin attenuates hypertension-induced cardiovascular remodeling without affecting blood pressure in DOCA-salt hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 47:396–404
  62. Majima T, Komatsu Y, Fukao A et al (2007) Short-term effects of atorvastatin on bone turnover in male patients with hypercholesterolemia. *Endocr J* 54:145–151. doi:[10.1507/endocrj.K06-127](https://doi.org/10.1507/endocrj.K06-127)
  63. Rajagopalan S, Zannad F, Radauceanu A et al (2007) Effects of valsartan alone versus valsartan/simvastatin combination on ambulatory blood pressure, C-reactive protein, lipoproteins, and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with hyperlipidemia and hypertension. *Am J Cardiol* 100:222–226. doi:[10.1016/j.amjcard.2007.02.085](https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2007.02.085)
  64. Zucker S, Hymowitz M, Conner C et al (1999) Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues. Clinical and experimental applications. *Ann N Y Acad Sci* 878:212–227. doi:[10.1111/j.1749-6632.1999.tb07687.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07687.x)
  65. Garnero P, Bianchi F, Carlier MC et al (2000) Biochemical markers of bone remodeling: pre-analytical variations and

- guidelines for their use. SFBC (Societe Francaise de Biologie Clinique) Work Group. Biochemical markers of bone remodeling. *Annales de Biologie Clinique* 58:683–704
66. Fontaine V, Jacob MP, Houard X et al (2002) Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. *Am J Pathol* 161:1701–1710
67. Jung K, Nowak L, Lein M et al (1996) Role of specimen collection in preanalytical variation of metalloproteinases and their inhibitors in blood. *Clin Chem* 42:2043–2045
68. Zucker S, Doshi K, Cao J (2004) Measurement of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in blood and urine: potential clinical applications. *Adv Clin Chem* 38:37–85. doi:[10.1016/S0065-2423\(04\)38002-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2423(04)38002-9)
69. Cremers S, Garnero P (2006) Biochemical markers of bone turnover in the clinical development of drugs for osteoporosis and metastatic bone disease: potential uses and pitfalls. *Drugs* 66:2031–2058. doi:[10.2165/00003495-200666160-00001](https://doi.org/10.2165/00003495-200666160-00001)



## **2.3. ASYNCHRONISME ET FIBROSE**

### **2.3.1. L'ASYNCHRONISME**

Chez les individus sains, l'activité électrique du cœur est initiée au niveau du nœud sinusal [localisé à la jonction entre la veine cave supérieure et l'oreillette droite (OD)]. Le signal électrique s'étend du nœud sinusal vers les 2 oreillettes les amenant à se contracter et à expulser le sang dans les ventricules. L'onde de dépolarisation se propage alors vers le nœud auriculo-ventriculaire (AV) à la partie basse de l'OD, puis vers les ventricules par l'intermédiaire du faisceau de His. Le faisceau de His se divise en deux branches, une pour chaque ventricule. La fonction de ces branches gauche et droite du faisceau de His est de conduire les impulsions électriques et de les distribuer de telle façon que la contraction du muscle cardiaque soit efficace et coordonnée (135). Cette contraction coordonnée est nécessaire à la capacité des ventricules à pomper efficacement le sang.

Quand une branche est lésée, par exemple au cours d'un IDM ou à cause d'une cardiopathie sous-jacente, cela peut entraîner une modification de la conduction de l'activité électrique cardiaque, l'impulsion électrique ne pouvant plus se propager le long de la branche lésée.

Un trouble de la conduction cardiaque dont le blocage est situé sur une des branches du faisceau de His est appelé bloc de branche. Lorsqu'il y a un retard dans la transmission du signal électrique par les branches gauches, ceci entraîne un bloc de branche gauche (BBG), plus fréquent chez les patients ayant une fonction systolique du VG détériorée [avec une fraction d'éjection du VG (FEVG) < 50 %] (136) et une IC modérée à sévère (137).

Comme le signal électrique vers le VG est retardé, le ventricule droit (VD) commence sa contraction une fraction de seconde avant le gauche, au lieu de la faire simultanément. Le délai dans l'activation électrique ventriculaire peut causer une contraction ventriculaire anormale, appelée asynchronisme.

L'asynchronisme peut siéger à trois niveaux: entre les oreillettes et les ventricules, au niveau interventriculaire et au niveau intraventriculaire gauche (135, 138, 139).

L'asynchronisme AV peut être lié à une dysfonction du nœud sinusal et/ou du nœud AV qui conduit à un délai d'activation entre les oreillettes et les ventricules. Ceci est responsable d'une insuffisance mitrale en fin de diastole et d'un raccourcissement du temps de remplissage ventriculaire lié à la simultanéité entre la systole auriculaire et le remplissage passif précoce, ce qui conduit à une réduction du volume éjecté (135).

L'asynchronisme interventriculaire correspond au délai entre le début de la contraction du VG et de la contraction du VD. L'asynchronisme intraventriculaire se rencontre lorsque certaines zones du myocarde sont activées de façon précoce tandis que d'autres le sont de façon tardive (140).

Le retard de conduction interventriculaire a été identifié comme un facteur de mauvais pronostic (137).

Le type d'asynchronisme contribuant le plus à la sévérité de l'insuffisance cardiaque n'est pas encore défini.

L'asynchronisme ventriculaire est souvent repéré à l'ECG par un complexe QRS large. Chez environ 30 % des patients avec une IC congestive, une conduction électrique anormale est notée sur l'ECG avec un élargissement du QRS qui est égal ou supérieur à 120 ms (139), ce qui est un facteur de mauvais pronostic (141, 142).

Par ailleurs, il faut noter que 35 % des patients avec BBG n'ont pas d'asynchronisme interventriculaire et que 20 % n'ont pas d'asynchronisme intraventriculaire (143).

Dans le cadre de l'IC congestive, les conséquences de l'anomalie électromécanique sont:

- une anomalie du remplissage ventriculaire : le délai AV prolongé peut signifier que la période de remplissage diastolique est abrégée, ce qui limite ensuite le volume diastolique net
- une réduction du débit systolique du VG
- et une aggravation de la régurgitation mitrale : un délai AV trop long impliquerait que la valve cardiaque serait souvent en position semi-ouverte quand la systole ventriculaire commence, ce qui aurait pour résultat une régurgitation mitrale pré-systolique (144, 145).

### **2.3.2. LA RELATION AVEC LA FIBROSE**

Des études sur des échantillons de biopsies myocardiques ont montré que la fibrose était l'une des caractéristiques majeures du remodelage dans les maladies de la conduction cardiaque. Elles ont également établi une relation entre l'accumulation des fibrilles de collagène et le ralentissement de la conduction dans cette pathologie (146). Les maladies de la conduction cardiaque sont les causes les plus communes de blocs AV permanents chez l'adulte. Le processus physiopathologique de cette maladie est caractérisé par une perte lente et progressive de la conduction fibreuse et une fibrose (146).

L'activation asynchrone ventriculaire entraîne également une dilatation du VG et une réduction de la fraction d'éjection (FE) ainsi qu'une redistribution du flux sanguin

myocardique par plusieurs voies, y compris des modifications de la composition du tissu myocardique (138, 147, 148). La perte de myocytes due à des mécanismes apoptotique et nécrotique est suivie par une fibrose de remplacement, aboutissant à une isolation électrique des myocytes et l'introduction de voies alternatives de conduction pour des arythmies. Les différents temps d'activation entre les zones myocardiques sont liés à des zones de fibrose interstitielle (notamment en post-infarctus) qui rendent la propagation de l'influx électrique hétérogène (140).

L'accumulation de tissu fibreux est une des caractéristiques essentielles des changements défavorables de la structure du tissu cardiaque. Plusieurs études ont montré qu'une fibrose myocardique histologiquement prouvée était associée à une dilatation du VG et une baisse de la FE (114). La relation entre fibrose et arythmogénèse dépend du type de cardiopathie et des détails structuraux du remodelage cardiaque (149).

## **2.4. LA THERAPIE DE RESYNCHRONISATION CARDIAQUE**

Ces anomalies électromécaniques peuvent être compensées par une stimulation des 2 chambres, avec un délai AV raccourci (150).

Cette stimulation se fait grâce à différents dispositifs

- Les défibrillateurs cardiaques implantables (DCI) chez des patients avec une IC de classe New-York Heart Association (NYHA) II à III et un QRS < ou  $\geq$  120 ms (151)
- Les dispositifs de thérapie de resynchronisation cardiaque (TRC) chez des patients avec une IC de classe NYHA III à IV, avec un QRS  $\geq$  120 ms (152).

### **2.4.1. LES EFFETS DE LA TRC SUR LA FIBROSE**

Certains des effets bénéfiques de la TRC pourraient être liés à sa capacité à induire une régression de la fibrose cardiaque sévère. Il a été démontré que la TRC entraînait une réduction significative des fibres de collagène cardiaques (153). Une autre étude menée de façon prospective sur 73 patients avec une IC et un asynchronisme du VG a analysé l'hypothèse selon laquelle le turnover du collagène de type I avait une influence sur la réponse à long terme de la TRC (154). Mais cette étude n'avait pas prévu de recruter un groupe contrôle et a néanmoins conclu que, chez les patients répondeurs, la TRC semblait normaliser les concentrations sériques du peptide carboxy-terminal du procollagène de type I (PICP) (154), peptide libéré durant la synthèse du collagène de type I qui est associé à l'importance du dépôt myocardique de fibrille de collagène de type I chez des patients IC (114). Elle a aussi conclu que non seulement le turnover du collagène de type I avait un impact sur la



réponse au traitement, mais également que la capacité de la TRC à restaurer la balance synthèse/dégradation du collagène de type I était associée à une réponse favorable à ce traitement. Ces conclusions sont à interpréter avec précaution au vu du faible nombre de patients et de l'absence d'un groupe témoin permettant la comparaison et l'affirmation de tels résultats.

Néanmoins, l'exploration de l'hypothèse selon laquelle la limitation de la synthèse et du dépôt cardiaque excessifs de fibrilles de collagène de type I pourrait être l'un des mécanismes contribuant aux effets cliniques de la TRC, reste une voie intéressante à étudier.

#### **2.4.2. LES LIMITES DE LA TRC**

Les patients traités par TRC ne montrent pas tous une amélioration. L'adoption de critères courants pour la TRC (IC sévère classe III-IV de la NYHA et complexe QRS > 120 ms), aboutit à une réponse favorable chez seulement 2/3 des candidats (155-157).

L'absence de réponse à la TRC peut être expliquée par une sélection non optimale des patients et par des questions techniques relatives au placement de la sonde du VG aussi bien qu'au délai de l'intervalle AV.

Comme il s'agit d'un traitement lourd et coûteux, une recherche abondante a été réalisée pour trouver des nouveaux critères plus performants, nécessaires pour sélectionner les répondeurs.

Des études cliniques ont été menées (158-161) dans le but de répondre à cette question.

Plusieurs études se sont focalisées sur l'imagerie tissulaire Doppler et l'IRM ainsi que sur l'élargissement du QRS comme marqueurs de l'asynchronisme cardiaque. Plus de 4000 patients ont été inclus dans des essais de resynchronisation en se basant sur leur ECG. Un petit nombre d'études observationnelles, non randomisées, monocentriques et de courte durée suggéraient que les mesures électrocardiographiques de l'asynchronisme mécanique permettaient de mieux identifier les patients aptes à bénéficier de la TRC (162). Même si l'échocardiographie Doppler 2D (159) et l'imagerie de synchronisation tissulaire, une nouvelle modalité technique d'imagerie tissulaire Doppler (161), semblent fournir des éléments prédictifs fiables du remodelage inverse du VG suite à la TRC, on ignore encore quel paramètre indique le mieux l'asynchronisme et la probabilité de bénéficier de la TRC. De même, les images appropriées pour effectuer ces mesures ne peuvent être obtenues chez l'ensemble des patients.

L'électrocardiographie ne semble pas être un marqueur précis du délai électromécanique, étant donné que l'asynchronisme mécanique est absent chez presque 30% des patients avec un QRS élargi (139), et que certains patients IC ont un asynchronisme malgré un QRS normal

(163), et enfin que le retard de conduction électrique peut ne pas avoir lieu chez des patients présentant un BBG (164). De plus, des études (165, 166) ont rapporté des résultats cohérents sur la faible valeur prédictive de l'intervalle QRS sur les bénéfices de la TRC en ce qui concerne l'amélioration de la fonction du VG et le remodelage inverse du VG.

L'essai Predictors of response to cardiac resynchronization therapy (PROSPECT) (160) était un essai prospectif, multicentrique et non randomisé dont le but était d'identifier les mesures échocardiographiques de l'asynchronisme et d'évaluer leur capacité à prédire la réponse à la TRC. Cette étude a montré qu'aucun des paramètres électrocardiographiques évaluant l'asynchronisme n'avait une valeur prédictive suffisante pour être recommandé comme critère de sélection des patients à traiter par la TRC en dehors des recommandations en vigueur (167).

D'autres pistes de recherche des critères prédictifs de réponse à la resynchronisation ont également été explorées :

- Fruhwald F.MF *et al* se sont intéressés au NT-ProBNP déjà reconnu comme un puissant marqueur de la dysfonction cardiaque et du pronostic et ont cherché à analyser l'effet de la TRC sur les concentrations plasmatiques du NT-ProBNP chez les patients IC modérés à sévères de l'étude CARE-HF (168). D'après ces résultats, la TRC entraînerait une réduction précoce et prolongée de la concentration de NT-ProBNP, réduction associée à une amélioration précoce et progressive de la fonction du VG à l'ECG. L'auteur conclut donc que le NT-ProBNP pourrait devenir un outil simple de surveillance des effets de la TRC.
- Une étude de Vanderheyden M. *et al* (169) a été menée sur 24 patients pour vérifier si l'amélioration fonctionnelle post-TRC était associée à des modifications dans l'expression de marqueurs établis de structure moléculaire et de régulation du calcium. Les résultats de cette étude montrent que chez des patients en IC avec un asynchronisme cardiaque, les effets bénéfiques de la TRC sont corrélés à des modifications des marqueurs moléculaires reconnus de l'IC, y compris des produits des gènes régulant la contractilité et l'hypertrophie pathologique.
- Les biomarqueurs du collagène de type I de la MEC ont eux aussi été explorés (154) mais sur une population non contrôlée. Les auteurs rapportent qu'ils influencent la réponse à long terme de la TRC et que la capacité de la TRC à restaurer l'équilibre entre la dégradation et la synthèse du collagène de type I est associée à une réponse bénéfique.

### **3. HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL**

Au cours de ces dix dernières années, la recherche de marqueurs plasmatiques du remodelage délétère du VG et de critères prédictifs de la réponse au traitement s'est intensifiée. Ceci s'explique par le fait que le remodelage du VG et l'IC restent des problèmes importants de santé publique malgré les progrès de la thérapeutique et les bénéfices prouvés de la reperfusion, des IEC, des  $\beta$ -bloquants, des statines, des AATI, et des antagonistes de l'aldostérone. De plus, l'incidence mondiale de l'IC continue d'augmenter.

Au vu des études menées précédemment, l'un des moyens les moins invasifs mais néanmoins informatif pour évaluer la fibrose et le remodelage cardiaque tissulaire dans l'IC à différents stades de progression est l'analyse des biomarqueurs du collagène de la MEC.

La majorité des cas de survenue d'IC font suite à une IDM (10) et impliquent un remodelage délétère du VG avec une hypertrophie et une dysfonction progressive du VG. Ce phénomène de remodelage aboutit à une fibrose myocardique. Les patients survivants à un IDM et qui développent une IC sous traitement pharmacologique optimal ont un risque de décès multiplié par dix (170). C'est pourquoi la recherche se focalise sur la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques pouvant potentiellement limiter le remodelage du VG et prévenir l'IC. Peu d'études se sont intéressées au remodelage matriciel dans ce cas de figure. De plus, à la suite des résultats de l'étude RALES sur les biomarqueurs, il a été suggéré que les antagonistes de l'aldostérone agissaient en partie en limitant le processus de fibrose

La physiopathologie de l'IC associée à un asynchronisme (114, 138, 147, 148) ainsi que le mécanisme d'action de la TRC (114, 153, 154) semblent passer par le processus de fibrose myocardique, potentiellement évaluable par les biomarqueurs de la MEC. Très peu d'études ont été menées pour explorer la piste des biomarqueurs du collagène dans la TRC (154).

Enfin, bien que de nombreuses études randomisées et contrôlées ont montré que la TRC améliorerait significativement le statut clinique fonctionnel, le remodelage ventriculaire et la survie, environ 30 % des patients ne répondent pas au traitement (156, 157). C'est pourquoi la recherche se focalise sur la découverte de critères prédictifs pouvant potentiellement prédire la réponse des patients IC au traitement par la TRC. Un simple marqueur plasmatique qui pourrait identifier les patients qui bénéficieraient de la TRC permettrait une sélection de ces patients et diminuerait les coûts.

Le but de ce travail était de déterminer le potentiel des biomarqueurs circulants du collagène comme outil d'analyse du remodelage

- chez les patients de l'étude EPHEBUS, essai réalisé pour tester l'hypothèse selon laquelle le traitement par éplérénone, un anti-aldostérone qui bloque sélectivement le récepteur minéralocorticoïde et a une affinité minimale pour les récepteurs glucocorticoïde, progestérone ou androgène, diminue la mortalité globale et la mortalité cardiovasculaire ou les hospitalisations pour événements cardiovasculaires chez les patients avec IDM aigu compliqué par une dysfonction VG et une IC, et traités par thérapie médicamenteuse standard incluant des IEC, et
- chez des patients avec une IC modérée ou sévère due à une dysfonction du VG associée à un asynchronisme cardiaque, déjà traités par diurétiques et traitement pharmacologique optimal incluant des IEC et des  $\beta$ -bloquants, sous l'influence de la resynchronisation cardiaque inclus dans l'étude CARE-HF.

Notre premier objectif était d'établir l'évolution des biomarqueurs du turnover de la MEC, la première hypothèse étant que le remodelage de la MEC peut être évalué par la mesure de ces biomarqueurs. De plus, nous voulions déterminer si l'éplérénone pour les patients issus de l'étude EPHEBUS et la TRC pour ceux de l'étude CARE-HF avaient une influence sur les biomarqueurs de la MEC cardiaque.

Nous voulions également étudier la relation entre les concentrations initiales des biomarqueurs de la MEC et certaines caractéristiques cliniques, démographiques, hémodynamiques et biologiques des patients, en relation avec la sévérité de la maladie.

Notre troisième objectif était d'analyser le caractère prédictif des concentrations initiales des marqueurs sériques de la MEC sur la survenue d'événements (décès, hospitalisations) cardiovasculaires.

Enfin, l'hypothèse que nous avons émise dans l'étude CARE-HF, était que des concentrations initiales élevées des marqueurs de renouvellement de collagène pourraient discriminer des patients ayant une hétérogénéité tissulaire au niveau des ventricules et un asynchronisme. Ceci pourrait permettre de prévoir la réponse à la TRC. Notre dernier objectif a donc été d'étudier si les biomarqueurs du collagène de la MEC pouvaient être utilisés comme critère prédictif de la réponse à la TRC chez ces patients.

## **4. RESULTATS**

### **4.1. RESULTATS DE L'ÉTUDE EPHEBUS**

Iraqi W, Rossignol P, Angioi M, et al. Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with acute myocardial infarction complicated by left ventricular dysfunction and heart failure: insights from the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHEBUS) study. *Circulation* 2009;119:2471-9 (86).

# Circulation

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



**Extracellular Cardiac Matrix Biomarkers in Patients With Acute Myocardial Infarction Complicated by Left Ventricular Dysfunction and Heart Failure: Insights From the Eplerenone Post Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) Study**

Wafae Iraqi, Patrick Rossignol, Michael Angioi, Renaud Fay, Josette Nuée, Jean Marie Ketelslegers, John Vincent, Bertram Pitt and Faiez Zannad

*Circulation* 2009;119:2471-2479; originally published online Apr 27, 2009;

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.809194

Circulation is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2009 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0009-7322. Online ISSN: 1524-4539

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/119/18/2471>

Subscriptions: Information about subscribing to *Circulation* is online at  
<http://circ.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax: 410-528-8550. E-mail:  
[journalpermissions@lww.com](mailto:journalpermissions@lww.com)

Reprints: Information about reprints can be found online at  
<http://www.lww.com/reprints>

## Extracellular Cardiac Matrix Biomarkers in Patients With Acute Myocardial Infarction Complicated by Left Ventricular Dysfunction and Heart Failure

### Insights From the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) Study

Wafae Iraqi, PharmD; Patrick Rossignol, MD, PhD; Michael Angioi, MD; Renaud Fay, PharmD; Josette Nuée, PhD; Jean Marie Ketelslegers, MD, PhD; John Vincent, MD; Bertram Pitt, MD; Faiez Zannad, MD, PhD

**Background**—Aldosterone stimulates cardiac collagen synthesis. Circulating biomarkers of collagen turnover provide a useful tool for the assessment of cardiac remodeling in patients with congestive heart failure and left ventricular systolic dysfunction after acute myocardial infarction.

**Methods and Results**—In a substudy of the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS), which evaluated the effects of the selective aldosterone receptor antagonist eplerenone versus placebo, serum levels of collagen biomarkers were measured in 476 patients with congestive heart failure after acute myocardial infarction complicated with left ventricular systolic dysfunction. The combination of the type I collagen telopeptide and brain natriuretic peptide levels above median at baseline was associated with all-cause mortality and the composite end point of cardiovascular death or heart failure hospitalization, with hazard ratios of 2.49 ( $P=0.039$ ) and 3.03 ( $P=0.002$ ), respectively. During follow-up, levels of aminoterminal propeptide of type I and type III procollagen were found to be consistently lower in the eplerenone group and significantly lower beginning at 6 months.

**Conclusions**—Changes in biomarkers of collagen synthesis and degradation suggest that extracellular matrix remodeling is an active process in patients with congestive heart failure and left ventricular systolic dysfunction after acute myocardial infarction. High type I collagen telopeptide and high brain natriuretic peptide serum levels are associated with the highest event rate. Eplerenone suppresses post-acute myocardial infarction collagen turnover changes. (*Circulation*. 2009;119:2471-2479.)

**Key Words:** biological markers ■ collagen ■ extracellular matrix ■ heart failure ■ myocardial infarction

Acute myocardial infarction (AMI) is an important medical problem in industrialized countries, with  $\approx 25\%$  of these patients developing congestive heart failure (CHF) as a complication. Until recently, medical treatment of post-AMI heart failure relied on a combination of angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers,  $\beta$ -blockers, and diuretics when indicated. The use of aldosterone blockade in this setting is supported by the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS), which found that the addition of eplerenone to standard medical therapy

reduced the risk of mortality by 15% during a mean follow-up of 16 months, with significant reductions in cardiovascular death, sudden death, and hospitalization for HF.<sup>1</sup>

#### Clinical Perspective on p 2479

Progressive left ventricular systolic dysfunction (LVSD) may develop after AMI as a consequence of cardiac remodeling. The effect of remodeling on cardiac general structure and function may be assessed by cardiac imaging (ultrasound and magnetic resonance imaging) and by measuring brain natriuretic peptide (BNP). However, the extent to which the

Received July 29, 2008; accepted March 11, 2009.

From CHU de Nancy, Hôpital Jeanne d'Arc, Dommartin-lès-Toul, France (W.I., P.R., R.F., J.N., F.Z.); Inserm, Centre d'Investigation Clinique de Nancy CIC-P 9501, Dommartin-lès-Toul, France (W.I., P.R., M.A., R.F., J.N., F.Z.); Nancy-Université, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France (W.I., P.R., M.A., R.F., J.N., F.Z.); Inserm U684, Nancy Université, Nancy, France (W.I., P.R., F.Z.); Cliniques Universitaires St-Luc, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Brussels, Belgium (J.M.K.); Pfizer Inc, New York, NY (J.V.); Department of Internal Medicine, Division of Cardiology, University of Michigan, Ann Arbor (B.P.); and Department of Cardiology, Heart Failure and Hypertension Unit, CHU Nancy, Vandoeuvre les Nancy, France (M.A., F.Z.).

Clinical trial registration information—URL: <http://clinicaltrials.gov>. Unique identifier: NCT00132093.

Correspondence to Faiez Zannad, CIC Inserm-CHU, Hôpital Jeanne d'Arc, 54200 Dommartin les Toul, France. E-mail [f.zannad@chu-nancy.fr](mailto:f.zannad@chu-nancy.fr)

© 2009 American Heart Association, Inc.

*Circulation* is available at <http://circ.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.809194

remodeling is a consequence of changes in tissue structure (ie, cardiac extracellular collagen matrix [ECCM] synthesis or degradation) cannot be assessed by classic cardiac imaging. ECCM turnover is a major determinant of cardiac remodeling in various conditions such as HF, obesity, and AMI.<sup>2-4</sup> Circulating biomarkers of collagen turnover may provide a simple tool to reliably assess this ECCM turnover.

In patients with CHF caused by systolic dysfunction after AMI, the kinetics of those biomarkers may be influenced by neurohormones involved in the pathophysiology of remodeling. In a substudy of the Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES), biomarkers of matrix synthesis were found to be predictive of adverse outcome. These biomarkers were reduced by spironolactone, and patients with baseline concentrations above the median experienced a greater benefit.<sup>2</sup>

This process, however, has not been evaluated in detail in patients with CHF after AMI complicated by LVSD.<sup>5</sup> In a substudy of EPHEUS, we examined the kinetics and predictive significance of markers of matrix synthesis and degradation and the effects of eplerenone on these parameters.

In this substudy, we examined the plasma time course profile of selected biomarkers over a period of 9 months and the effect of eplerenone on both the levels and time course of these biomarkers. In addition, we evaluated the relationship between baseline levels of some neurohormones and the biomarkers of interest and trial outcomes.

## Methods

### Study Design and Patient Population

The design and main results of EPHEUS have been reported.<sup>1,6</sup> This substudy was conducted in 476 patients participating in EPHEUS enrolled in 65 centers that volunteered to participate in 17 countries. EPHEUS enrolled patients with CHF after AMI complicated by LVSD (ejection fraction  $\leq$ 40%). HF had to be documented by at least one of the following: presence of pulmonary rales, chest radiography showing pulmonary venous congestion, or the presence of a third heart sound. Patients were entered in the study at any point from 3 to 14 days after infarction. Patients with diabetes mellitus were not required to have evidence of CHF. All patients were randomly assigned to treatment with eplerenone 25 mg/d or placebo for the first month up-titrated to 50 mg/d or placebo, depending on serum potassium levels. Treatment with eplerenone was in addition to standard medical therapy, which could include angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers,  $\beta$ -blockers, diuretics, aspirin, statins, and coronary reperfusion therapy. EPHEUS was an event-driven study with a mean follow-up of 16 months.

Blood samples for all the biomarkers of collagen turnover were analyzed in 1 laboratory. Plasma BNP and other neurohormones were analyzed in a different laboratory. Correlation analysis of biomarkers and their predictability of outcomes took into account only the group treated with placebo.

### Blood Sampling

Blood samples were drawn at baseline, 4 weeks, and 3, 6, and 9 months or at the time of permanent discontinuation of the drug. All samples were centrifuged immediately at 3000 rpm for 10 minutes and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assay. All samples were transported to the 2 respective central laboratories and assayed in 1 batch in each laboratory. A minimum of 2 samples were available per patient: 1 at baseline and 1 at follow-up.

**Table 1. Patient Outcomes**

	Placebo (n=236), n (%)	Eplerenone (n=240), n (%)
Treated		
Died	22 (9.3)	27 (11.3)
Alive	214 (90.7)	213 (88.8)
Discontinued study medication	22 (9.3)	20 (8.3)
Protocol nonadherence	3 (1.3)	3 (1.3)
Treated with spironolactone	4 (1.7)	0 (0.0)
Adverse sign or symptom	5 (2.1)	7 (2.9)
Adverse event >7 d after last dose	0 (0.0)	1 (0.4)
Patient request	10 (4.2)	9 (3.8)

### Laboratory Analysis

The following collagen biomarkers were measured: aminoterminal propeptide of type I procollagen (PINP) and aminoterminal propeptide of type III procollagen (PIIINP), which are markers of type I and III collagen synthesis, respectively; tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 (TIMP-1), which inhibits matrix metalloproteinases (MMPs) involved in collagen degradation; and type I collagen telopeptide (ICTP), which is a marker of type I collagen degradation. All assays were performed by technicians blinded to clinical data and subject randomization.

Commercial radioimmunoassays (Orion Diagnostica, Espoo, Finland) were used to measure PIIINP, PINP, and ICTP. Determination of TIMP-1 was assessed with ELISA kits (Amersham Biosciences, Orsay, France).

The sensitivity (lowest concentration different from zero) was 0.3  $\mu\text{g/L}$  for PIIINP, 2.0  $\mu\text{g/L}$  for PINP, 0.4  $\mu\text{g/L}$  for ICTP, and  $\leq$ 3 ng/mL for TIMP-1.

Normal serum ranges for PIIINP, PINP, and ICTP were provided by the assay manufacturer and were based on a Finnish population. These ranges were 2.3 to 6.4 ng/mL for PIIINP; 22 to 87 and 19 to 83 ng/mL for PINP in men and women, respectively; and 3.2 and 3.5 ng/mL for ICTP in men and women, respectively. Normal serum ranges for TIMP-1 are 0 to 519 ng/mL.

Interassay variations for PIIINP, PINP, and ICTP were  $<$ 9.8% and 15% for TIMP-1. Their intra-assay variations were  $<$ 10.2%.

### Statistical Analysis

Analyses were performed with SAS version 9.1.3 software (SAS Institute, Inc, Cary, NC). The 2-tailed significance level was set at 0.05. Categorical variables are given as percentages; continuous variables are given as mean  $\pm$  SD.

### Correlation Analyses

To control for deviations from the normality assumption, correlation analyses were carried out with the nonparametric Spearman test.

### Biomarkers Kinetics

Biomarker changes from baseline at months 1, 3, 6, and 12 were analyzed with a mixed-effect model, with change from baseline as the dependent variable and treatment (fixed effect) and patient (random effect) as covariables. Age and gender were tested in each model and included in the model when needed (The only significant association was found between PINP and gender). Treatment differences at each visit after baseline were assessed at the 1.25% significance level to preserve the 5% overall error rate (Bonferroni adjustment). Comparisons between baseline and month 1 were carried out with the paired Wilcoxon test.



**Table 2. Baseline Characteristics in Patients With Available Biomarkers**

Characteristics	Placebo Arm	Eplerenone Arm	P
Patients, n	236	240	
Age, y	62±11	62±11	NS
>65 y, n (%)	93/236 (39.4)	98/240 (40.8)	NS
>75 y, n (%)	27/236 (11.4)	27/240 (11.3)	NS
Male, %	75	73	NS
Systolic BP, mm Hg	121±16	118±16	NS
Diastolic BP, mm Hg	75±10	73±10	NS
LVEF, %	34±5	34±5	NS
Time from AMI to randomization, d	8.5±2.7	8.6±2.9	NS
Prior HF hospitalization, %	6	3	NS
Reperfusion/revascularization, %	39	38	NS
HF symptoms, %	89	90	NS
Kaliemia, mmol/L	4.4±0.5	4.4±0.4	NS
Creatinemia, μmol/L	101±32	99±28	NS
Creatinine clearance,* mL/min	81±36	80±29	NS
Medical history, %			
Prior AMI	21	23	NS
Diabetes	29	30	NS
Prior HF episodes	11	9	NS
Hypertension	66	59	NS
Medications, %			
ACEIs/ARB	89	83	0.043
β-blockers	78	77	NS
Diuretics	51	52	NS
Aspirin	85	91	0.029
Statins	50	46	NS
Biomarkers (n patients)			
PINP, ng/mL	35±17 (229)	33±14 (232)	NS
PIIINP, ng/mL	4.2±1.5 (230)	4.2±1.7 (232)	NS
ICTP, ng/mL	6.7±4.0 (230)	6.4±3.4 (232)	NS
TIMP-1, ng/mL	1228±401 (230)	1164±317 (232)	NS
BNP, pg/mL	206±244 (226)	186±111 (232)	NS

BP indicates blood pressure; LVEF, LV ejection fraction; ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitor; and ARB, angiotensin receptor blocker. Values are mean±SD when appropriate.

\*Cockcroft-Gault.

**Time-to-Event Analyses**

Analysis of the association between baseline biomarkers and outcomes was performed with the Cox proportional-hazards model. All-cause death and the composite end point of cardiovascular death or HF hospitalization were found to be associated with BNP and ICTP levels, and HF hospitalization was found to be associated with BNP alone in univariate analyses (data not shown). The small number of events prevented any reliable assessment of the linear relationship of BNP and ICTP values with risk levels, but further explorations showed that ≈50% of outcomes were observed in patients with baseline values of BNP and ICTP above the median. Thus, a binary variable of BNP>median and ICTP>median versus BNP≤median and/or ICTP≤median was constructed and used as a

**Table 3. Differences in Baseline Characteristics and Outcomes Between the EPHESUS Global Population and the Biomarkers Substudy Population**

	Global Population (Placebo/Eplerenone)	Biomarkers Substudy (Placebo/Eplerenone)	P*
Age, y	64±11/64±11	62±11/62±11	0.0003
Diastolic blood pressure, mm Hg	72±11/72±11	75±10/73±10	<0.0001
Systolic blood pressure, mm Hg	119±17/119±17	121±16/118±16	NS
LVEF, %	33±6/33±6	34±5/34±5	<0.0001
Serum potassium, mmol/L	4.3±0.5/4.3±0.4	4.4±0.5/4.4±0.4	<0.0001
Previous MI, %	27/28	21/23	0.009
Prior HF, %	15/14	11/9	0.002
Treated with diuretics, %	61/60	51/52	<0.0001
Interval from AMI to randomization, d	7.3±3.0/7.3±3.0	8.5±2.7/8.6±2.5	<0.0001
Deaths, %	16.7/14.4	9.3/11.3	NA

NA indicates not applicable (16-month mean follow-up for global population, 9-month follow-up in biomarkers substudy). Values are mean±SD when appropriate.

\*Patients with biomarkers versus others.

composite covariable in the multivariable models. Variables retained in the final models were chosen with an interactive backward selection method. Analyses were performed in the placebo group only to control for the treatment interaction with biomarkers. As potential confounding factors, age and gender were additionally tested in the models but never appeared to be significant.

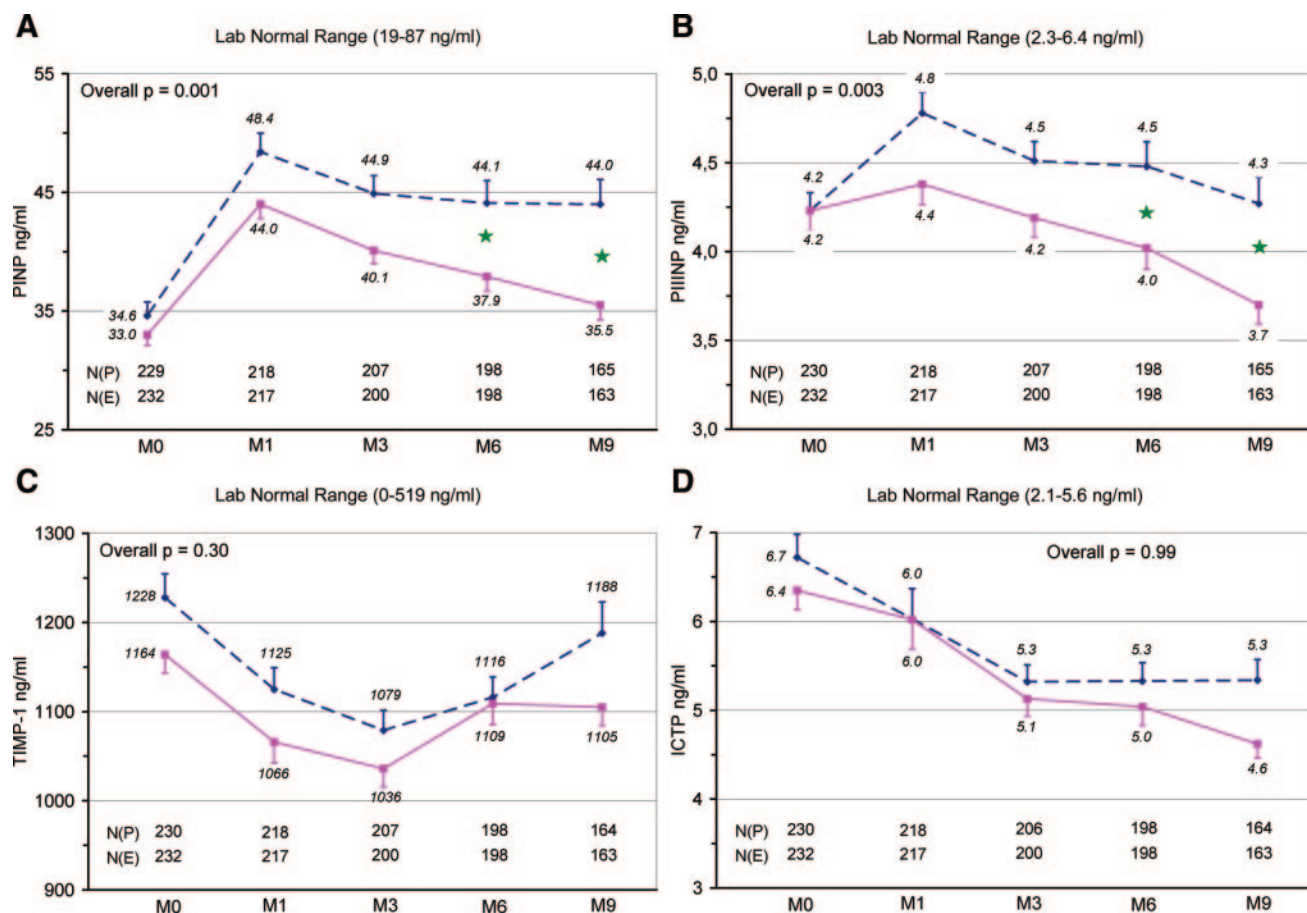
**Results**

**Baseline Characteristics**

Of the 476 patients included in the study, 236 were randomized to the placebo arm, and 240 received eplerenone. The disposition of patients during the course of the study is summarized in Table 1. In total, 49 patients died, and in contrast to the overall EPHESUS study, patient outcomes in terms of mortality and hospitalization for HF did not differ significantly between the placebo and eplerenone groups in this biomarkers substudy cohort.

There were no statistically significant differences between the eplerenone and placebo groups with respect to baseline demographic and clinical characteristics (Table 2).

Differences between the patient population in this study and the overall EPHESUS population are summarized in Table 3. Compared with the overall EPHESUS population, patients in the biomarkers substudy were on average younger and had higher diastolic blood pressure, LV ejection fraction, and potassium levels. Patients in the global population had a higher number of previous AMI and HF than patients in the biomarkers substudy and greater use of diuretics. Randomization occurred on average >1 day later in the biomarkers substudy. Because baseline characteristics were different from the global population, we did not analyze the interaction between the effects of eplerenone and study end points.



**Figure 1.** Serum levels of collagen biomarkers kinetics during the 9-month follow-up. Kinetics of PINP (A), PIIINP (B), TIMP-1 (C), and ICTP (D) serum levels during the 9-month follow-up are shown. Dashed line indicates placebo; solid line, eplerenone. Overall probability value applies to the mean change from baseline to month 9. Error bars show SEM. ★Significant difference between the placebo and eplerenone group levels adjusted for the comparison multiplicity ( $P < 0.0125$ ).

In the main study population and the present substudy population, although patients with diabetes could be enrolled only with the LVSD criteria and were not required to have evidence of CHF, only a small minority of these patients did not have CHF signs and symptoms in the placebo and eplerenone arms (15 of 236 [6.4%] and 16 of 240 [6.7%], respectively).

### Baseline Levels and Evolution of Biomarkers in the Placebo Group

Baseline levels of the matrix biomarkers assessed in this study are summarized in Table 3. Baseline levels of all biomarkers were comparable between the placebo and eplerenone groups. Markers of collagen synthesis, including PINP and PIIINP, were all within reference limits at baseline, whereas TIMP-1 and ICTP were significantly elevated. Details of the plasma collagen biomarker patterns are shown in Figure 1. For all the analyzed biomarkers, important changes occurred early after AMI (baseline to the 1-month follow-up).

### Markers of Matrix Synthesis

With respect to markers of collagen synthesis, PINP levels increased significantly from baseline to month 1 ( $P < 0.0001$ ) and declined modestly thereafter. The overall profile was

similar for PIIINP but remained above baseline through month 9.

### Markers of Matrix Degradation

With regard to collagen degradation, levels of TIMP-1 were above reference values throughout the course of the study. They decreased significantly between baseline and month 1 ( $P < 0.0001$ ) and month 3 and did not change significantly thereafter.

At baseline, ICTP levels were significantly higher than reference levels. There was a sustained and statistically significant fall in ICTP levels from baseline to month 1 ( $P < 0.0001$ ) and subsequent stabilization at levels slightly lower ( $5.3 \pm 2.8$  ng/mL) than the upper reference value (5.6 ng/mL) through month 9.

### Relation of Biomarkers to Other Biomarkers of Increased Mortality Risk at Baseline

Baseline collagen biomarkers were correlated with one another and with BNP (Table 4). Nevertheless, PINP was associated only with PIIINP ( $r = 0.32$ ,  $P < 0.0001$ ), and TIMP-1 was not correlated with PINP. ICTP was positively and significantly associated with PIIINP ( $r = 0.40$ ,  $P < 0.0001$ ) and BNP ( $r = 0.32$ ,  $P < 0.0001$ ). All collagen biomarkers and

**Table 4. ECCM Biomarkers and Risk Factor Correlations at Baseline for All Patients With Biomarkers**

	PINP	PIIINP	ICTP	TIMP-1	BNP	hs-CRP	LVEF
<b>PINP</b>							
<i>r</i>	1.00	0.32	0.09	-0.01	-0.08	-0.21	0.06
<i>P</i>		<0.0001	0.056	0.76	0.084	<0.0001	0.24
<i>n</i>	461	461	461	461	456	414	461
<b>PIIINP</b>							
<i>r</i>	0.32	1.00	0.40	0.29	0.31	0.26	-0.12
<i>P</i>	<0.0001		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.011
<i>n</i>	461	462	462	462	457	414	462
<b>ICTP</b>							
<i>r</i>	0.09	0.40	1.00	0.25	0.32	0.21	-0.15
<i>P</i>	0.056	<0.0001		<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.002
<i>n</i>	461	462	462	462	457	414	462
<b>TIMP-1</b>							
<i>r</i>	-0.01	0.29	0.25	1.00	0.37	0.37	-0.16
<i>P</i>	0.76	<0.0001	<0.0001		<0.0001	<0.0001	0.0008
<i>n</i>	481	462	462	462	457	414	462
<b>BNP</b>							
<i>r</i>	-0.08	0.31	0.32	0.37	1.00	0.33	-0.24
<i>P</i>	0.084	<0.0001	<0.0001	<0.0001		<0.0001	<0.0001
<i>n</i>	456	457	457	457	458	414	458
<i>r</i>	-0.21	0.26	0.21	0.37	0.33	1.00	-0.10
<i>P</i>	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001		0.037
<i>n</i>	414	414	414	414	414	415	415
<b>LVEF</b>							
<i>r</i>	0.06	-0.12	-0.15	-0.16	-0.24	-0.10	1.00
<i>P</i>	0.24	0.01	0.002	0.0008	<0.0001	0.037	
<i>n</i>	461	462	462	462	458	415	476

hs-CRP indicates high-sensitivity C-reactive protein; LVEF, LV ejection fraction.

BNP were correlated positively with high-sensitivity C-reactive protein levels at baseline.

LV ejection fraction was associated with levels of all biomarkers but PINP at baseline, especially with BNP ( $r = -0.24$ ,  $P < 0.0001$ ).

### Prognostic Significance of Baseline Biomarker Levels

Fifty percent of outcomes were observed in patients with baseline values of BNP and ICTP above the median. The predictive value of baseline BNP and ICTP levels for the risks of all-cause death and composite end point cardiovascular death or HF hospitalization in the placebo group was examined with the Cox proportional-hazards model with medians as cutoffs. Results are presented in Figures 2 and 3.

Patients with both BNP and ICTP levels above the median displayed a significant increase in all-cause mortality with a hazard ratio (HR) of 2.49 ( $P = 0.039$ ) and in the composite end point of cardiovascular death or HF hospitalization with an HR of 3.03 ( $P = 0.002$ ).

Of note, PINP and PIIINP levels were not associated with any of the end points.

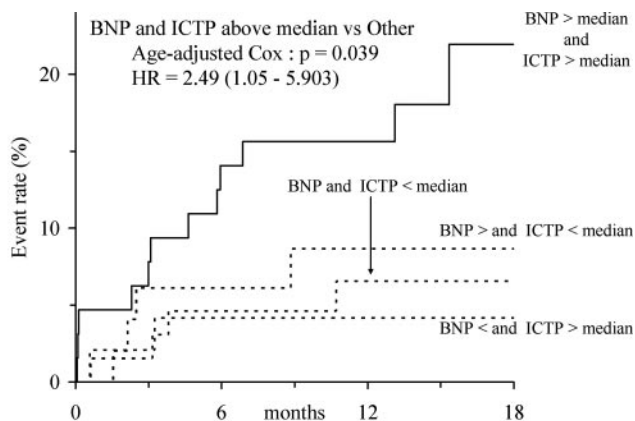
### Effects of Eplerenone

Details of the collagen biomarker patterns are shown in Figure 1.

The mean changes in PINP and PIIINP levels throughout the study period were significantly different between the placebo and eplerenone groups (overall  $P = 0.001$  and  $0.003$  for PINP and PIIINP, respectively). PINP levels increased significantly in the eplerenone group from baseline to month 1 ( $P < 0.0001$ ) and declined modestly thereafter. Levels of PINP and PIIINP were consistently lower in the eplerenone group, significantly so beginning at month 6 ( $P < 0.007$  at month 6 for both PINP and PIIINP;  $P < 0.0004$  and  $0.008$  at month 9 for PINP and PIIINP, respectively).

With regard to collagen degradation, levels of TIMP-1 were above reference values in the eplerenone group throughout the course of the study. They tended to decrease subsequently, but the decrease was not statistically significant. Levels at all time points did not differ statistically from levels in the placebo group.

Similar to levels in the placebo group, ICTP baseline levels in the eplerenone group were significantly higher than reference levels and declined subsequently. Levels at all time points did not differ between the 2 treatment groups.



**Figure 2.** Kaplan-Meier curves showing all-cause mortality in the placebo group.

Patients left at risk (event rate %)				
BNP/ICTP high	64 (0)	55 (14)	39 (16)	10 (22)
BNP high/ICTP low	49 (0)	46 (6)	26 (9)	6 (9)
BNP low/ICTP high	48 (0)	46 (4)	28 (4)	4 (4)
BNP low/ICTP low	65 (0)	62 (5)	37 (7)	9 (7)

**Discussion**

In the present study, we describe serial short-term and long-term changes in collagen biomarkers in patients after AMI complicated by HF and LVSD. We also show that at baseline, all collagen biomarkers correlated significantly with one another, BNP, and high-sensitivity C-reactive protein. Combination of both ICTP and BNP levels above median at baseline was a significant predictor of all-cause mortality and cardiovascular death or HF hospitalization in multivariable analyses.

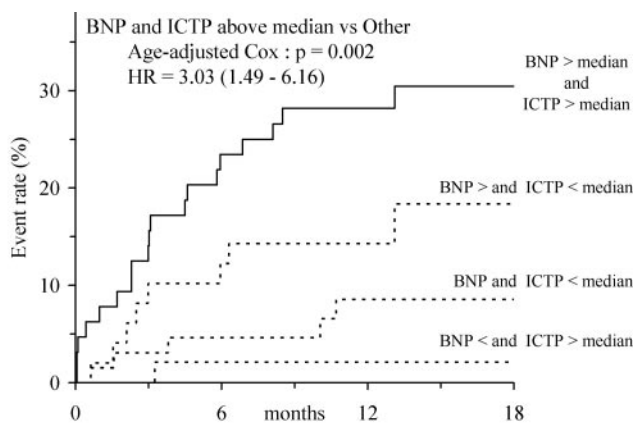
During follow-up, eplerenone significantly reduced PINP and PIIINP levels, with a significant reduction from month 6 to 9. ICTP and TIMP-1 biomarkers were not affected by eplerenone throughout the study period.

**Baseline Characteristics and Kinetics of Collagen Biomarkers**

Previous studies have shown that plasma levels of procollagen peptides and metalloproteinases can be used for monitoring cardiac collagen turnover.<sup>7</sup> Because PINP and PIIINP are released during collagen biosynthesis, it is possible to use them as biomarkers of collagen synthesis.<sup>8,9</sup> Baseline values

of those biomarkers of collagen synthesis among these patients (2.3 to 6.4 ng/mL for PIIINP; 22 to 87 ng/mL for PINP in men and 19 to 83 ng/mL in women) were consistent with values of PINP and PIIINP reported in a number of small AMI observational studies.<sup>10-16</sup> In studies with repeated assessments, synthesis biomarkers rose as early as day 1 after MI<sup>12</sup> and peaked between day 4 to 14.<sup>10-16</sup> They remained high for periods of up to 1 year.<sup>14</sup> Our results are supported by experimental work in which increases in types I and III procollagen mRNA in both infarcted and noninfarcted myocardium, followed by an increased collagen deposition, were reported as early as day 2 and peaked at day 14.<sup>17,18</sup>

Of note, our study enrolled only patients after AMI with LVSD and predominantly with HF. In addition, baseline values were not assessed in the very acute (first day) phase of AMI. Indeed, samples were taken at the randomization visit at an average of 8.5 days after AMI. Therefore, comparison of our results with those already reported should be made with caution. Interestingly, in chronic cardiac failure with established reductions in ejection fraction and LV chamber dilation, a substudy of the RALES trial,<sup>2</sup> PIIINP values were



**Figure 3.** Kaplan-Meier curves showing cardiovascular death or hospitalization for HF worsening in the placebo group.

Patients left at risk (event rate %)				
BNP/ICTP high	64 (0)	49 (23)	34 (28)	10 (30)
BNP high/ICTP low	49 (0)	43 (12)	23 (14)	6 (18)
BNP low/ICTP high	48 (0)	46 (2)	28 (2)	4 (2)
BNP low/ICTP low	65 (0)	61 (5)	35 (9)	9 (9)



comparable to those reported in the present EPHEBUS substudy population during long-term follow-up.

TIMP-1 levels were elevated above reference values in both the placebo and eplerenone groups throughout the course of the study. In the present study, because of limitations of blood sample volume, we did not assess the MMPs, compounding the interpretation of the TIMP-1 levels. MMP expression is known to increase in HF, and this increase usually exceeds the modest changes in levels of TIMP-1.<sup>19</sup> The findings in this trial are consistent with an increase in matrix synthesis but suggest that eplerenone does not act via suppression of the TIMP pathway and is therefore unlikely to adversely affect the quality of collagen during the process of remodeling. Future studies should directly assess MMP activity, especially MMP-2 and MMP-9, simultaneously with TIMP in post-AMI HF.

High baseline levels of ICTP of  $6.9 \pm 3.6$  ng/mL in post-AMI patients were previously associated with LV remodeling.<sup>20</sup> So far, no study has assessed the long-term kinetics of ICTP. In our study, ICTP levels were elevated at baseline and decreased significantly during the first month after AMI. However, ICTP levels remained higher than reference values during the 9-month follow-up period. High serum concentrations during the first month suggest increased degradation of the ECCM in the early phase after AMI. In HF resulting from dilated cardiomyopathy, high levels of ICTP at baseline have been reported, with levels up to a mean of  $7.6 \pm 3.6$  ng/mL.<sup>21</sup> Spinale<sup>19</sup> suggests that increased activity of MMP after infarction contributes to the remodeling process, which is consistent with a rise in the end product of PICP matrix degradation. The results of our study suggest that ICTP may be a marker of early post-AMI remodeling leading to LV dilation.

In some recent studies, ICTP levels were reported to increase in the 10 days after AMI,<sup>16,22</sup> but profiles beyond this timeframe were not reported. In our study, ICTP levels were elevated at baseline but declined in parallel after 30 days concomitantly with decreases in the levels of PINP and PIIINP, suggesting a relationship between these biomarkers. Interestingly, in studies of patients with chronic cardiac failure with established LVSD<sup>2,23</sup> and chronic ischemia,<sup>24</sup> collagen synthesis was the main issue because a rise in PIIINP and its association with outcome were the main findings, compared with patients with AMI and LVSD such as in the present study, in which geometric remodeling of the LV was in evolution and collagen degradation seems to play a larger role.

### Correlations Between Baseline Characteristics of ECCM Biomarkers

PINP was correlated only with PIIINP at baseline. This positive correlation between PINP and PIIINP levels implies a parallel or interrelated process for the synthesis and degradation of these biomarkers. Nevertheless, other associations between biomarkers according to our results underline the fact that the remodeling process consists of a continuous balance between various activators of ECCM collagen turnover.

### Prognostic Significance in the Placebo Group

In our study, basal values of ICTP and BNP above median were associated with increased risks of all-cause death and cardiovascular death or HF hospitalization. High levels of ICTP reflect an intense breakdown of cicatricial zonal collagen after AMI, resulting in an increased release of ICTP. With a loss of matricial support in this zone, the patient would be more exposed to cardiac risk of dilation or even to LV rupture. Furthermore, in the present study, BNP was correlated with all ECCM biomarkers (except PINP), including ICTP. This is consistent with the findings of previous studies.<sup>16,20</sup> Correlation between BNP and ICTP may suggest that this natriuretic peptide modulates collagen scar formation after AMI. Alternatively, the association between raised ICTP combined with raised BNP and adverse outcome may be explained by both biomarkers being covariates associated with a larger infarct extension, involving greater degradation of ECCM (hence high ICTP levels) and increased LV wall tension (thus an elevated BNP). Interestingly, the presence of high ICTP levels combined with low BNP levels at baseline (and reciprocally) was not associated with adverse outcomes, suggesting that a combination of increased ECCM degradation and myocyte stretch is critical to cardiovascular outcome and may be a potential differential therapeutic target.

The present study did not highlight any correlation between PIIINP and events. High basal values of PIIINP were correlated with cardiovascular mortality in CHF patients in the RALES study.<sup>2</sup> This may imply that PIIINP is a more accurate biomarker of long-term cardiovascular events in chronic conditions such as HF rather than early-phase events such as AMI.

### Effects of Eplerenone

Biomarkers of matrix synthesis were lower in the eplerenone than in the placebo group. PINP and PIIINP levels were consistently lower in the eplerenone group, significantly lower beginning at 6 months. Aldosterone has been shown to stimulate cardiac collagen synthesis and fibroblast proliferation via activation of local mineralocorticoid receptors. Aldosterone has been shown to promote cardiac fibrosis in experimental models<sup>25</sup> and in humans.<sup>26,27</sup> Eplerenone selectively blocks the mineralocorticoid receptor, thereby reversing these deleterious effects of aldosterone. In the RALES study of chronic cardiac failure with LVSD, high baseline serum levels of markers of cardiac fibrosis synthesis were significantly associated with poor outcome and decreased during spironolactone therapy. The benefit from spironolactone was associated with higher levels of collagen synthesis markers.<sup>2</sup> Tsutamoto et al<sup>28</sup> reported that 4 months of treatment with spironolactone improved LV volume and mass and decreased the plasma levels of BNP and PIIINP.

These results suggest that endogenous aldosterone has an important role in the process of LV remodeling in patients with CHF and that limitation of the excessive extracellular matrix turnover may be one of the various mechanisms contributing to the beneficial effect of spironolactone.

In patients with AMI, Hayashi et al<sup>29</sup> demonstrated that aldosterone was extracted through the infarct heart and that extracting aldosterone stimulated postinfarct LV remodeling.

They randomized 134 patients with first anterior AMI to receive potassium canrenoate (the active metabolite of spironolactone) in addition to an angiotensin-converting enzyme inhibitor or control treatment. LV ejection fraction was significantly improved and LV end-diastolic volume dilatation was significantly suppressed in the aldosterone antagonist group compared with the control group. Transcardiac extraction of aldosterone through the heart was significantly suppressed and the plasma PIIINP level was significantly lower in the aldosterone antagonist group. The authors suggest that aldosterone antagonist therapy, combined with angiotensin-converting enzyme inhibitor, can prevent postinfarct LV remodeling better than angiotensin-converting enzyme inhibitor alone, along with the suppression of a marker of collagen synthesis.<sup>29</sup>

Therefore, the results of our study with eplerenone are consistent with and extend the results of previous experimental and clinical observations with aldosterone antagonists in HF and after AMI and suggest that the effect of aldosterone receptor blockade on ECCM remodeling may contribute to the clinical benefits of this therapy.

### Study Limitations

The principal limitation of this study is that the substudy population differed from the main EPHEMUS study population with respect to baseline demographic and clinical characteristics, the timing of treatment initiation, and clinical outcomes. Therefore, extrapolating the results of this study to be reflective of EPHEMUS should be done cautiously.

Decisions to reduce the variables of measured BNP and ICTP to binary form and to create a combination of these 2 variables were not made before data analysis and were ad hoc choices. Therefore, the HR and probability values from the corresponding Cox model leading to Kaplan-Meier curves may be biased by these choices.

Additionally, the power of the time to event analyses was limited by the small number of outcomes. With 226 patients, the power to detect an HR of 1.25 per 1 SD varied from 24% (HF hospitalization) to 35% (combined end point). Furthermore, background therapies of the patients involved in the present study also were shown to affect collagen turnover. Therefore, the kinetic changes in ECCM serological markers we report are to be interpreted within this context. However, background therapy was similar in both groups, and, if any, changes related to eplerenone were observed beyond the effects of background therapy. In addition, we were unable to investigate the interaction between the effects of eplerenone on collagen biomarkers and its clinical benefit. Most likely, the results of this study provide a representation of matrix dynamics after AMI and of the effects of eplerenone. Of note, the effects of eplerenone on biomarkers in this study were broadly consistent with those observed with other aldosterone antagonists in other experimental and clinical studies. For logistical and analytical reasons, we did not assess serum levels of MMPs, which could have yielded a better understanding of changes in the degradation of ECCM. In our experience and as reported previously, the results of assessment of some MMPs may be influenced significantly by the duration of storage.<sup>30</sup>

### Conclusions

This is the first study describing long-term kinetics of ECCM collagen biomarkers in patients with AMI complicated by LV dysfunction and congestive HF. Changes in biomarkers of collagen synthesis and degradation suggest that ECCM remodeling is an active process in patients with CHF. Key biomarkers of matrix synthesis were lower in the eplerenone than the placebo group throughout the study, implying that treatment with eplerenone suppresses collagen turnover.

Furthermore, the associations of collagen biomarkers, BNP, and high-sensitivity C-reactive protein with each other and with determinants of disease severity indicate that AMI involves a complicated process of ECCM remodeling and myocyte stretch and inflammation.

High serum levels of ICTP, a marker of cardiac collagen degradation, and high serum levels of BNP were associated with poor outcomes, supporting the concept that increased ECCM degradation and increased LV wall tension result in progressive remodeling and a worsening of HF.

### Acknowledgment

Editorial support was provided by Kelly Burns of Parexel and funded by Pfizer, Inc.

### Source of Funding

The EPHEMUS study was funded by Pfizer, Inc.

### Disclosures

Drs Pitt and Zannad have received honoraria from and served on advisory boards for Pfizer Inc. Dr Vincent is an employee of Pfizer Inc. The other authors report no conflicts.

### References

- Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003;348:1309–1321.
- Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES). *Rales Investigators Circulation*. 2000;102:2700–2706.
- Quilliot D, Alla F, Bohme P, Bruntz JF, Hammadi M, Dousset B, Ziegler O, Zannad F. Myocardial collagen turnover in normotensive obese patients: relation to insulin resistance. *Int J Obes (Lond)*. 2005;29:1321–1328.
- Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev*. 1999;79:215–262.
- Jugdutt BI. Matrix metalloproteinases as markers of adverse remodeling after myocardial infarction. *J Card Fail*. 2006;12:73–76.
- Pitt B, Williams G, Remme W, Martinez F, Lopez-Sendon J, Zannad F, Neaton J, Roniker B, Hurley S, Burns D, Bittman R, Kleiman J. The EPHEMUS trial: eplerenone in patients with heart failure due to systolic dysfunction complicating acute myocardial infarction: Eplerenone Post-AMI Heart Failure Efficacy and Survival Study. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2001;15:79–87.
- Weber KT. Monitoring tissue repair and fibrosis from a distance. *Circulation*. 1997;96:2488–2492.
- Querejeta R, Varo N, Lopez B, Larman M, Artinano E, Etayo JC, Martinez Ubago JL, Gutierrez-Stampa M, Emparanza JI, Gil MJ, Monreal I, Mindan JP, Diez J. Serum carboxy-terminal propeptide of procollagen type I is a marker of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease. *Circulation*. 2000;101:1729–1735.
- Jensen LT, Horslev-Petersen K, Toft P, Bentsen KD, Grande P, Simonsen EE, Lorenzen I. Serum aminoterminal type III procollagen peptide reflects repair after acute myocardial infarction. *Circulation*. 1990;81:52–57.

10. Uusimaa P, Risteli J, Niemela M, Lumme J, Ikaheimo M, Jounela A, Peuhkurinen K. Collagen scar formation after acute myocardial infarction: relationships to infarct size, left ventricular function, and coronary artery patency. *Circulation*. 1997;96:2565–2572.
11. Poulsen SH, Host NB, Jensen SE, Egstrup K. Relationship between serum amino-terminal propeptide of type III procollagen and changes of left ventricular function after acute myocardial infarction. *Circulation*. 2000;101:1527–1532.
12. Host NB, Jensen LT, Bendixen PM, Jensen SE, Koldkjaer OG, Simonsen EE. The aminoterminal propeptide of type III procollagen provides new information on prognosis after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1995;76:869–873.
13. Takino T, Nakamura M, Hiramori K. Circulating levels of carboxy-terminal propeptide of type I procollagen and left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Cardiology*. 1999;91:81–86.
14. Poulsen SH, Host NB, Egstrup K. Long-term changes in collagen formation expressed by serum carboxyterminal propeptide of type-I procollagen and relation to left ventricular function after acute myocardial infarction. *Cardiology*. 2001;96:45–50.
15. Radovan J, Vaclav P, Petr W, Jan C, Michal A, Richard P, Martina P. Changes of collagen metabolism predict the left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Mol Cell Biochem*. 2006;293:71–78.
16. Magga J, Puhakka M, Hietakorpi S, Punnonen K, Uusimaa P, Risteli J, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Peuhkurinen K. Atrial natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide, and serum collagen markers after acute myocardial infarction. *J Appl Physiol*. 2004;96:1306–1311.
17. Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27:1281–1292.
18. Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, Daemen MJ. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol*. 1995;147:325–338.
19. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res*. 2002;90:520–530.
20. Cerisano G, Pucci PD, Sulla A, Tommasi M, Raspanti S, Santoro GM, Antonucci D. Relation between plasma brain natriuretic peptide, serum indexes of collagen type I turnover, and left ventricular remodeling after reperfused acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2007;99:651–656.
21. Schwartzkopff B, Fassbach M, Pelzer B, Brehm M, Strauer BE. Elevated serum markers of collagen degradation in patients with mild to moderate dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*. 2002;4:439–434.
22. Murakami T, Kusachi S, Murakami M, Sano I, Uesugi T, Hiramori R, Kajiyama A, Kondo J, Tsuji T. Time-dependent changes of serum carboxy-terminal peptide of type I procollagen and carboxy-terminal telopeptide of type I collagen concentrations in patients with acute myocardial infarction after successful reperfusion: correlation with left ventricular volume indices. *Clin Chem*. 1998;44:2453–2461.
23. Radauceanu A, Ducki C, Virion JM, Rossignol P, Mallat Z, McMurray J, Van Veldhuisen DJ, Tavazzi L, Mann DL, Capiumont-Vin J, Li M, Hanriot D, Zannad F. Extracellular matrix turnover and inflammatory markers independently predict functional status and outcome in chronic heart failure. *J Card Fail*. 2008;14:467–474.
24. Radauceanu A, Moulin F, Djaballah W, Marie PY, Alla F, Dousset B, Virion JM, Capiumont J, Karcher G, Aliot E, Zannad F. Residual stress ischaemia is associated with blood markers of myocardial structural remodelling. *Eur J Heart Fail*. 2007;9:370–376.
25. Fullerton MJ, Funder JW. Aldosterone and cardiac fibrosis: in vitro studies. *Cardiovasc Res*. 1994;28:1863–1867.
26. Weber KT. Aldosterone and spironolactone in heart failure. *N Engl J Med*. 1999;341:753–755.
27. MacFadyen RJ, Barr CS, Struthers AD. Aldosterone blockade reduces vascular collagen turnover, improves heart rate variability and reduces early morning rise in heart rate in heart failure patients. *Cardiovasc Res*. 1997;35:30–34.
28. Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Mabuchi N, Hayashi M, Tsutsui T, Ohnishi M, Sawaki M, Fujii M, Matsumoto T, Matsui T, Kinoshita M. Effect of spironolactone on plasma brain natriuretic peptide and left ventricular remodeling in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37:1228–1233.
29. Hayashi M, Tsutamoto T, Wada A, Tsutsui T, Ishii C, Ohno K, Fujii M, Taniguchi A, Hamatani T, Nozato Y, Kataoka K, Morigami N, Ohnishi M, Kinoshita M, Horie M. Immediate administration of mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone prevents post-infarct left ventricular remodeling associated with suppression of a marker of myocardial collagen synthesis in patients with first anterior acute myocardial infarction. *Circulation*. 2003;107:2559–2565.
30. Rouy D, Ernens I, Jeanty C, Wagner DR. Plasma storage at –80 degrees C does not protect matrix metalloproteinase-9 from degradation. *Anal Biochem*. 2005;338:294–298.

### CLINICAL PERSPECTIVE

In the present substudy of the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHEBUS), we evaluated serum levels of selected biomarkers of extracellular cardiac matrix turnover in 476 patients. In the main EPHEBUS, the aldosterone antagonist eplerenone plus standard of care was found to be superior to standard of care plus placebo in preventing cardiovascular outcomes in patients with left ventricular dysfunction and heart failure after an acute myocardial infarction. We describe the short- and long-term dynamic processes of collagen turnover from the changes reported in serological markers of type I and III collagen synthesis and degradation and their association with biomarkers of ventricular stress and inflammation (serum brain natriuretic peptide and high-sensitivity C-reactive protein). High serum levels of type I collagen telopeptide, a marker of cardiac collagen degradation, and high serum levels of brain natriuretic peptide were associated with poor outcomes. Eplerenone interfered mainly with serum levels of aminoterminal propeptide for type III collagen by blunting its 1-month rise after acute myocardial infarction. The findings of the present study may have several clinical implications, especially concerning stratification of risk in patients with post-myocardial infarction heart failure, and provide insights into the mechanisms of the beneficial effects of aldosterone antagonist therapy in such patients.

## **4.2. RESULTATS DE L'ÉTUDE CARE-HF**

Iraqi W, Rossignol p, Fay R, et al. Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with moderate and severe heart failure due to left ventricular systolic dysfunction complicated by cardiac dyssynchrony: Insights from the CARE-HF study. Article submitted in JACC (246).



**EXTRACELLULAR CARDIAC MATRIX BIOMARKERS IN PATIENTS WITH MODERATE AND SEVERE HEART FAILURE DUE TO LEFT VENTRICULAR SYSTOLIC DYSFUNCTION COMPLICATED BY CARDIAC DYSSYNCHRONY: INSIGHTS FROM THE CARE-HF (CARDIAC RESYNCHRONIZATION IN HEART FAILURE) TRIAL**

**Wafae IRAQI PharmD <sup>\*, †, ‡, §</sup>, Patrick Rossignol MD, PhD <sup>\*, †, ‡, §</sup>, Renaud Fay PharmD <sup>\*, †, ‡</sup>, Josette Nuée PhD <sup>\*, †, ‡, §</sup>, Jean-Claude Daubert MD <sup>||</sup>, Monique Marijjanowski PhD <sup>¶</sup>, Luigi Tavazzi MD <sup>#</sup> John Cleland MD <sup>\*\*</sup>, and Faiez Zannad MD, PhD <sup>\*, †, ‡, §, ††</sup>**

\* CHU de Nancy, Hôpital Jeanne d'Arc, Dommartin-lès-Toul, France

† Inserm, Centre d'Investigation Clinique de Nancy CIC-P 9501, Dommartin-lès-Toul, France

‡ Nancy-Université, Faculté de Médecine, Vandoeuvre-les-Nancy, France

§ Inserm U684/961, Nancy Université, Nancy, France

|| Département de Cardiologie, Hôpital Pontchaillou, Rennes, France

¶ Medtronic Bakken Research Center B.V., Maastricht, the Netherlands

# . Department of Cardiology, Policlinico S Matteo, Pavia, Italy

\*\* Department of Cardiology, University of Hull, Kingston upon Hull, UK

†† Department of Cardiology, Heart Failure and Hypertension Unit, CHU Nancy, France

***Adress for correspondence***

Faiez Zannad

CIC Inserm-CHU Hôpital Jeanne d'Arc

54200 Dommartin les Toul

Phone +33 383 65 66 25

Fax +33 383 65 66 19

[f.zannad@chu-nancy.fr](mailto:f.zannad@chu-nancy.fr)

The CARE-HF study was funded by Medtronic. The present sub-study has been funded in part by Medtronic and by the CHU of Nancy

Drs. Cleland, Tavazzi, and Zannad received from Medtronic a research grant, speakers' honoraria, and payment for serving on the advisory committee. Monique Marijjanowski is an employee of Medtronic.

## ABSTRACT

**Objectives**— We hypothesized that the degree of cardiac fibrosis, as assessed by extracellular cardiac matrix biomarkers may influence the severity of cardiac dyssynchrony and therefore predict the response to medical treatment including cardiac resynchronization therapy (CRT).

**Background**— Circulating biomarkers of collagen turnover may provide a tool for the assessment of cardiac remodeling in patients with heart failure. The influence of CRT on such biomarkers has not been investigated in a randomized study.

**Methods**— Serial measurements of serum levels of collagen biomarkers were measured in 260 patients enrolled in the CARE-HF (Cardiac Resynchronization in Heart Failure) trial. The response to CRT was defined as hospitalization free-survival, increase in left ventricular ejection fraction or decrease in aminoterminal pro-brain natriuretic peptide (NT-ProBNP) beyond a predefined level.

**Results**— Baseline serum concentrations of the aminoterminal propeptide of Type III procollagen (PIIINP) were strongly associated with long-term mortality independent of NT-ProBNP. The risk for all-cause death increased by 12 % ( $p=0.013$ ) with each increment of 2 ng/ml in PIIINP. Serum PIIINP was similar in patients assigned to CRT or control during follow-up. Neither NT-ProBNP nor any collagen biomarkers predicted the response to CRT.

**Conclusions**— Serum biomarkers of collagen synthesis, such as PIIINP, are associated with a poor long term outcome but do not predict the response to CRT. Furthermore, despite improving cardiac function, ventricular volumes and prognosis, CRT does not alter PIIINP.

**Keywords**— dyssynchrony, heart failure, extracellular matrix, collagen biomarkers, cardiac resynchronisation therapy

## **ABBREVIATIONS AND ACRONYMS**

CARE-HF: Cardiac Resynchronization in Heart Failure

CRT: cardiac resynchronisation therapy

ECCM: extracellular cardiac matrix

HF: heart failure

ICTP: type I collagen telopeptide

LVEF: left ventricular ejection fraction

NT-ProBNP: aminoterminal pro-brain natriuretic peptide

PINP: aminoterminal propeptide of Type I procollagen

PIIINP: aminoterminal propeptide of Type III procollagen

RALES: Randomized ALdactone Evaluation Study

## INTRODUCTION

In patients with heart failure who have a dilated left ventricle with a reduced ejection fraction, a prolonged QRS and who remain in sinus rhythm, cardiac resynchronisation therapy has consistently been shown to exert striking effects on cardiac function and structure that are associated with a substantial improvement in symptoms and reduction in morbidity and mortality (1-7). It is logical to expect such cardiac remodelling to be associated with increased turnover in extra-cellular cardiac matrix (ECCM) proteins and perhaps a reduction in myocardial collagen content. However, changes in ECCM cannot currently be assessed by imaging techniques.

Circulating biomarkers of collagen turnover may provide a simple tool to reliably assess this ECCM turnover (8-11).

In patients with cardiac dyssynchrony, intra- or interventricular conduction delays could be related to cardiac tissue electrical and structural heterogeneity due to cardiac fibrosis (12-16). We hypothesized that the degree of cardiac fibrosis, as assessed by ECCM biomarkers may influence the severity of cardiac dyssynchrony and therefore predict the response to CRT. In a subgroup of patients in the CARE-HF trial, we examined the kinetics of synthesis and degradation of ECCM markers, the effects of CRT on these markers and whether they could predict the response to CRT.

## METHODS

### *Study design*

The design and main results of the CARE-HF trial have been reported (1,2,17).

This analysis was conducted in 260 patients participating in the CARE-HF trial that enrolled patients who had a history of HF for at least 6 weeks, were in New York Heart Association functional class III or IV at the time of enrolment, with a left ventricular ejection fraction  $\leq 35\%$  and markers of cardiac dyssynchrony (as indicated by QRS width  $\geq 150$  ms or echocardiographic dyssynchrony if QRS was 120-149 msec). All patients received standard pharmacologic therapy including angiotensin converting-enzyme inhibitors, beta-blockers and diuretics. Patients were randomly assigned to treatment by pharmacological therapy alone or with the addition of CRT.

### **Blood sampling**

Blood samples were drawn at baseline, 3 and 18 months. All samples were stored at -80°C until assay. They were shipped to a central laboratory and assayed in 2 batches. A minimum of two samples were available per patient: one at baseline and one at follow up.

### **Laboratory Analysis**

Commercial radioimmunoassays (Orion Diagnostica, Espoo, Finland) were used to measure the following collagen biomarkers: aminoterminal propeptides of Type I and III procollagens (PINP and PIIINP) which are markers of collagen synthesis; and the type I collagen telopeptide (ICTP), marker of degradation. All assays were performed by technicians blinded to clinical data and subject randomization. Assays characteristics were previously described in detail (18).

### **Statistical analysis**

All analyses were performed using SAS R9.1.3 software (SAS Institute, Cary, NC, USA). The two-tailed significance level was set to 0.05. Groups were compared using Chi-Square test for discrete variables, and Mann-Whitney's test for continuous ones. Correlation analyses were carried out using Spearman's test. Continuous variable were described by medians and interquartile range.

Treatment efficacy was assessed in both groups using 3 criteria: 18-month survival without unplanned hospitalisation for progressive HF; an improvement of left ventricular ejection fraction (LVEF) by  $\geq 3\%$  at 3 months; a reduction of aminoterminal pro-brain natriuretic peptide (NT-ProBNP) levels by  $\geq 30\%$  of baseline value at 3 months. The thresholds for LVEF and NT-ProBNP were selected from their medians into the CRT group; the 3-month timepoint was fixed in order to minimize the selection bias (18-month survivors would be the healthiest patients). The analyses were carried using multivariable logistic regression with randomisation group, age, ECCM biomarkers and NT-ProBNP as potential cofactors with interactive backward selection method. No significant pairwise interaction was found.

## **RESULTS**

**Baseline Characteristics**

Of the 260 patients included in the study, 128 were assigned to the control group and 132 to CRT. Patients' baseline characteristics and outcomes are summarized in Tables 1 and 2.

**Baseline levels of ECCM turnover markers, kinetics and effects of CRT**

There was no difference in median baseline levels between control and CRT groups. At 3 months, PINP had risen in the CRT group ( $p=0.049$ ) but all other analyses failed to identify significant differences in serum ECCM biomarkers in patients assigned to CRT or control at any time (Figures 1 to 4).

Concentrations of NT-ProBNP decreased over the first 3 months in both control and CRT groups. Further reduction were observed by 18 months in patients assigned to CRT whereas levels stabilized in control group resulting in a significant difference between groups at 18 months ( $p = 0.002$ ).

**Relation of biomarkers to other measures of remodelling**

At baseline, PINP and PIIINP were correlated with ICTP ( $r=0.28$   $p < 0.0001$  and  $0.26$   $p < 0.0001$  respectively) (Table 3). NT-ProBNP was positively correlated with PINP, PIIINP and ICTP ( $r = 0.15$   $p = 0.021$ ;  $0.21$  and  $0.36$ ; both  $p < 0.0001$ ). PIIINP and ICTP were negatively correlated with estimated glomerular filtration rate. NT-ProBNP was negatively correlated with LVEF ( $r = - 0.40$ ;  $p < 0.0001$ ) but ECCM biomarkers were not correlated with LVEF or QRS duration.

**Biomarkers as potential predictors of outcome**

Only PIIINP and NT-ProBNP were associated with the outcome criterion based on survival without unscheduled hospitalisation for worsening of HF at month 18. Each increment of 2 ng/ml of PIIINP and 500 pg/ml of NT-ProBNP were associated with respectively a 12 % [95% CI 0.78-0.99 ( $p = 0.037$ )] and a 6 % [95% CI 0.91-0.98 ( $p = 0.003$ )] decrease of survival without unscheduled hospitalisation for worsening of HF at month 18.

**Biomarkers as potential predictors of response to CRT**

There was no interaction between PIIINP, NT-ProBNP (ie biomarkers independently associated with the above-mentioned survival criterion) and the benefits of CRT (Table 4). Thus, the analyses in each treatment group were not performed.

The other response criteria (ie LVEF 3 % increase and a 30 % decrease in NT-ProBNP levels at month 3) were not associated to any of the baseline biomarkers.

## **DISCUSSION**

Treatment by CRT did not lead to significant changes in blood levels of ECCM biomarkers at any of the long term follow-up timepoints. NT-ProBNP levels showed a significant decrease in the CRT group at month 18 compared to control group.

Baseline PIIINP levels were associated to a higher risk of all-cause death, independently from NT-ProBNP levels. By defining various response criteria to CRT, none of the collagen biomarkers or NT-ProBNP at baseline were associated to the response to CRT.

### ***Baseline levels of ECCM turnover markers and effects of CRT***

Since PINP and PIIINP are released during collagen biosynthesis, it is possible to use them as biomarkers of collagen synthesis (18-20)-(21). PIIINP baseline values in control and CRT groups were comparable to those reported among patients with CHF of RALES (Randomized ALdactone Evaluation Study) (9) and RECOVER (Research into Etanercept: CytOkine antagonism in VEntriculaR dysfunction) trials (22).

Baseline levels of PINP in our study are lower than those reported in the RALES study (9): This might be due to PINP less specificity in the myocardium compared to PIIINP, which implies that variation in this propeptide levels could be caused by other factors independently from cardiac function.

Baseline levels of ICTP were not analysed in the RALES and RECOVER (Research into Etanercept: CytOkine antagonism in VEntriculaR dysfunction) studies (9,22).

In contrast with no influence of CRT on ECCM biomarkers, a significant difference in NT-ProBNP levels between CRT and control group was observed at month 18 in the present study,

confirming the results of a previous study on CARE-HF patients (23) showing that CRT had an early and continuous effect of reducing NT-ProBNP levels.

***Relation of ECCM biomarker levels to other remodelling parameters:***

Collagen turnover biomarkers were reported to be associated with various measures of the severity of heart failure (24). In our study, collagen synthesis biomarkers were correlated with ICTP at baseline underlining that the remodelling process consists of a continuous balance between ECCM collagen turnover actors. NT-ProBNP baseline levels were correlated to those of PINP, PIIINP and ICTP which suggests that LV dysfunction involves myocardial and ECCM remodelling concomitantly and interactively (25,26).

There was no significant correlation between baseline collagen biomarkers or NT-ProBNP levels and QRS interval. On the other hand, QRS duration as well as NT-ProBNP were both strongly associated with LVEF. Thus the hypothesis that a widening of the QRS interval could result from electrical conduction heterogeneity associated to tissue heterogeneity produced by cardiac fibrosis cannot be confirmed according to our results. Cardiac fibrosis as assessed by collagen biomarkers may not be a major contributor to intracardiac conduction delays and LV dyssynchrony.

***Relation of ECCM biomarker levels to outcome:***

Our results confirmed the prognostic potential of PIIINP on outcomes as reported previously in several HF populations (3,17) suggesting that excessive turnover of the ECCM is associated with poor prognosis.

PIIINP provided additional information on outcomes, independently from other classical strong predictors such as NT-ProBNP (27), suggesting that cardiac fibrotic remodelling could depict a local expression of systemic neurohormonal activation. Collagen deposit could affect functional cardiac ability in various ways: by worsening heart pumping capacity of which fibrosis is one of the major determinants, or by providing a structural substrate to arrhythmogenicity, contributing consequently in HF progress and sudden death.



***Kinetics of biomarkers during the 18 months follow-up and lack of effect of CRT:***

Collagen biomarkers levels didn't change significantly during the 18-month follow-up and considering the isolated nature of the significant difference observed at month 3 for PINP, the possibility that it may have happened accidentally cannot be dismissed. Consistently, in the RALES study, with mainly NYHA class III low ejection fraction patients, PIIINP levels were stable and PINP levels increased in the placebo group. However, in patients treated with spironolactone, PIIINP and PINP levels decreased significantly from screening to 6-month follow-up indicating that blocking mineralocorticoid receptors may influence ECCM remodelling. In contrast, the results of the present study suggest that CRT does not influence ECCM remodelling, which could be detected by the assessment of ECCM biomarkers and at least in this study population with low EF and wide QRS.

Our results are consistent with those reported recently in observational studies in patients with congestive HF whose ICTP levels did not change upon CRT (14,28).

***Biomarkers as predictors of response to treatment by CRT:***

Very few studies used ECCM collagen biomarkers as potential predictive criterion of response to CRT in HF patients. Furthermore, definitions of responders/non responders vary from a study to another.

In the present study, despite the selection of 3 response criteria, based either on hospitalisation-free survival at month 18, or on an intermediate response of functional improvement at month 3 (LVEF increase and NT-ProBNP levels decrease), we did not observe that any of the collagen biomarkers or the NT-ProBNP could predict the response to CRT. Two previous studies (14,28) analysed the influence of collagen turnover on the long-term response to CRT in HF patients through PICP (carboxyterminal propeptide of procollagen type I) : ICTP ratio (14) or PINP, PIIINP and ICTP levels (28). In one of them, responders after 12 months follow-up improved their 6 minutes distance walk-test of more than 10 % whereas non responders either haven't improved the walk test or died for cardiac reasons (14). The other study (28) considered as responders patients showing over 10 % reduction in left ventricular end-diastolic volume 6 months after the onset of

CRT. Conflicting patterns were reported from these studies with higher PICP: ICTP ratio at baseline and a decrease in the one-year follow-up in responders in the one hand (14) and lower PINP level at baseline with an increased synthesis rate in the 6-months follow-up in responders in the other hand (28).

However, major limitations must be brought to the methodology and the extrapolation of these studies findings. Aside from the fact that a small number of patients (73 and 64) were included, these studies were designed without a control group. The authors thus do not take into account the natural evolution of the disease, the influence of other HF treatments and many potential confounding factors. In the absence of a control group, these benefits cannot be solely reported as an effect of CRT.

### ***Limitations of the present study***

The principal limitation of this study is that the global population from the CARE-HF study comprised patients with large QRS interval and/or with dyssynchrony. Notably, the lack of association between ECCM biomarker levels and QRS duration may have been biased because only patients with large QRS were included. A population with a full range of QRS duration, including normal and large QRS may be more appropriate for testing the hypothesis of a relationship between QRS duration and the degree of fibrosis.

### ***Conclusions***

This is the first study describing long-term kinetics of ECCM collagen biomarkers in patients with moderate and severe HF due to LV systolic dysfunction complicated by cardiac dyssynchrony treated by CRT. CRT did not influence cardiac extracellular matrix turnover. None of the tested collagen biomarkers or NT-ProBNP appeared to be predictors of response to CRT. Therefore, despite being associated to poor outcomes, cardiac fibrosis and ECCM remodeling do not seem to be associated with other indices of ECCM remodeling neither to QRS duration, suggesting that cardiac fibrosis is not a major determinant of cardiac dyssynchrony.

## REFERENCES

1. Cleland JG, Daubert JC, Erdmann E, et al. The effect of cardiac resynchronization on morbidity and mortality in heart failure. *N Engl J Med* 2005;352:1539-49.
2. Cleland JG, Daubert JC, Erdmann E, et al. Longer-term effects of cardiac resynchronization therapy on mortality in heart failure [the CArdiac REsynchronization-Heart Failure (CARE-HF) trial extension phase]. *Eur Heart J* 2006;27:1928-32.
3. Bristow MR, Saxon LA, Boehmer J, et al. Cardiac-resynchronization therapy with or without an implantable defibrillator in advanced chronic heart failure. *N Engl J Med* 2004;350:2140-50.
4. Abraham WT, Fisher WG, Smith AL, et al. Cardiac resynchronization in chronic heart failure. *N Engl J Med* 2002;346:1845-53.
5. Rivero-Ayerza M, Theuns DA, Garcia-Garcia HM, Boersma E, Simoons M, Jordaens LJ. Effects of cardiac resynchronization therapy on overall mortality and mode of death: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur Heart J* 2006;27:2682-8.
6. Cleland JG, Coletta AP, Clark AL, Cullington D. Clinical trials update from the American College of Cardiology 2009: ADMIRE-HF, PRIMA, STICH, REVERSE, IRIS, partial ventricular support, FIX-HF-5, vagal stimulation, REVIVAL-3, pre-RELAX-AHF, ACTIVE-A, HF-ACTION, JUPITER, AURORA, and OMEGA. *Eur J Heart Fail* 2009;11:622-30.
7. Linde C, Abraham WT, Gold MR, St John Sutton M, Ghio S, Daubert C. Randomized trial of cardiac resynchronization in mildly symptomatic heart failure patients and in asymptomatic patients with left ventricular dysfunction and previous heart failure symptoms. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1834-43.
8. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 1999;79:215-62.
9. Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation* 2000;102:2700-6.
10. Alla F, Kearney-Schwartz A, Radauceanu A, Das Dores S, Dousset B, Zannad F. Early changes in serum markers of cardiac extra-cellular matrix turnover in patients with uncomplicated hypertension and type II diabetes. *Eur J Heart Fail* 2006;8:147-53.
11. Quilliot D, Alla F, Bohme P, et al. Myocardial collagen turnover in normotensive obese patients: relation to insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* 2005;29:1321-8.
12. D'Ascia C, Cittadini A, Monti MG, Riccio G, Sacca L. Effects of biventricular pacing on interstitial remodelling, tumor necrosis factor-alpha expression, and apoptotic death in failing human myocardium. *Eur Heart J* 2006;27:201-6.
13. Duncan A, Wait D, Gibson D, Daubert JC. Left ventricular remodelling and haemodynamic effects of multisite biventricular pacing in patients with left ventricular systolic dysfunction and activation disturbances in sinus rhythm: sub-study of the MUSTIC (Multisite Stimulation in Cardiomyopathies) trial. *Eur Heart J* 2003;24:430-41.
14. Garcia-Bolao I, Lopez B, Macias A, Gavira JJ, Azcarate P, Diez J. Impact of collagen type I turnover on the long-term response to cardiac resynchronization therapy. *Eur Heart J* 2008;29:898-906.
15. Sogaard P, Egeblad H, Kim WY, et al. Tissue Doppler imaging predicts improved systolic performance and reversed left ventricular remodeling during long-term cardiac resynchronization therapy. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:723-30.

16. **Thambo JB, Bordachar P, Garrigue S, et al. Detrimental ventricular remodeling in patients with congenital complete heart block and chronic right ventricular apical pacing. *Circulation* 2004;110:3766-72.**
17. **Cleland JG, Daubert JC, Erdmann E, et al. The CARE-HF study (CArdiac RESynchronisation in Heart Failure study): rationale, design and end-points. *Eur J Heart Fail* 2001;3:481-9.**
18. **Iraqi W, Rossignol P, Angioi M, et al. Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with acute myocardial infarction complicated by left ventricular dysfunction and heart failure: insights from the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) study. *Circulation* 2009;119:2471-9.**
19. **Querejeta R, Varo N, Lopez B, et al. Serum carboxy-terminal propeptide of procollagen type I is a marker of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease. *Circulation* 2000;101:1729-35.**
20. **Jensen LT, Horslev-Petersen K, Toft P, et al. Serum aminoterminal type III procollagen peptide reflects repair after acute myocardial infarction. *Circulation* 1990;81:52-7.**
21. **Sun Y, Weber KT. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res* 2000;46:250-6.**
22. **Radauceanu A, Ducki C, Virion JM, et al. Extracellular matrix turnover and inflammatory markers independently predict functional status and outcome in chronic heart failure. *J Card Fail* 2008;14:467-74.**
23. **Fruhwald FM, Fahrleitner-Pammer A, Berger R, et al. Early and sustained effects of cardiac resynchronization therapy on N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in patients with moderate to severe heart failure and cardiac dyssynchrony. *Eur Heart J* 2007;28:1592-7.**
24. **Anavekar NS, McMurray JJ, Velazquez EJ, et al. Relation between renal dysfunction and cardiovascular outcomes after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2004;351:1285-95.**
25. **Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, et al. Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and adrenomedullin: new neurohormonal predictors of left ventricular function and prognosis after myocardial infarction. *Circulation* 1998;97:1921-9.**
26. **Magga J, Puhakka M, Hietakorpi S, et al. Atrial natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide, and serum collagen markers after acute myocardial infarction. *J Appl Physiol* 2004;96:1306-11.**
27. **Richardson M, Freemantle N, Calvert MJ, Cleland JG, Tavazzi L. Predictors and treatment response with cardiac resynchronization therapy in patients with heart failure characterized by dyssynchrony: a pre-defined analysis from the CARE-HF trial. *Eur Heart J* 2007;28:1827-34.**
28. **Umar S, Bax JJ, Klok M, et al. Myocardial collagen metabolism in failing hearts before and during cardiac resynchronization therapy. *Eur J Heart Fail* 2008;10:878-83.**
29. **Levey AS, Coresh J, Balk E, et al. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med* 2003;139:137-47.**

**Legend Figures 1 to 4**



CRT group



Control group

Error bars

InterQuartile Range

Figure 1. Serum levels of PIIINP kinetics during the 18-months follow-up

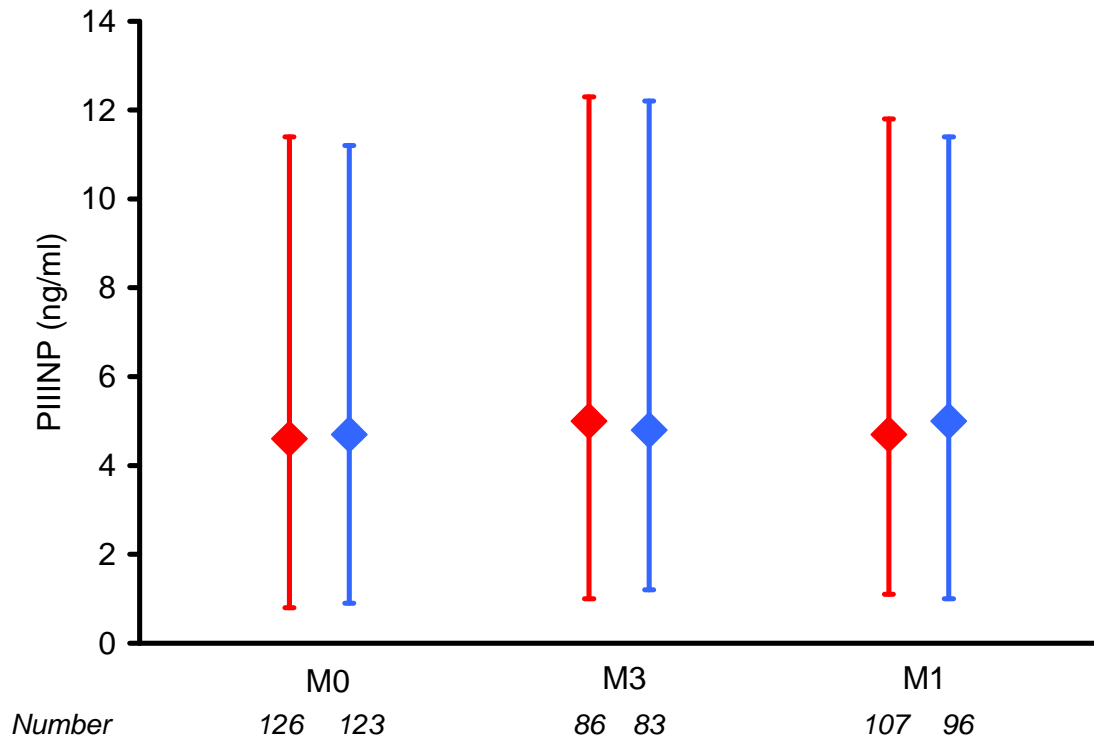


Figure 2. Serum levels of PINP kinetics during the 18-months follow-up

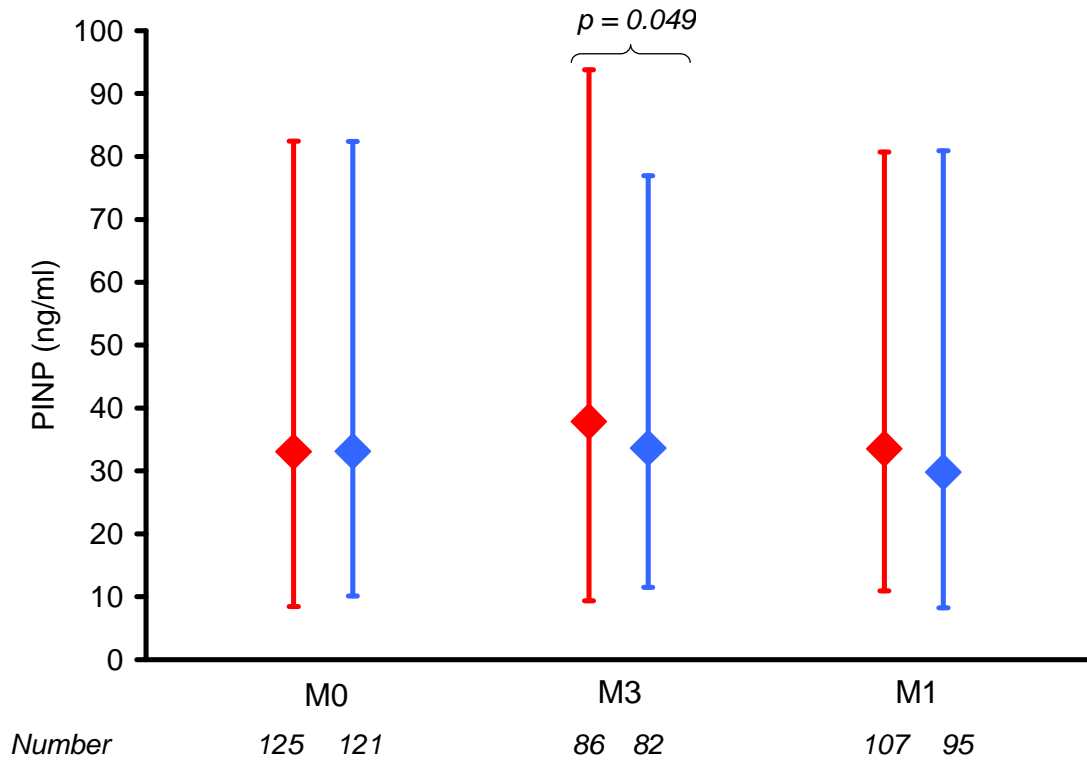


Figure 3. Serum levels of ICTP kinetics during the 18-months follow-up

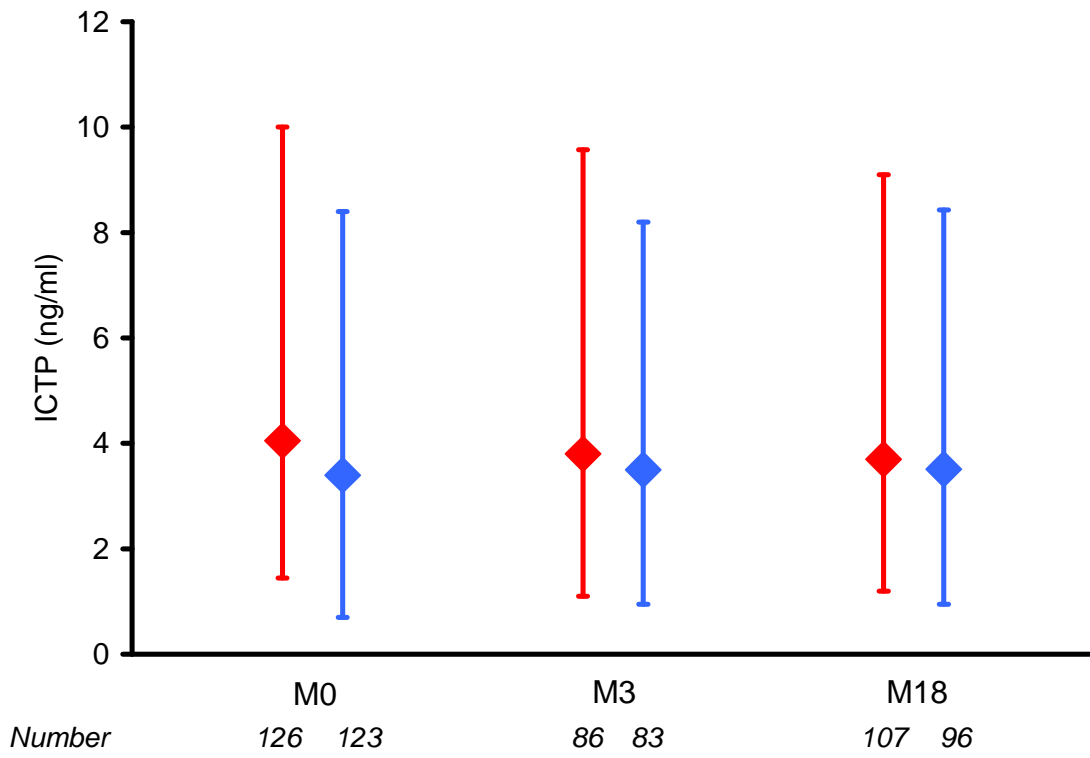
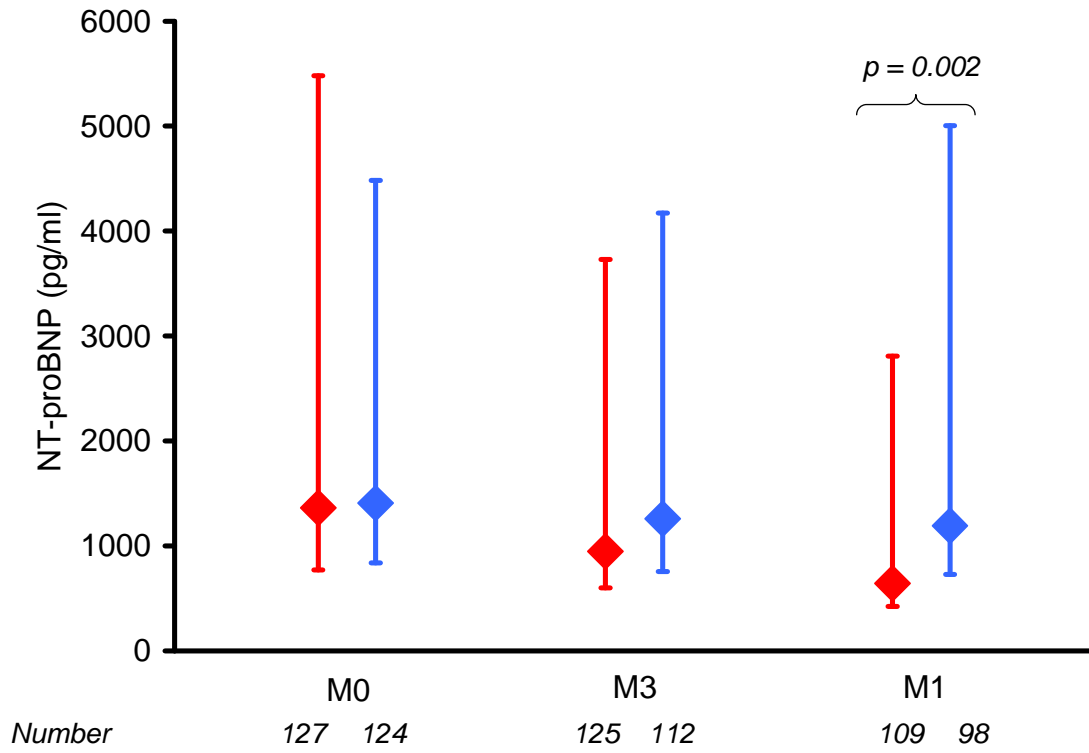




Figure 4. Serum levels of NT-ProBNP kinetics during the 18-months follow-up



**TABLE 1. Baseline characteristics in patients with available biomarkers**

Characteristics	Control group*		CRT group*	
	n		n	
Age (years)	128	67 (59-72)	132	66 (59-71)
Male gender	128	96 (75%)	132	90 (68%)
NYHA class IV	128	8 (6%)	132	6 (5%)
Primary cause of heart failure:				
<i>Dilated cardiomyopathy</i>		60 (47%)		58 (44%)
<i>Ischemic heart disease</i>	128	48 (38%)	132	53 (40%)
<i>Heart disease of other causes</i>		20 (16%)		21 (16%)
Heart rate (bpm)	125	70 (61-77)	130	69 (59-81)
Systolic blood pressure (mmHg)	127	115 (108-130)	131	120 (105-130)
Diastolic blood pressure (mmHg)	127	70 (60-80)	131	70 (64-80)
Left ventricular ejection fraction (%)	118	26 (22-29)	115	25 (21-29)
Left ventricular end-systolic volume index (ml/m <sup>2</sup> )	118	113 (85-141)	115	108 (87-140)
QRS duration (ms)	125	160 (154-180)	130	160 (152-180)
Mitral-regurgitation area (cm <sup>2</sup> )	97	5 (2-10)	106	5 (3-10)
Glomerular filtration rate (ml/min/1.73m <sup>2</sup> ) <sup>†</sup>	122	60 (44-72)	130	60 (44-78)
Loop diuretic	128	120 (94%)	132	124 (94%)
Spironolactone	128	72 (56%)	132	73 (55%)
Angiotensin converting enzyme inhibitor or angiotensin-receptor blocker	128	122 (95%)	132	131 (99%)
Betablocker	128	94 (73%)	132	88 (67%)
Digitalis	128	55 (43%)	132	47 (36%)

Biomarkers	Control group*		CRT group*	
	n	Median (IQR)	n	Median (IQR)
NT-ProBNP, pg/ml	124	1408 (571-3074)	127	1362 (592-4119)
PINP, ng/ml	121	33.1 (23.0-49.3)	125	33.0 (24.6-49.4)
PIIINP, ng/ml	123	4.7 (3.8-6.5)	126	4.6 (3.8-6.8)
ICTP, ng/ml	123	3.4 (2.7-5.0)	126	4.1 (2.6-6.0)

Values are reported as median (InterQuartile Range) for continuous variables or n (%) for categorical variables.

\* There was no difference in median baseline levels between the control and the CRT groups.

† According to the MDRD formula (Modification of Diet in Renal Disease) (29).

CRT: cardiac resynchronization therapy. ICTP: type I collagen telopeptide. NT-ProBNP: aminoterminal pro-brain natriuretic peptide. NYHA: New York Heart Association. PINP: aminoterminal propeptide of Type I procollagen. PIIINP: aminoterminal propeptide of Type III procollagen.

**TABLE 2. Patients' outcome**

	<b>Control (n= 128)</b>	<b>CRT (n= 132)</b>	<b>Chi-Square p</b>
<b>Outcome</b>			
<b>Primary</b>	61 (48)	48 (36)	0.065
<b>Death during study</b>	33 (26)	21 (16)	0.0498
<b>Death during study including extension phase</b>	40 (31)	26 (20)	0.032

Values are reported as n (%).

CRT: cardiac resynchronization therapy

**TABLE 3. ECCM biomarkers and risk factors correlations at baseline**  
**for all patients with biomarkers**

<b>r*</b> <b>p†</b> <b>n‡</b>	<b>PINP</b>	<b>PIIINP</b>	<b>ICTP</b>	<b>NT- ProBNP</b>	<b>GFR</b>	<b>QRS interval</b>	<b>LVEF</b>
<b>PINP</b>	1.00 246	0.10 0.14 246	<u>0.28</u> < 0.0001 246	<u>0.15</u> 0.021 245	-0.04 0.49 239	-0.01 0.92 241	0.02 0.81 220
<b>PIIINP</b>	0.10 0.14 246	1.00 249	<u>0.26</u> < 0.0001 249	<u>0.21</u> < 0.0001 248	<u>-0.15</u> 0.017 242	0.03 0.63 244	-0.05 0.45 223
<b>ICTP</b>	<u>0.28</u> < 0.0001 246	<u>0.26</u> < 0.0001 249	1.00 249	<u>0.36</u> < 0.0001 248	<u>-0.45</u> < 0.0001 242	-0.05 0.45 244	-0.03 0.64 223
<b>NT- ProBNP</b>	<u>0.15</u> 0.021 245	<u>0.21</u> < 0.0001 248	<u>0.36</u> < 0.0001 248	1.00 248	<u>-0.33</u> < 0.0001 244	0.11 0.090 246	<u>-0.40</u> < 0.0001 224
<b>GFR</b>	-0.04 0.49 239	<u>-0.15</u> 0.017 242	<u>-0.45</u> < 0.0001 242	<u>-0.33</u> < 0.0001 244	1.00 252	<u>0.15</u> 0.018 247	-0.10 0.12 226
<b>QRS interval</b>	-0.01 0.92 241	0.03 0.63 244	-0.05 0.45 244	0.11 0.090 246	<u>0.15</u> 0.018 247	1.00 255	<u>-0.30</u> < 0.0001 229
<b>LVEF</b>	0.02 0.81 220	-0.05 0.45 223	-0.03 0.64 223	<u>-0.40</u> < 0.0001 224	-0.10 0.12 226	<u>-0.30</u> < 0.0001 229	1.00 233

\* r: Spearman correlation coefficients. † p: probability ( $r = 0$ ). ‡ n: frequency.

GFR: glomerular filtration rate. ICTP: type I collagen telopeptide. LVEF: left ventricular ejection fraction. NT-ProBNP: aminoterminal pro-brain natriuretic peptide. PINP: aminoterminal propeptide of Type I procollagen. PIIINP: aminoterminal propeptide of Type III procollagen.

**TABLE 4. Association between biomarkers at baseline and response criteria based on survival without unscheduled hospitalisation for worsening of HF at month 18**

	<b>Responders/ Patients</b>	<b>Factors</b>	<b>OR (95IC)*</b>	<b>p</b>
Response criterion : patients survivors at month 18 without unscheduled for worsening HF	168/241	CRT group	1.99 (1.11-3.56)	0.021
		NT-ProBNP per <i>500 pg/ml</i>	0.94 (0.91-0.98)	0.003
		PIIINP per 2 <i>ng/ml</i>	0.88 (0.78-0.99)	0.037
		<i>Pairwise interactions</i>	-	NS

\* OR: Odds Ratio (95IC: 95% Confidence Interval)

### 4.3. RESULTATS ADDITIONNELS NON PUBLIES DANS LES ARTICLES PRESENTES

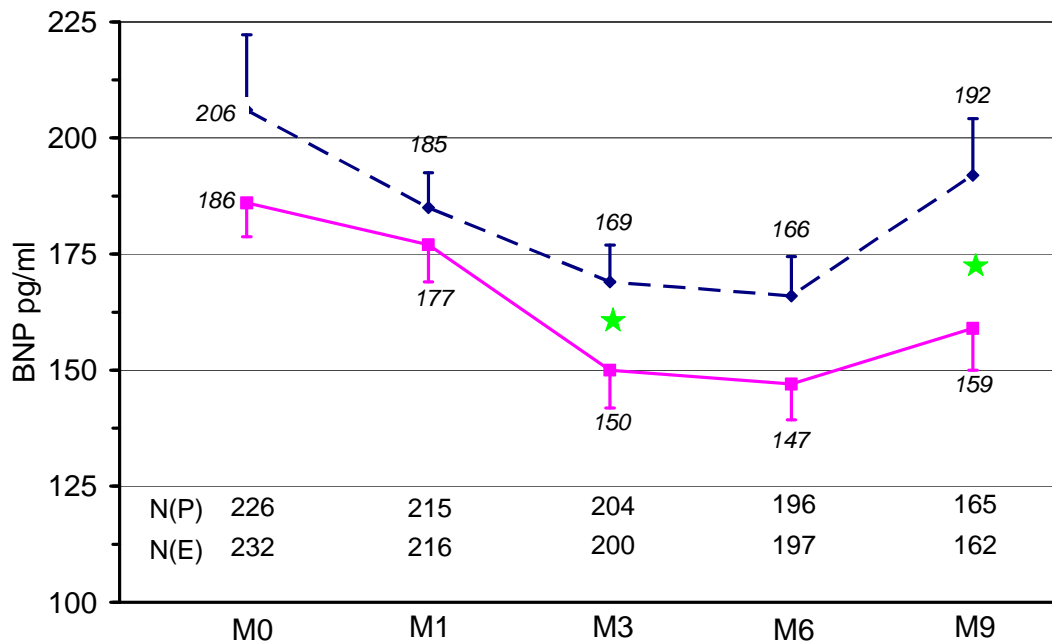
Certains résultats de nos études n'ont pas été insérés dans les 2 articles précédents, principalement pour répondre aux recommandations et modèles des journaux auxquels nous les avons soumis. Nous les présentons dans ce travail afin de pouvoir les aborder dans la discussion.

#### 4.3.1. ETUDE EPHESUS

Dans cette étude, nous avons non seulement décrit la cinétique des biomarqueurs de la MEC mais également celle du BNP que nous présentons en figure 5.

**Figure 5 : Evolution de BNP pendant les 9 mois de suivi dans l'étude EPHESUS**

Lab Normal Range (0-100 pg/ml)



*La ligne en pointillés correspond au groupe placebo; la ligne pleine correspond au groupe éplérénone. Les barres d'erreur montrent l'erreur standard de la moyenne.*

*★ Différence significative entre les concentrations des groupes placebo et éplérénone ( $p = 0.0125$ ).*



## 4.3.2. ETUDE CARE-HF

### 4.3.2.1 MMP-1

Dans l'étude CARE-HF nous avons étudié en plus des biomarqueurs de synthèse PINP et PIIINP et du biomarqueur de dégradation ICTP, les métalloprotéinases de type 1 dont voici les principaux résultats : les concentrations initiales de MMP-1 (tableau 1) et la cinétique (Figure 6) au cours des 18 mois de suivi.

#### 4.3.2.1.1 Concentrations initiales de MMP-1 dans l'étude CARE-HF

**Tableau 1: Concentrations initiales de MMP-1**

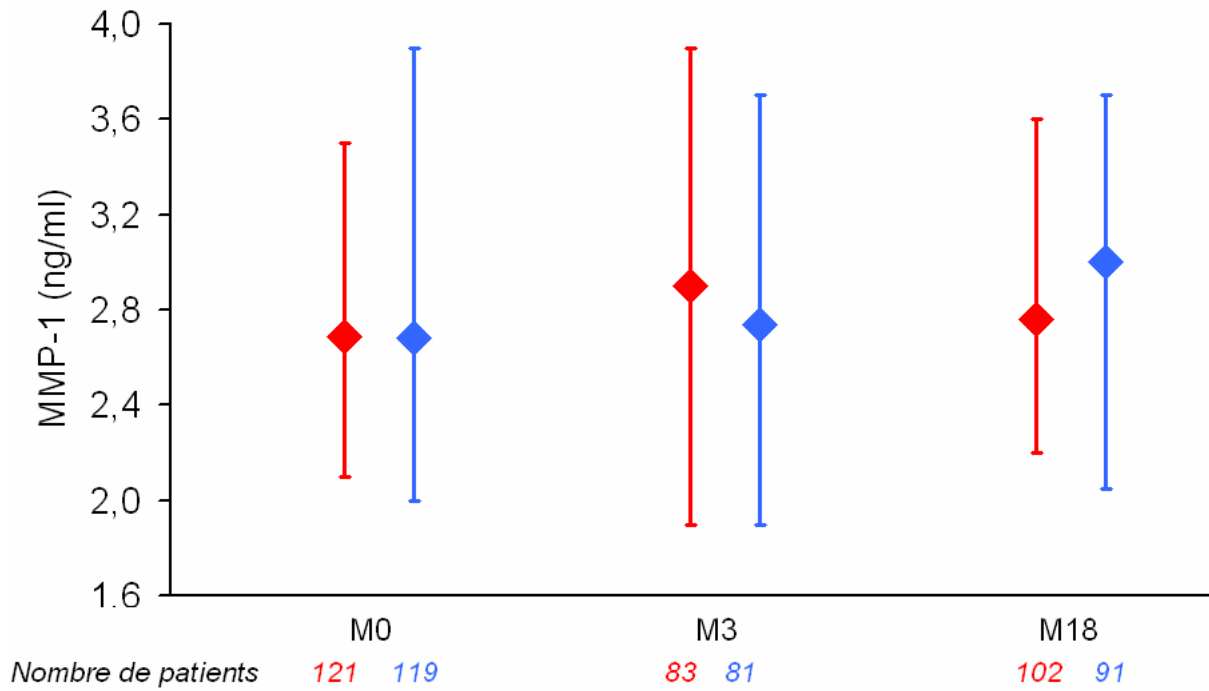
	Groupe Contrôle*		Groupe TRC*	
	n		n	
MMP-1, ng/ml	119	2.7 (2.0-3.9)	121	2.7 (2.1-3.5)


*Les valeurs sont rapportées comme des médianes [Intervalle Interquartile (IIQ)] ; n = nombre de patients.*


*\* Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes contrôle et TRC pour les caractéristiques initiales.*

4.3.2.1.2 Cinétique de MMP-1 dans l'étude CARE-HF

Figure 6 : Evolution de MMP-1 pendant les 18 mois de suivi dans l'étude CARE-HF



 *Groupe TRC*

 *Groupe contrôle*

*Les barres d'erreur correspondent aux intervalles interquartile.*

**4.3.2.2 Combinaison entre des concentrations de NT-ProBNP et PIIINP supérieures et inférieures à la médiane pour évaluer la réponse à la TRC**

Suite à notre expérience de l'étude EPHEBUS, nous avons voulu vérifier si l'association de concentrations initiales de NT-ProBNP inférieures ou supérieures à la médiane avec celles de PIIINP pouvait servir de critère prédicteur de réponse à la TRC [en utilisant les 3 définitions de répondeurs/non répondeurs de l'article sur les biomarqueurs chez les patients de l'étude CARE-HF (246)]

Les résultats concernant le critère de réponse basé sur la survie à 18 mois sans hospitalisation pour aggravation de l'IC sont présentés dans le tableau 2.

Aucun des biomarqueurs ne s'est montré associé aux 2 critères de réponses intermédiaires à 3 mois (amélioration de la FEVG  $\geq 3\%$  à 3 mois ; amélioration des concentrations de NT-ProBNP de 30 % à 3 mois).

**Tableau 2 : Association entre les concentrations initiales des biomarqueurs et le critère de réponse basée sur la survie à 18 mois sans hospitalisation pour aggravation de l'insuffisance cardiaque**

	Répondeurs/ Patients	Facteurs	OR (95IC)*	p
Critère de réponse : patients survivants à 18 mois sans hospitalisation pour aggravation de l'IC	168/241	Groupe TRC	1.71 (0.98-3.00)	0.061
		PIIINP et NT-ProBNP > médiane	0.76 (0.60-0.95)	0.018

\* OR: Odds Ratio

95IC: Intervalle de confiance à 95 %

Au vu de ces résultats, la combinaison des concentrations de NT-ProBNP et PIIINP supérieurs ou inférieurs à leur médiane respective n'apporte pas d'information supplémentaire par rapport aux concentrations initiales de PIIINP utilisées seules.

## 5. DISCUSSION

Dans nos travaux, nous avons décrit les modifications à court et long termes des concentrations des biomarqueurs du collagène et des peptides natriurétiques chez des patients en phase aiguë après un IDM compliqué par une IC et une dysfonction systolique du VG et traités par éplérénone (étude EPHEBUS), ainsi qu'en phase chronique chez des patients avec une IC modérée à sévère due à une dysfonction systolique du VG associée à un asynchronisme cardiaque et traités par TRC (étude CARE-HF).

Au cours du suivi des patients de l'étude EPHEBUS, l'éplérénone diminue les concentrations de PINP et PIIINP avec une différence significative du 6<sup>ème</sup> au 9<sup>ème</sup> mois. Les biomarqueurs ICTP et TIMP-1 ne sont pas affectés par l'éplérénone pendant les 9 mois du suivi. Les concentrations de BNP apparaissent significativement diminuées dans le groupe éplérénone au 3<sup>ème</sup> et au 9<sup>ème</sup> mois.

A l'inverse, le traitement par la TRC dans l'étude CARE-HF ne semble pas avoir d'influence significative sur l'évolution de ces biomarqueurs au cours des 18 mois de suivi tandis qu'une amélioration significative des concentrations de NT-ProBNP survient au 18<sup>ème</sup> mois avec des concentrations inférieures dans le groupe TRC.

Chez les patients avec biomarqueurs de l'étude EPHEBUS, la combinaison de concentrations initiales supérieures à la médiane d'ICTP et de BNP s'est révélée prédictive de la mortalité toutes causes confondues ou des hospitalisations pour aggravation de l'IC.

Dans l'étude CARE-HF, seule une concentration initiale élevée de PIIINP est associée à une augmentation du risque de mortalité toutes causes confondues pendant l'étude avec la phase d'extension, et ce, indépendamment du NT-ProBNP.

Dans les 2 populations de ces études, les biomarqueurs du collagène ont donc apporté une information complémentaire de celle déjà fournie par les peptides natriurétiques.

Enfin, en définissant différents critères de réponse au traitement par TRC, aucun des biomarqueurs du collagène ni le NT-ProBNP n'apparaissent comme pouvant prédire une réponse au traitement par TRC.

Nous allons aborder les différences de caractéristiques initiales et le contexte dans lesquelles ces 2 populations ont été sélectionnées, et nous intéresser à l'intérêt de l'analyse des biomarqueurs de la fibrose en phases aiguë et chronique comme :

- Indice pronostique de l'évolution de l'IC

- Outil servant à élucider la physiopathologie de l'IC en association avec d'autres types de biomarqueurs (neurohormonaux, de l'inflammation, de la fonction rénale)
- Outil d'évaluation du traitement de l'IC, cible thérapeutique éventuelle et critère prédictif de la réponse au traitement.

## **5.1. DIFFERENCES ENTRE LES POPULATIONS EPHESUS ET CARE-HF**

En rapprochant les résultats de ces 2 études, on observe que dans EPHESUS, c'est un biomarqueur de la dégradation du collagène (ICTP) qui se révèle être pronostic tandis que dans l'étude CARE-HF c'est un biomarqueur de synthèse (PIIINP).

Ce constat dans 2 populations qui comportaient pourtant l'une comme l'autre des patients IC, amène à étudier tout d'abord le(s) critère(s) qui différencient ces 2 populations.

En effet, en comparant les populations des groupes placebo et contrôle des études EPHESUS et CARE-HF, des différences majeures sont à souligner (Tableau 3).

Parmi le sous-groupe de patients sous placebo de l'étude EPHESUS dont nous avons analysé les biomarqueurs, seuls 11 % des patients du groupe placebo avaient des antécédents médicaux d'IC avant la survenue de l'IDM, 6.4 % ne présentaient pas de symptômes d'IC post-IDM mais un diabète (86), ce qui implique que plus de 89 % de ces patients souffraient d'une IC d'origine ischémique faisant suite à la survenue de l'IDM aigu. De plus, chez 90 % de l'ensemble de ces patients IC du groupe placebo, la sévérité de l'IC était estimée comme > 1 selon la classification de Killip, équivalent à une classe II dans la classification NYHA.

A la différence de ces patients, seuls 38 % des patients du sous-groupe contrôle de l'étude CARE-HF présentaient une IC d'origine ischémique, et l'IC de ces patients était de classe NYHA III pour 94 % d'entre eux.

La différence de sévérité de l'IC se retrouve dans la FEVG, plus altérée chez les patients IC chroniques de l'étude CARE-HF dont la médiane de FEVG était de 26 (22-29) % [médiane (IIQ)], comparée à une moyenne de  $34 \pm 5$  % [moyenne  $\pm$  déviation standard (DS)] mesurée chez les patients en phase aiguë de l'étude EPHESUS (86) (246).

Des différences au niveau de la prise en charge de l'IC dans les 2 études se retrouvent dans l'absence de traitement par diurétiques épargneurs de potassium ou par spironolactone, interdits dans la population EPHESUS, et dans la différence d'administration de diurétiques de l'anse : 51 % dans EPHESUS contre 94 % dans CARE-HF. Ceci peut s'expliquer par le fait que les patients de l'étude CARE-HF présentent une IC plus sévère et chronique.

**Tableau 3: Comparaison des caractéristiques initiales des patients avec biomarqueurs des groupes placebo et contrôle des études EPHESUS et CARE-HF**

	<b>Patients avec biomarqueurs du groupe placebo de l'étude EPHESUS</b>	<b>Patients avec biomarqueurs du groupe contrôle de l'étude CARE-HF</b>
<b>Patients_ nombre</b>	236	max 128 / min 121
<b>Age _années</b>	62 ± 11	67 (59-72)
<b>Sexe_ %</b>		
<b>Homme</b>	75	75
<b>Femme</b>	25	25
<b>Pression artérielle _ mmHg</b>		
<b>Systolique</b>	121 ± 16	115 (108-130)
<b>Diastolique</b>	75 ± 10	70 (60-80)
<b>Fréquence cardiaque _ bpm</b>	Indéterminé	70 (61-77)
<b>Classification NYHA _ %</b>		
<b>II</b>		NA
<b>III</b>	90 % avec classe de Killip > 1	94
<b>IV</b>		6
<b>FEVG _ %</b>	34 ± 5	26 (22-29)
<b>Etiologies de l'IC _ %</b>		
<b>Ischémique</b>	au moins 89 %	38 %
<b>Non ischémique</b>	Antécédent d'IC: 11 %	Indéterminé 47 % cardiomyopathie dilatée 16 % maladies cardiaques d'autres étiologies
<i>Valeurs</i>	<i>moyenne ± DS</i>	<i>médiane (IIQ)</i>
<b>Traitements _ %</b>		
<b>Diurétiques épargneurs de K<sup>+</sup></b>	interdit	56 (spiro)
<b>Diurétiques de l'anse</b>	51	94
<b>IEC</b>	89	95 (IEC ou AATI)
<b>Digitaliques</b>	Indéterminé	43
<b>Aspirine</b>	85	Indéterminé
<b>Suppléments potassiques</b>	Indéterminé	Indéterminé
<b>β-bloquants</b>	78	73
<b>Statines</b>	50	Indéterminé

	<b>Patients avec biomarqueurs du groupe placebo de l'étude EPHEBUS</b>	<b>Patients avec biomarqueurs du groupe contrôle de l'étude CARE-HF</b>
<b>Biomarqueurs</b>		
<b>PINP, ng/ml</b>	35 ± 17	33.1 (23.0-49.3)
<b>PIINP, ng/ml</b>	4.2 ± 1.5	4.7 (3.8-6.5)
<b>ICTP, ng/ml</b>	6.7 ± 4.0	3.4 (2.7-5.0)
<b>TIMP-1, ng/ml</b>	1228 ± 401	Indéterminé
<b>BNP, pg/ml</b>	206 ± 244	NT-ProBNP, pg/ml 1408 (571-3074)
<i>Valeurs</i>	<i>moyenne ± DS</i>	<i>médiane (I/Q)</i>
<b>Principaux critères de non inclusion</b>	IC d'étiologie valvulaire ou congénitale	Fibrillation auriculaire chronique dans les 6 semaines précédant la randomisation
	Instabilité clinique (arythmies autres que la fibrillation auriculaire, choc cardiogénique...)	Altération de la fonction du VG non liée à la fonction systolique du VG
	Pontage coronaire pendant la période de screening sauf si stable cliniquement pendant au moins 72 heures après l'intervention et avant la randomisation	Formes potentiellement réversibles de cardiomyopathie
	Angioplastie transluminale coronaire percutanée prévue durant la période de screening sauf si stable cliniquement pendant au moins 24 heures après l'intervention et avant la randomisation.	Chirurgie cardiaque, intervention coronaire percutanée, cardiomyoplastie, infarctus du myocarde, angine instable ou sévère, accident vasculaire cérébral, dans les 6 semaines précédant la randomisation
	DCI / Transplantation cardiaque programmée durant l'étude	Indication conventionnelle pour un stimulateur cardiaque ou un DCI ou un stimulateur cardiaque ou un DCI déjà implanté
	Hypotension non contrôlée (PAS < 90 mm Hg).	Patients hospitalisés nécessitant une thérapie intraveineuse en continu pour IC
	Traitement par diurétiques épargneurs de potassium ou spironolactone	Espérance de vie < 1 an pour une pathologie non liée à l'IC
	Créatininémie > 220 µmol/L et kaliémie > 5.0 mmol/L pendant la période de screening	Valve mécanique tricuspide
Comorbidités/ hypersensibilité connue à l'éplérenone ou à la spironolactone/désordres métaboliques sévères...	Problème anticipé d'observance / Participation à un autre essai / âge < 18/ Grossesse	
<b>Période de recrutement</b>	Déc. 1999 - Déc. 2001	1 <sup>er</sup> trimestre 2001- Mar. 2003

Les populations de ces 2 études avaient donc été sélectionnées sur des caractéristiques initiales différentes et les patients n'avaient de ce fait probablement pas le même profil physiopathologique.

## **5.2. UTILISATION DES BIOMARQUEURS DE LA FIBROSE COMME INDICE PRONOSTIQUE**

Les différences de contexte, aigu et chronique, dans lesquelles les populations de EPHEBUS et CARE-HF ont été sélectionnées et les différences de caractéristiques initiales qui en découlent peuvent-elles expliquer les résultats divergents concernant les biomarqueurs prédictifs du pronostic ? Y a-t-il une raison sous-jacente au niveau physiopathologique qui expliquerait que dans l'une des deux populations la synthèse prime sur l'association au pronostic tandis que dans l'autre c'est la dégradation qui est significative. Enfin, cela a-t-il déjà été démontré dans des populations similaires à celles que nous avons étudiées ?

### **5.2.1. DANS L'IC CHRONIQUE, ETUDE CARE-HF**

Les concentrations de PIIINP en début d'étude sont supérieures chez les patients ayant un pronostic défavorable sur l'issue de la pathologie dans la présente étude et ce de façon additive et indépendante de l'association entre le NT-ProBNP et la survenue d'évènements.

Des résultats semblables ont déjà été rapportés chez des patients IC avec une dysfonction systolique du VG (113, 115) et une ischémie chronique (171). Dans l'étude RECOVER (115), le PIIINP montre une association indépendante avec la morbi-mortalité liée à l'IC chronique suggérant qu'un turnover excessif de la MEC était associé à un pronostic défavorable. La valeur pronostique du PIIINP a aussi été mise en évidence dans l'étude RALES (113), dans laquelle des concentrations basales de PIIINP > 3.85 ng/ml (valeur médiane) étaient associées à une augmentation de la mortalité.

Aucun autre marqueur du collagène de la MEC n'a montré d'association avec la survenue d'évènement.

Nous avons voulu savoir si les caractéristiques initiales de ces 3 populations étaient similaires, et pourraient donc en partie expliquer ces résultats. Les caractéristiques cliniques initiales des patients du sous-groupe contrôle de l'étude CARE-HF étaient comparables pour la plupart à celles des groupes placebo de RALES et du groupe RECOVER (Tableau 4) pour lequel les dosages de biomarqueurs du collagène ont été effectués, que ce soit au niveau de l'âge, de la proportion des sexes, et de la fréquence cardiaque.



**Tableau 4: Comparaison des caractéristiques initiales des patients avec biomarqueurs des groupes placebo et contrôle des études RALES et CARE-HF et des patients de l'étude RECOVER avec biomarqueurs**

	<b>Patients with biomarkers from the placebo group of the RALES study</b>	<b>Patients with biomarkers from the RECOVER study</b>	<b>Patients with biomarkers from the control group of the CARE-HF study</b>
<b>Patients_ nombre</b>	133	1009	max 128 / min 121
<b>Age _années</b>	69 ± 11	64,5 ± 10,5	67 (59-72)
<b>Sexe_ %</b>			
<b>Homme</b>	71	77	75
<b>Femme</b>	29	23	25
<b>Pression artérielle _ mmHg</b>			
<b>Systolique</b>	124 ± 20	123 ± 18	115 (108-130)
<b>Diastolique</b>	74 ± 11	75 ± 10	70 (60-80)
<b>Fréquence cardiaque _ bpm</b>	Indéterminé	74 ± 12	70 (61-77)
<b>NYHA class _ %</b>			
<b>II</b>	2 patients	26	NA
<b>III</b>	79	71	94
<b>IV</b>	21	3	6
<b>FEVG _ %</b>	26 ± 7	24 ± 5	26 (22-29)
<b>Etiologies de l'IC _ %</b>			
<b>Ischémique</b>	44	62	38 %
<b>Non ischémique</b>	56	38 (idiopathique 25 %)	Indéterminé 47 % cardiomyopathie dilatée 16 % maladies cardiaques d'autres étiologies
<b>Traitements _ %</b>			
<b>Diurétiques épargneurs de K<sup>+</sup></b>	interdit	36 (spiro)	56 (spiro)
<b>Diurétiques de l'anse</b>	100	99 (tout diurétique)	94
<b>IEC</b>	90	89	95 (IEC ou AATI)

	<b>Patients with biomarkers from the placebo group of the RALES study</b>	<b>Patients with biomarkers from the RECOVER study</b>	<b>Patients with biomarkers from the control group of the CARE-HF study</b>
<b>AATI</b>	Aucun	13	95 (IEC ou AATI)
<b>Digitaliques</b>	56	54	43
<b>Aspirine</b>	19	Indéterminé	Indéterminé
<b>Suppléments potassiques</b>	23	Indéterminé	Indéterminé
<b>β-bloquants</b>	5	64	73
<i>Valeurs</i>	<i>moyenne ± DS</i>	<i>moyenne ± DS</i>	<i>médiane (IIQ)</i>

#### Biomarqueurs

<b>PINP, ng/ml</b>	50,9 ± 57,1	Indéterminé	33.1 (23.0-49.3)
<b>PIIINP, ng/ml</b>	4,9 ± 2,5	4,61 ± 2,26	4.7 (3.8-6.5)
<b>ICTP, ng/ml</b>	Indéterminé	Indéterminé	3.4 (2.7-5.0)
<b>TIMP-1, ng/ml</b>	654,6 ± 796,5	1478,4 ± 556,1	Indéterminé
<b>BNP, pg/ml</b>	Indéterminé	Indéterminé	NT-ProBNP, pg/ml 1408 (571-3074)
<i>Valeurs</i>	<i>moyenne ± DS</i>	<i>moyenne ± DS</i>	<i>médiane (IIQ)</i>

#### Principaux critères de non inclusion

Maladie cardiaque congénitale	Infection sévère dans le mois précédant la randomisation	Fibrillation auriculaire chronique dans les 6 semaines précédant la randomisation
Angor instable	Etiologies de l'IC chirurgicalement corrigibles	Altération de la fonction du VG non liée à la fonction systolique du VG
Insuffisance hépatique primaire	Autres pathologies sévères	Formes potentiellement réversibles de cardiomyopathie
Pathologie valvulaire primaire opérable (autre que régurgitation mitrale ou tricuspide avec symptômes cliniques d'IC systolique)	IDM aigu ou hospitalisation dans les 3 mois et revascularisation coronaire/chirurgicale récente (3 mois) ou planifiée	Chirurgie cardiaque, intervention coronaire percutanée, cardiomyoplastie, infarctus du myocarde, angine instable ou sévère, accident vasculaire cérébral, dans les 6 semaines précédant la randomisation
Cancer ou autre maladie menaçant l'espérance de vie (autre que l'IC)		Indication conventionnelle pour un stimulateur cardiaque ou un DCI ou un stimulateur cardiaque ou un DCI déjà implanté
Patient ayant subi une transplantation cardiaque		Patients hospitalisés nécessitant une thérapie

	<b>Patients with biomarkers from the placebo group of the RALES study</b>	<b>Patients with biomarkers from the RECOVER study</b>	<b>Patients with biomarkers from the control group of the CARE-HF study</b>
	ou en attente d'une transplantation		intraveineuse en continu pour IC
	Créatininémie > 2,5 mg/dL (221 µmol/L) et kaliémie > 5,0 mmol/L		Espérance de vie < 1 an pour une pathologie non liée à l'IC
			Valve mécanique tricuspide
			Problème anticipé d'observance / Participation à un autre essai / âge < 18/ Grossesse
<b>Période de recrutement</b>	Mar. 1995 - Déc. 1996	Juin 1999 - Déc. 2000	1 <sup>er</sup> trimestre 2001- Mar 2003

Les valeurs de la pression artérielle systolique des patients de l'étude CARE-HF apparaissent légèrement inférieures probablement à cause de la sévérité des patients inclus dans cet essai. Ces études incluaient majoritairement des patients de classe III selon la classification internationale NYHA. La FEVG était en moyenne de  $26 \pm 7$  % (moyenne  $\pm$  DS) dans RALES,  $24 \pm 5$  % (moyenne  $\pm$  DS) dans RECOVER et  $26$  (22-29) % [médiane (IIQ)] dans CARE-HF.

Une différence apparaît concernant l'origine principale de l'IC qui était ischémique chez 44 et 38 % dans RALES et CARE-HF respectivement contre 62 % dans l'étude RECOVER.

La prise en charge de l'IC des patients différait également entre les 3 études sauf concernant le traitement par IEC et/ou des AATI (sartans) avec 89 % d'IEC et 13 % d'AATI dans RECOVER, 95 % d'IEC/AATI dans CARE-HF et 90 % d'IEC dans RALES [les études ELITE II (Losartan Heart Failure Survival Study) (172), Val-HeFT (Valsartan Heart Failure Trial) (173) et CHARM (Candesartan in Heart failure-Assessment of Reduction in Mortality and morbidity) (174), démontrant les bénéfices des sartans sur la morbi-mortalité dans l'IC, ont été réalisés postérieurement].

L'administration de diurétiques était réalisée chez 100 ; 99 et 94 % des patients de RALES, RECOVER et CARE-HF respectivement.

Les diurétiques épargneurs de potassium étaient interdits dans RALES pour ne pas compromettre les résultats quant aux bénéfices de la spironolactone, tandis que 36 et 56 % des patients dans RECOVER et CARE-HF étaient traités par spironolactone.

Soixante-quatre et soixante-treize % des patients de RECOVER et CARE-HF étaient également traités par des  $\beta$ -bloquants contre seulement 5 % dans RALES. Cette différence peut s'expliquer par les résultats positifs des études CIBIS (Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study) et CIBIS II prouvant les bénéfices du bisoprolol sur la mortalité dans l'IC chronique, études menées en 1994 et 1999 (175-178) tandis que la période d'inclusion de l'étude RALES a débuté en Mars 1995 pour s'arrêter en Décembre 1996 (82, 179).

Les populations de ces 3 études étaient donc très comparables d'un point de vue clinique, et les principales différences de prise en charge de l'IC des patients relevaient plus de la nature même de l'étude ou de l'historique des traitements utilisés dans l'IC chronique.

Le biomarqueur de synthèse de la MEC, PIIINP, pourrait par conséquent être prédicteur de la survenue d'évènements et aider à la stratification du risque dans un contexte d'IC chronique.

### **5.2.2. DANS L'IC EN PHASE AIGUË, ETUDE EPHEBUS**

Dans notre étude, des concentrations initiales d'ICTP et de BNP supérieures à la médiane sont associées à un risque augmenté de mortalité toutes causes confondues ou d'hospitalisations pour aggravation de l'IC. Des valeurs élevées d'ICTP sont le reflet d'une activité de dégradation intense de la MEC dans la zone cicatricielle après la survenue de l'infarctus, possiblement à l'origine d'un risque augmenté de dilatation voire de rupture du VG par perte de support matriciel.

Il faut noter qu'aucune association entre le PIIINP et la survenue d'évènements n'est apparue significative dans l'étude EPHEBUS. Ceci tendrait à confirmer que le PIIINP est un biomarqueur plus adapté au pronostic d'évènements cardiovasculaires à long terme en condition chronique plutôt qu'en phase aiguë après un IDM, phase pendant laquelle le remodelage géométrique du VG évolue et où la dégradation du collagène semble jouer un rôle primordial.

Il n'est pas possible de rapprocher les résultats de nos travaux sur les patients de l'étude EPHEBUS d'autres populations similaires d'essais cliniques de grande envergure comme nous l'avons fait pour CARE-HF avec RALES et RECOVER. Néanmoins, des études sur un petit nombre de patients ont été réalisées dans l'IC post IDM sur un suivi à plus court terme (86, 104, 105, 180-184).

Chez des patients avec un IDM aigu, des concentrations élevées de PIIINP à l'admission et dans les quelques jours suivants la survenue de l'IDM se sont montrées prédictives d'une dilatation du VG (104).

Nos études confirment le potentiel des biomarqueurs du collagène de la MEC à stratifier le risque de mortalité des patients et montrent que l'évaluation du remodelage collagénique par le biais du PIIINP et de l'ICTP apporte une information complémentaire à celle déjà apportée par les peptides natriurétiques. L'information apportée par l'ICTP est associée à celle du BNP dans le cas de l'étude EPHEBUS. A l'inverse celle apportée par le PIIINP dans l'essai CARE-HF est complètement indépendante du NT-ProBNP.

## **5.3. LES BIOMARQUEURS COMME OUTIL D'EXPLORATION DE PROCESSUS PATHOLOGIQUES**

### **5.3.1. DANS L'IC CHRONIQUE, ETUDE CARE-HF**

#### **5.3.1.1 Les biomarqueurs de la MEC et la fibrose**

Dans le cas d'une IC chronique comme c'est le cas des patients de l'étude CARE-HF, la fibrose est plus importante, mais un excès de synthèse du collagène pourrait se révéler délétère en diminuant les capacités contractiles du myocarde.

Lors d'épisodes de décompensation aiguë d'IC chronique, Chatzikyriakou SV. *et al* (185) a montré que chez 156 patients, en comparant les concentrations de PINP et ICTP à l'admission et à la sortie, celles de PINP étaient significativement diminuées et celle d'ICTP augmentées, suggérant que les biomarqueurs de la MEC peuvent également refléter des modifications de la matrice à court terme, pendant la période de résolution de la décompensation aiguë. Ces résultats appuient aussi l'hypothèse selon laquelle un turnover diminué de la MEC pourrait contribuer à la résolution de l'épisode de décompensation par diminution de la fibrose (185). Une autre étude sur des patients IC chroniques a montré une relation significative et négative entre l'ICTP et des indices de la rigidité vasculaire périphérique (186), suggérant qu'un turnover augmenté du fait d'une dégradation diminuée de la matrice est associé à une fibrose plus importante.

Cette hypothèse ne peut être confirmée au vu des résultats de notre étude ni de ceux de l'étude RALES (données non publiées) puisqu'elles n'avaient pas révélé d'association entre la FEVG et les biomarqueurs. Par contre, il existe une corrélation chez les patients de l'étude CARE-HF entre les concentrations initiales de NT-ProBNP et celles de PINP, PIIINP et ICTP, donc à travers ces biomarqueurs à l'ensemble du processus de turnover de la MEC (53, 187) (246).

De plus, PIIINP fournit une information supplémentaire sur la survenue d'évènements, indépendamment d'autres puissants prédicteurs comme le NT-ProBNP (188), suggérant que le remodelage fibrotique peut représenter, en plus de mécanismes tissulaires, une expression locale de l'activation systémique neuro-hormonale avec une influence sur les concentrations des peptides natriurétiques (63, 184, 189).

La fibrose cardiaque est associée à un statut cardiaque fonctionnel détérioré et à un mauvais pronostic. Le dépôt de collagène peut affecter la capacité cardiaque fonctionnelle de différentes façons : par la détérioration de la capacité de pompe du coeur dont un des déterminant majeur est la fibrose cardiaque, ou encore en fournissant un substrat structurel à

l'arrhythmogénicité, contribuant par conséquent à la progression de l'IC chronique et la mort subite.

Klappacher *et al.* (190) ont étudié les concentrations sériques de PIIINP, PINP et ICTP chez des patients IC chroniques de différentes sévérités, secondaires soit à une cardiomyopathie dilatée (idiopathique) soit à une cardiomyopathie ischémique. Tous ces patients étaient traités par des IEC, des digitaliques et plusieurs types de diurétique. Des concentrations augmentées de PIIINP et ICTP étaient corrélées avec la sévérité clinique de l'IC, le degré d'altération hémodynamique, une hyponatrémie, et le besoin d'une transplantation cardiaque (190). Sur cette même population, mais sur des cœurs explantés, PIIINP et ICTP étaient corrélés à l'accumulation de collagène de type III et I respectivement, représentée par une fibrose interstitielle et péri-vasculaire des VD et VG (190).

### **5.3.1.2 Les biomarqueurs de la MEC et l'inflammation**

Une interaction entre des médiateurs de la réaction inflammatoire et les biomarqueurs du collagène a également été étudiée par notre équipe chez les patients de l'étude RECOVER montrant une association positive significative entre PIIINP, TIMP-1 et IL-18 ; MMP-1, TIMP-1 et la CRP; MMP-1 et l'IL-10 (115). L'association entre la CRP et les biomarqueurs du collagène de la MEC chez les patients de l'étude CARE-HF (groupes TRC et contrôle confondus, données non publiées) est significative entre la CRP et l'ICTP ( $r = 0.23$ ,  $p = 0.0069$ ), confirmant l'interaction entre inflammation et remodelage matriciel.

La participation des cellules et médiateurs inflammatoires dans l'athérogénèse et la rupture de la plaque est bien établie (191). Même si la CRP sérique n'est pas un marqueur spécifique et que sa concentration augmente en réponse à une inflammation, plusieurs études ont suggéré la possibilité qu'elle soit un acteur de la progression de l'athérosclérose et de ses conséquences cliniques (192). De plus, la CRP s'est révélée exercer des effets directs défavorables sur l'endothélium vasculaire en diminuant la libération de NO, en augmentant la production d'endothéline-1 et en induisant l'expression des molécules endothéliales d'adhésion (193). Ces observations suggèrent que la CRP peut aussi jouer un rôle causal dans la maladie vasculaire et en conséquence être une cible thérapeutique. Néanmoins, des concentrations élevées de CRP ne sont pas spécifiques et sont aussi bien associées à une infection aiguë ou chronique, à la consommation de cigarettes, aux SCA et états inflammatoires actifs.

La hs-CRP, une protéine de phase aiguë qui est majoritairement produite par les hépatocytes sous l'influence de cytokines comme l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ , s'était précédemment avérée être également un prédicteur indépendant du pronostic de l'IC chronique et des capacités

cardiaques fonctionnelles avec des concentrations élevées associées à un pronostic défavorable chez les patients IC (194).

Les travaux antérieurs de notre équipe ont aussi abordé le rôle de l'inflammation dans l'IC chronique chez les patients de l'étude RECOVER (115), et ont montré pour la première fois sur une large cohorte de patients, une association significative entre les biomarqueurs de l'inflammation et les biomarqueurs de la MEC : l'IL-18 s'est montré associée au PIIINP et au TIMP-1, tandis que la CRP était associée au MMP-1 et au TIMP-1, suggérant des interactions importantes entre les systèmes inflammatoire et matriciel dans l'IC.

Dans une étude sur des patients IC traités par TRC, une diminution des concentrations de CRP et d'IL-6 était significative seulement chez les patients présentant un remodelage inverse et pas de survenue d'évènement clinique, amenant les auteurs à conclure que le remodelage inverse induit par la TRC contribuerait à une baisse de l'inflammation (195).

A l'inverse de ces résultats, Wedel H. *et al.* (196) ont décrit une série de modèles pronostiques pour évaluer l'IC chez des patients âgés traités par thérapie pharmacologique optimale. Chaque modèle comprenait des critères démographiques et cliniques, puis venaient s'ajouter des mesures biochimiques (triglycérides, créatine kinase...) et finalement des biomarqueurs récemment introduits dans les modèles d'IC : la hs-CRP et le NT-ProBNP. Seul le NT-ProBNP s'est révélé apporter une information supplémentaire indépendante et significative sur la survenue d'évènements. La hs-CRP n'était pas associée à la mortalité toutes causes confondues.

### **5.3.1.3 Les biomarqueurs de la MEC et la fonction rénale**

L'association entre l'ensemble des biomarqueurs du collagène de la MEC (à l'exception du PINP) et la fonction rénale, comme la corrélation entre l'historique de l'IR et l'ICTP, ou encore la corrélation positive du MMP-1 et négative des autres biomarqueurs du collagène au débit de filtration glomérulaire (DFG), sont autant de facteurs tendant à confirmer l'intrication entre fonction rénale, sévérité de l'IC et déterminants du remodelage ventriculaire dans l'IC. L'ICTP est aussi associé aux antécédents d'insuffisance rénale (IR) ( $p < 0.0001$ ) avec des concentrations initiales significativement supérieures chez les patients présentant des antécédents d'IR.

L'hypovolémie et l'hypertension caractéristiques d'une IR, entraînent sécrétion et élévation des concentrations de NT-ProBNP et des biomarqueurs du collagène (car l'élimination de ces peptides se fait au niveau rénal).



Ces résultats viennent confirmer l'association entre biomarqueurs du collagène et fonction rénale (197, 198), l'impact de la fonction rénale dans l'IC et la possibilité de l'utiliser également comme outil de stratification du risque de mortalité chez les patients IC (199-201).

### **5.3.2. DANS L'IC EN PHASE AIGUË, ETUDE EPHESUS**

#### **5.3.2.1 Les biomarqueurs de la MEC et la fibrose**

Dans l'étude EPHESUS, les patients étaient inclus à la suite d'un évènement aigu entraînant le remodelage de la paroi. On peut penser que, le collagène étant impliqué dans la stabilité de la plaque de fibrose, un excès de synthèse est important en phase de cicatrisation après la survenue d'un IDM.

En comparant les concentrations initiales des biomarqueurs des études EPHESUS et CARE-HF, il apparaît que celles de PIIINP sont légèrement inférieures et à l'inverse de celles d'ICTP supérieures dans EPHESUS par rapport à CARE-HF impliquant que la balance protéase-antiprotéase penchait dans le sens d'une dégradation augmentée chez les patients de l'étude EPHESUS. Ainsi, une hypothèse serait que les patients avec une concentration initiale élevée d'ICTP, marqueur de la dégradation, pourraient être plus à risque d'une rupture de la plaque de chape fibreuse, athéroscléreuse, à une récurrence d'IDM voire à une aggravation de leur IC par une possible dilatation ventriculaire si la cicatrice d'IDM est mal réparée par manque de fibrose expliquant l'association entre concentrations supérieures à la médiane d'ICTP et BNP et survenue d'évènements. Le BNP est également associé à l'ensemble des biomarqueurs de la fibrose. L'augmentation de la dégradation de la MEC (reflétée par des concentrations augmentées d'ICTP) pourrait représenter une expansion élargie de la zone infarctée et une tension pariétale augmentée du VG (d'où les concentrations élevées de BNP). L'altération de la fonction cardiaque en phase aiguë à la suite d'un IDM associerait à la fois des facteurs fonctionnels, géométriques, des facteurs neurohormonaux et des facteurs tissulaires avec une association significative entre les valeurs initiales de la FEVG, l'ensemble des biomarqueurs du collagène (à l'exception de PINP) et le BNP

Dans une étude réalisée précédemment chez des patients avec un IDM aigu, c'étaient les concentrations sériques de PINP et PIIINP qui étaient corrélées à la taille de l'infarctus, à la dysfonction du VG, et à des artères coronaires obstruées (104). Il faut noter que cette étude était réalisée dans les phases très précoces (dès le premier jour) après la survenue de l'IDM alors que nos valeurs initiales correspondent en moyenne à 8.5 jours après l'IDM.

De plus, dans l'étude EPHESUS, le BNP était associé à l'ensemble des biomarqueurs de la MEC (à l'exception du PINP) y compris l'ICTP. Des résultats similaires ont été rapportés

dans des études précédentes (108, 184). La corrélation entre BNP et ICTP pourrait suggérer que le BNP régule la formation de la cicatrice après un IDM.

Le BNP étant en plus un marqueur de la sévérité de l'IC, son association avec les biomarqueurs de la MEC pourrait impliquer que le processus de fibrose myocardique est un acteur central de la progression de la pathologie.

Cette hypothèse est appuyée par la cinétique des biomarqueurs du collagène des patients de l'étude EPHEBUS qui montre une évolution significative, spécialement dans la phase précoce (le premier mois) suivant la survenue de l'IDM, suggérant l'importance du processus de fibrose dans la physiopathologie après un IDM (86).

Les concentrations des marqueurs de synthèse PINP et PIIINP augmentent de façon significative pendant le 1<sup>er</sup> mois ( $p = 0.0001$ ) puis diminuent jusqu'au 9<sup>ème</sup> mois de suivi.

D'autres études avaient précédemment montré une augmentation précoce des concentrations des marqueurs de synthèse de la MEC dès le premier jour suivant un IDM (180), avec un pic de concentration entre le 4<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> jour (104, 105, 180-184).

Des concentrations initiales élevées d'ICTP, comme celles décrites dans notre étude, ont été rapportées dans une étude sur des patients après un IDM et étaient associées au remodelage du VG (108), ce qui suggère une dégradation augmentée de la MEC dans la phase précoce après l'IDM. En revanche, aucune étude n'a décrit auparavant l'évolution à long terme de l'ICTP. Dans notre étude, les concentrations initiales élevées d'ICTP diminuent significativement pendant le 1<sup>er</sup> mois, mais les concentrations restent élevées tout au long des 9 mois de suivi. On peut rapprocher ce résultat de ce que Spinale FG (202) a décrit sur l'augmentation de l'activité des MMPs après un IDM, contribuant à une dégradation augmentée de la MEC et au processus de remodelage. L'ICTP apparaît comme un biomarqueur du remodelage précoce post-IDM entraînant par la suite une dilatation du VG.

### **5.3.2.2 Les biomarqueurs de la MEC et l'inflammation**

Nous avons également abordé la place de l'inflammation dans notre sous-groupe de l'étude EPHEBUS partant de l'hypothèse qu'en phase aiguë, un phénomène inflammatoire important contribue au remodelage de la MEC. Les concentrations initiales de l'ensemble des biomarqueurs de la fibrose ainsi que celles du BNP étaient positivement et significativement corrélées aux concentrations initiales de la hs-CRP (86). Cette protéine s'était précédemment montrée indépendamment prédictive du pronostic de l'IC chronique et des capacités cardiaques fonctionnelles avec des concentrations élevées associées à un pronostic défavorable chez les patients IC (194).

### **5.3.2.3 Les biomarqueurs de la MEC et la fonction rénale**

Nos travaux nous ont également amenés à étudier l'association entre la fonction rénale et le phénomène de remodelage de la MEC en phase aiguë. Dans l'essai EPHEBUS (résultats non publiés, analyses effectuées sur tous les patients avec biomarqueurs des groupes placebo et éplérénone), tous les biomarqueurs du collagène à l'exception du PINP ont montré une association significative avec le DFG, reflet de la fonction rénale. Comme dans l'IC chronique, nous avons donc confirmation de l'association entre biomarqueurs du collagène et fonction rénale (197-201). Après un IDM, la fonction rénale est prédictive de la survenue d'évènements cardiovasculaires (199).

De plus, il a été montré qu'une proportion importante de patients hospitalisés présente à des degrés variables des dysfonctions cardiaques et rénales, l'altération d'un de ces 2 organes entraînant une dysfonction ou une lésion de l'autre (203). Cette observation sert de base à ce qui a été appelé le syndrome cardiorénal, et fait actuellement l'objet de nombreuses études afin d'offrir aux patients un traitement s'appuyant sur une approche multidisciplinaire combinant cardiologie, néphrologie et médecine d'urgence (204).

## **5.4. UTILISATION DES BIOMARQUEURS DE LA FIBROSE DANS LE MONITORING THERAPEUTIQUE DE L'IC**

### **5.4.1. DANS L'IC CHRONIQUE, ETUDE CARE-HF**

Dans cette étude, les concentrations des biomarqueurs du collagène ne montrent pas d'évolution significative au cours des 18 mois de suivi et l'influence de la TRC sur l'évolution de ces concentrations n'est pas démontrée.

Ce résultat est en contraste avec ce qui a été décrit dans l'étude RALES sur les biomarqueurs avec des concentrations initiales de PIIINP pourtant comparables à celles de l'étude CARE-HF [ $4.9 \pm 2.5$  et  $4.7$  ( $3.8-6.5$ ) ng/ml dans les groupes placebo et contrôle des études RALES et CARE-HF respectivement] mais suivies ensuite par une diminution significative du PIIINP (et du PINP) entre le screening et le 6<sup>ème</sup> mois de suivi dans le groupe traité par spironolactone ( $p= 0.02$ ) (113) (246). Dans le groupe placebo, PIIINP reste stable et PINP augmente. Une des explications à la diminution de PINP et de PIIINP dans le groupe spironolactone serait que cet antagoniste de l'aldostérone contribuerait à limiter l'augmentation de la fibrose par diminution de la synthèse de collagène de la matrice.

Dans notre étude, les concentrations d'ICTP ne varient pas non plus de manière significative au cours du suivi et aucune différence n'est observée entre les 2 groupes.

Dans l'étude de *Garcia-Bolao et al* (154), menée de façon prospective sur 73 patients avec une IC et un asynchronisme du VG, des résultats similaires sont retrouvés avec l'absence de différence significative entre les concentrations d'ICTP initiales et à un an, que ce soit chez les répondeurs ou les non-répondeurs (les répondeurs étant considérés comme les patients ayant augmentés la distance marchée en 6 minutes de plus de 10 % au terme d'un an de suivi). Concernant l'évolution du MMP-1 et bien que les TIMPs n'aient pas été dosés dans notre étude, il a été précédemment rapporté que les concentrations de MMP-1 augmentent dans l'IC et que cette augmentation surpasse habituellement les modestes modifications des concentrations de TIMP-1 (202). Dans la présente étude, comme dans l'étude RALES (113), les concentrations de MMP-1 n'évoluent pas de manière significative durant le suivi.

Dans l'étude de *Garcia-Bolao et al* (154), les concentrations de MMP-1 augmentent significativement à 1 an chez les répondeurs ( $p = 0.032$ ) mais pas chez les non-répondeurs ( $p = 0.471$ ). La différence à un an sur l'ensemble des patients n'est pas significative non plus (0.875) (154).

L'étude d'*Umar S. et al* (205), avait pour but d'évaluer si le métabolisme myocardique du collagène chez 64 patients avec une IC était impliqué dans le remodelage inverse du VG et la réponse à la TRC. Les concentrations sériques de PINP, PIIINP et ICTP ont été analysées avant l'instauration de la TRC et 6 mois après. Soixante-douze % des patients ont diminué de plus de 10 % le volume télédiastolique du VG après 6 mois de suivi et ont été défini comme des répondeurs. La concentration initiale moyenne de PINP était significativement inférieure chez les répondeurs par rapport aux non répondeurs. Ces répondeurs montraient une augmentation moyenne significative des concentrations de PINP et PIIINP entre 0 et 6 mois alors qu'aucune évolution significative n'était observée chez les non répondeurs. Les concentrations initiales d'ICTP dans les 2 groupes ne montraient pas de différence significative, de même que l'évolution au cours des 6 mois de suivi. Les auteurs ont conclu que le remodelage inverse du VG après l'instauration de la CRT était associé à une augmentation de la synthèse de collagène au cours des premiers 6 mois de suivi.

Les conclusions de ces 2 études (154, 205) sont à interpréter avec précaution au vu du faible nombre de patients et de l'absence d'un groupe témoin permettant la comparaison et l'affirmation de tels résultats.

Dans notre population, l'association d'une synthèse et d'une dégradation stable des collagènes de type I et III correspondrait à une stabilisation de la fibrose, suggérant que la fibrose cardiaque est un processus évolutif s'aggravant au cours de la progression de l'IC, et pouvant être maîtrisée par un traitement adéquat. L'introduction de la TRC en plus du traitement

optimal ne semble pas avoir d'influence supplémentaire sur la fibrose et le remodelage cardiaque au vu de nos résultats.

Néanmoins, l'ensemble de ces études suggère que la TRC n'est pas reliée à des modifications majeures dans la dégradation des fibres de collagène de type I dans le cœur des patients IC, ni en supprimant l'équilibre MMP-1/TIMP-1 ni en limitant la dégradation du collagène. Il est donc peu probable que ce traitement affecte la qualité du collagène au cours du processus de remodelage cardiaque. Les études à l'avenir devraient évaluer simultanément l'activité des métalloprotéinases avec leurs inhibiteurs naturels chez les patients IC.

#### **5.4.2. DANS L'IC EN PHASE AIGUË, ETUDE EPHESUS**

Dans l'étude EPHESUS, on observe des variations significatives des concentrations de PIIINP au cours du suivi ( $p = 0.001$ ) et l'éplérénone freine significativement la synthèse de PIIINP par rapport au groupe placebo à partir du 6<sup>ème</sup> mois. L'aldostérone favorise la fibrose cardiaque dans des modèles expérimentaux (206) et sur l'homme (83, 207).

Des résultats similaires avec la spironolactone avaient été montrés dans l'étude RALES (113) sur l'IC chronique avec dysfonction systolique du VG. Les concentrations des biomarqueurs de synthèse de la fibrose étaient associées au pronostic et diminuaient significativement durant les 6 mois de suivi chez les patients traités par spironolactone (113).

Une autre étude avait montré précédemment une réduction des volumes et masses du VG ainsi qu'une diminution des concentrations plasmatiques de BNP et PIIINP chez des patients traités pendant 4 mois par spironolactone (208).

Dans une étude sur des patients après un IDM (209), l'administration de canrénoate de potassium, le métabolite actif de la spironolactone, en plus d'un IEC, améliorait significativement la FEVG et la dilatation du VG était significativement diminuée dans le groupe traité par cet antagoniste de l'aldostérone. De plus, les concentrations de PIIINP dans le groupe traité par canrénoate de potassium étaient significativement inférieures. Il a été suggéré que le traitement par un antagoniste de l'aldostérone associé à un IEC pouvait prévenir le remodelage du VG post-IDM tout en diminuant le marqueur de synthèse du collagène, comparé au traitement par IEC seul.

Les résultats des présentes études ouvrent des perspectives d'un point de vue thérapeutique si on considère les concentrations du biomarqueur du collagène PIIINP comme un critère intermédiaire de réponse au traitement par un antagoniste de l'aldostérone. De plus comme les résultats de l'étude RALES sur les biomarqueurs et ceux d'EPHESUS semblent le suggérer,

le PIIINP pourrait être exploré comme une cible thérapeutique dans le traitement de l'IC chronique, puisqu'en freiner la synthèse est associé à des bénéfices en termes de pronostic.

Il faut noter également que dans l'étude EPHEBUS, la combinaison de concentrations initiales élevées d'ICTP et de concentrations basses de BNP et réciproquement n'étaient pas associées à la survenue d'évènement, suggérant que seule la combinaison d'une dégradation augmentée de la MEC et d'un étirement myocytaire peuvent prédire la survenue d'évènements. L'association de ces 2 mécanismes pourrait représenter une cible thérapeutique intéressante dans l'IC en phase aiguë.

### **5.4.3. PREDICTEUR DE LA REPONSE AU TRAITEMENT**

Certains des effets bénéfiques de la TRC pourraient être liés à sa capacité à induire une régression de la fibrose cardiaque sévère. L'activation asynchrone ventriculaire entraîne une dilatation du VG et une réduction de la FE ainsi qu'une redistribution du flux sanguin myocardique par plusieurs voies, y compris des modifications de la composition du tissu myocardique (138, 147, 148). L'accumulation de tissu fibreux est une des caractéristiques essentielles des changements défavorables de la structure du tissu cardiaque. Plusieurs études ont montré qu'une fibrose myocardique histologiquement prouvée était associée à une dilatation du VG et une baisse de la FE (114).

Il a été démontré que la TRC entraînait une réduction significative des fibres de collagène cardiaque (153). Des études sur des échantillons de biopsies myocardiques ont montré que la fibrose était l'une des caractéristiques majeures du remodelage dans les maladies de la conduction cardiaque et avaient établi une relation entre l'accumulation du collagène et le ralentissement de la conduction électrique (146).

Nos travaux sur les biomarqueurs du collagène dans l'étude CARE-HF avaient donc pour objectif de trouver un outil permettant de discriminer les patients répondeurs à la TRC, notre hypothèse étant basée sur le fait que la fibrose pouvait être liée à l'asynchronisme, les patients présentant le plus de fibrose étaient aussi les plus asynchrones et donc les plus à même de profiter des bénéfices de la TRC.

Une étude menée sur 73 patients avec une IC et un asynchronisme du VG a analysé l'hypothèse selon laquelle le turnover du collagène de type I avait une influence sur la réponse à long terme de la TRC (154). Mais cette étude n'avait pas prévu de recruter un groupe contrôle et a néanmoins conclu que chez les patients répondeurs, la TRC semblait normaliser les concentrations sériques du peptide carboxy-terminal du procollagène de type I (PICP)

(154), peptide libéré durant la synthèse du collagène de type I, qui est associé à l'importance du dépôt myocardique de fibrilles de collagène de type I chez des patients IC (114). Elle a aussi conclu que non seulement le turnover du collagène de type I avait un impact sur la réponse au traitement mais également que la capacité de la TRC à restaurer la balance synthèse/dégradation du collagène de type I était associée à une réponse positive. Ces conclusions sont à interpréter avec précaution au vu du faible nombre de patients et de l'absence d'un groupe témoin permettant la comparaison et l'affirmation de tels résultats.

Chez les patients avec biomarqueurs de l'étude CARE-HF, nous n'avons pas non plus réussi à mettre en évidence parmi les biomarqueurs du collagène et le NT-ProBNP, un prédicteur de la réponse au traitement. Néanmoins, l'exploration de l'hypothèse selon laquelle l'un des mécanismes contribuant aux effets cliniques de la TRC pourrait passer par l'amélioration du remodelage matriciel, reste une voie intéressante à étudier dans une population plus nombreuse avec une distribution plus large de la valeur de l'intervalle QRS.

## **5.5. AVANTAGES ET LIMITES DE NOS TRAVAUX**

Il convient d'analyser nos résultats d'un point de vue critique et de rappeler les différentes limitations à apporter à leur interprétation et extrapolation.

### **5.5.1. POPULATIONS**

L'un des avantages de ces travaux est que la mesure des biomarqueurs du collagène de la MEC a été réalisé sur des échantillons de patients issus d'essais contrôlés, EPHEBUS et CARE-HF comportant des populations bien sélectionnées s'appuyant sur des critères d'inclusion précis. Les patients de ces 2 essais étaient inclus de façon randomisée, ce qui permet de tenir compte de l'influence du traitement à l'étude puisque les groupes sous traitement et les groupes contrôle étaient censés être comparables. Cela s'est confirmé lors de l'analyse de notre sous-groupe de patients issus de l'étude CARE-HF mais n'a malheureusement pas été possible avec les patients de l'étude EPHEBUS. En effet, bien que la population ait été également randomisée, le hasard a joué contre nous dans le sous-groupe de patients pour lequel les biomarqueurs du collagène ont été mesurés puisque les patients sous placebo et ceux sous éplérénone n'étaient pas comparables pour certaines caractéristiques initiales.

Un autre inconvénient des essais contrôlés est que les populations, bien qu'homogènes, ne sont pas représentatives de la population générale puisque sélectionnées sur des critères

précis. Les résultats de l'ensemble de ses études ne doivent donc être extrapolés qu'avec beaucoup de prudence à une population générale non ciblée avec une IC.

### **5.5.2. CHOIX DES BIOMARQUEURS**

Il faut d'abord noter que nous avons effectué l'ensemble des analyses dans le même laboratoire, avec le même matériel ce qui assure une standardisation de nos mesures.

A l'inverse, l'une des principales limitations à nos travaux est l'absence de mesure de la balance MMP/TIMP à cause de l'insuffisance du volume d'échantillons disponibles. Nos résultats, s'ils permettent de conclure à un excès de synthèse ou de dégradation dans nos populations par le biais d'autres biomarqueurs, ne permettent cependant pas de mettre en évidence les mécanismes fins de régulation du turnover collagénique avec l'intervention de différentes métalloprotéinases, en particulier des collagénases.

Plusieurs études se sont intéressées aux gélatinases MMP-2 et MMP-9 chez des patients après un IDM (210-213) et ont montré qu'elles présentaient des variations significatives de leur concentration après un IDM et que la concentration circulante d'activité de MMP-2 était prédictive du remodelage du VG (210, 213). De la même façon, MMP-9 augmente jusqu'à un pic dans les 12 heures suivant l'IDM mais diminue ensuite et se stabilise à des concentrations qui persistent pendant plusieurs mois : des concentrations élevées de ce plateau sont associées à une amélioration de la FEVG et une diminution du remodelage du VG au cours du temps (212). En s'appuyant sur les résultats obtenus dans l'étude EPHEBUS, l'une de ces études a analysé les effets de l'éplérénone sur le remodelage du VG par la mesure des concentrations des gélatinases MMP-2 et MMP-9 chez 100 patients présentant une dysfonction systolique du VG après un IDM mais sans symptômes d'IC ou de diabète (211). Les résultats de cette étude ont montré que c'est seulement après ajustement sur 15 covariables (dont l'âge, l'HTA, la dyslipidémie, le DFG, l'index du volume télésystolique du VG, l'index du volume de l'infarctus, le traitement par des  $\beta$ -bloquants...), que l'éplérénone diminuait significativement la concentration de MMP-2 par rapport au groupe placebo.



## **6. PERSPECTIVES**

### **6.1. HYPOTHESES ET OBJECTIFS**

#### **6.1.1. LA COMPREHENSION DES MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE**

L'un des objectifs des travaux de notre équipe sur les biomarqueurs du collagène de la MEC, est de comprendre le rôle de la fibrose myocardique, telle qu'évaluée par la mesure de ses biomarqueurs dans la physiopathologie de l'IC, y compris dans des phases précoces.

Notre hypothèse était que l'évaluation des biomarqueurs de la MEC pourrait suggérer des mécanismes par lesquels la fibrose influencerait l'histoire naturelle de l'IC et permettrait d'étudier le rôle de la fibrose dans son étiologie.

##### **6.1.1.1 Dans l'IC suite à une HTA**

Chez des patients hypertendus, il avait été mis en évidence que la synthèse de collagène était augmentée et sa dégradation diminuée (97, 214). Nous nous sommes posés la question de savoir si la fibrose pouvait intervenir de façon significative dans l'IC via le processus d'hypertrophie VG comme c'est le cas dans la maladie hypertensive.

Notre équipe a donc étudié la transition de l'HTA à l'IC par le biais des biomarqueurs (123). L'HTA et le diabète prédisposent individuellement à l'IC chronique, les patients avec les 2 pathologies présentent un risque augmenté de développer une IC (3). Chez ce type de patients, nous avons émis l'hypothèse que des modifications précoces de la MEC cardiaque, reflétées par l'analyse des biomarqueurs de synthèse et de dégradation, pouvaient apparaître chez des patients à haut risque avant que l'IC ne soit détectable. Nous avons pour cela comparé les biomarqueurs du turnover de la MEC chez des patients avec une IC et une dysfonction systolique avec ou sans diabète, des patients avec une HTA et des sujets sains (123). Nous avons mis en évidence que des modifications du turnover du collagène pouvaient survenir précocement dans le processus pathologique chez des patients à haut risque avec un diabète et une HTA avant que l'IC ne soit détectable (123).

La mesure des biomarqueurs de la fibrose chez les patients recrutés dans les cohortes du Network of Excellence (NoE) et Stanislas (voir chapitres 6.2.2.1 et 6.2.2.2) nous permettra de confirmer ces résultats.

### **6.1.1.2 Dans l'IC suite à une ischémie chronique**

Chez des patients avec une maladie coronaire artérielle, l'ischémie, persistant malgré le traitement et évaluée par scintigraphie [exercice thallium-201 Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) Imaging], aggrave le pronostic à long terme (215). Radauceanu A. *et al* (171) ont par la suite exploré le rôle du remodelage matriciel dans ce processus pour déterminer si la synthèse ou la dégradation des biomarqueurs sériques du collagène reflétaient un remodelage actif de la MEC chez ces patients. Ils ont montré que l'ischémie (évaluée par scintigraphie) était associée à une augmentation du turnover du collagène de type III avec une augmentation des concentrations de PIIINP, indépendamment des traitements concomitants, et même chez des patients présentant une FEVG normale. Il a été suggéré à la suite de cette étude que des concentrations augmentées de PIIINP pouvaient être associées au processus de remodelage inverse à long terme même lorsque la fonction cardiaque ne paraît pas initialement affectée (171).

### **6.1.1.3 Dans l'IC suite à un IDM**

Les travaux que nous avons effectués chez les patients de l'étude EPHEBUS ont montré qu'il pouvait exister une étiologie de fibrose dans l'évolution de l'IC post-IDM avec une variation significative des biomarqueurs de la fibrose chez les patients au cours du suivi, particulièrement dans le premier mois après la survenue de l'IDM (86).

Les résultats de ces travaux ont suscité une nouvelle interrogation. En effet, dans les études sur l'IC chronique, c'est par voie de synthèse que la fibrose semble intervenir dans la physiopathologie évolutive de l'IC. A l'inverse, dans l'étude EPHEBUS sur l'IC en phase aiguë, la dégradation de la MEC joue un rôle prépondérant. L'étiologie de l'IC pourrait donc influencer la voie (synthèse ou dégradation) par laquelle la fibrose participe au mécanisme de l'IC. La mesure des biomarqueurs de la MEC des populations de l'étude Epidémiologie et Pronostic de l'IC Aigue en Lorraine (EPICAL II) (cohorte populationnelle) et de l'essai clinique EVEREST chez des patients présentant un syndrome d'IC Aiguë (SICA) pourraient éclaircir et confirmer cette observation.

## **6.1.2. LE LIEN ENTRE LES BENEFICES CLINIQUES DU TRAITEMENT ET LE REMODELAGE MATRICIEL**

Nos travaux avaient également pour objectif de vérifier si la correction thérapeutique et le bénéfice clinique apportés par les traitements modernes de l'IC pouvaient être reflétés par la mesure des biomarqueurs de la fibrose. L'identification de ces biomarqueurs ouvrirait des

orientations nouvelles en terme de cible thérapeutique. C'est le cas du marqueur de synthèse PIIINP dont la limitation semble avoir des bénéfices et être l'une des voies par laquelle les antagonistes de l'aldostérone exercent leurs effets, au vu des résultats de l'étude RALES sur les biomarqueurs (113), appuyés par les résultats de l'étude EPHESUS présentés dans ce travail (86).

### **6.1.3. L'ESTIMATION PRONOSTIQUE ET LA STRATIFICATION DU RISQUE**

Nous avons rapporté dans l'étude RALES (113, 115) que les concentrations sériques du marqueur de synthèse PIIINP chez des patients IC chroniques avec une dysfonction systolique étaient significativement associées à la mortalité. Les études RECOVER et CARE-HF sur les biomarqueurs (115) (246) dans l'IC chronique venaient s'inscrire dans la continuité de ce travail avec une association entre les concentrations initiales de PIIINP et la survenue d'évènements.

L'étude EPHESUS chez des patients en phase aiguë après un IDM a montré que la combinaison de concentrations initiales d'ICTP et de BNP supérieures à leur médiane respective était associée à la survenue d'évènements (86).

L'hypothèse que notre équipe souhaite encore explorer, serait que la fibrose pourrait aider à comprendre les mécanismes de la défaillance myocardique par défaut de la fonction pompe mais aussi suite à une hétérogénéité tissulaire dans les cas d'asynchronisme ou encore les mécanismes liés à la mort subite.

Chez des patients avec un IDM aigu, Hayashi *et al.* ont déjà montré une corrélation significative entre l'évolution à 1 mois du volume télédiastolique du VG et l'évolution à 1 mois des concentrations de PIIINP (209). Une étude récente (216) a également montré que chez des patients présentant une IC stable avec une dysfonction systolique, des pressions de remplissage du VD élevées sont associées à une activité de turnover matriciel augmentée reflétée par les concentrations de PIIINP (216), suggérant que le turnover de la MEC est impliquée dans la progression accélérée vers l'IC congestive.

Notre équipe débute seulement à analyser cette hypothèse.

Dans la population de l'étude CARE-HF nous disposons de données indiquant le remodelage ventriculaire [volumes télédiastoliques et télésystoliques, TAPSE (Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion) qui est une mesure de la fonction du VD] nous permettant d'effectuer le même type de travail pour vérifier la relation entre fibrose (hétérogénéité tissulaire) et asynchronisme.

Les travaux de Blangy H. *et al* (217) avaient abordé l'analyse des biomarqueurs dans les arythmies ventriculaires, causes principales de la mort subite. Le but de cette étude était d'analyser les relations éventuelles entre la fibrose myocardique reflétée par les biomarqueurs du collagène de la MEC, la surcharge en pression par le biais du BNP, l'inflammation par la mesure de la hs-CRP et l'incidence des tachycardies ventriculaires chez des patients atteints d'une maladie coronaire artérielle (217). Les résultats de ce travail ont montré que la combinaison entre des concentrations basses de PIIINP et de concentrations élevées de PINP représentait un marqueur indirect des conditions mécaniques et physiopathologiques prédisposant à la survenue d'une tachycardie ventriculaire chez ce type de patients.

Il faudrait pouvoir étayer ces résultats dans une population avec un grand nombre d'évènements et en particulier de mort subite.

#### **6.1.4. LA DECISION ET LA SURVEILLANCE THERAPEUTIQUE**

Les objectifs de notre équipe consistent également à étudier l'utilisation potentielle des biomarqueurs de la MEC comme :

- outil de décision thérapeutique, ou, comment aider le clinicien à discriminer les patients les plus à même à bénéficier d'un traitement en fonction des concentrations d'un biomarqueur du collagène.
- outil de surveillance thérapeutique ou comment un biomarqueur du collagène pourrait refléter la réponse intermédiaire à un traitement donné.

Nous n'en sommes pour l'instant qu'aux débuts des investigations avec les résultats de l'étude RALES suggérant que les patients les plus fibreux à l'instauration du traitement par spironolactone sont les plus aptes à y répondre favorablement (113). La baisse des concentrations des biomarqueurs de synthèse à partir de 6 mois dans le groupe traité par éplérénone dans l'étude EPHESUS pourrait poser les bases de l'utilisation de PINP et PIIINP comme critères de réponse intermédiaire au traitement par éplérénone (86).

Une étude de l'expression des gènes codant pour les collagènes de la MEC, mais aussi pour les MMPs/TIMPs, la fibronectine et le TGF- $\beta$ , chez des patients avec IC auxquels un dispositif d'assistance du VG (combiné à un traitement optimal de l'IC) a été implanté (218), a montré que les patients qui n'avaient pas récupéré grâce au dispositif avaient une expression myocardique augmentée des gènes pro-fibrotiques au moment de l'implantation (218). Chez les patients qui ont bénéficié cliniquement de l'implantation du dispositif, des concentrations augmentées au moment de retirer le dispositif étaient négativement associées à la FEVG.

Néanmoins, la récupération myocardique ne nécessitait pas obligatoirement une diminution des marqueurs pro-fibrotiques (218).

Enfin, une étude récente chez des patients IC avec FE préservée et dysfonction diastolique (dont la fibrose est une caractéristique majeure) (117) a montré que les MMP-2 pourraient se révéler plus utiles que le BNP dans l'identification de tels patients. Ces résultats suggèrent qu'à l'avenir, les biomarqueurs du collagène de la MEC pourraient également aider au diagnostic et à la classification du type d'IC (117).

## **6.2. APPROCHES**

### **6.2.1. CHOIX DES BIOMARQUEURS**

Dans la continuité des travaux antérieurs effectués, notre équipe poursuit ses investigations sur les biomarqueurs de la MEC pour approcher le phénomène de remodelage ventriculaire.

Mais d'autres biomarqueurs se sont imposés comme importants à explorer en parallèle de ces biomarqueurs dans les pathologies cardiovasculaires. Des études récentes montrent que l'utilisation de plusieurs types de marqueurs au lieu d'un pourrait être utile (57, 59, 219, 220). Les peptides natriurétiques sont déjà considérés comme prometteurs mais d'autres biomarqueurs du stress myocytaire comme l'adrénomédulline et le ST2, des marqueurs des lésions myocytaires comme les troponines I et T, des marqueurs de la fonction endothéliale comme les métabolites du NO, les marqueurs de l'inflammation (CRP, plusieurs IL et TNF- $\alpha$ ) sont de plus en plus étudiés. Ainsi, l'étude des biomarqueurs de l'inflammation en association à ceux du collagène pourrait nous permettre de déterminer si la fibrose n'est qu'un processus secondaire à un évènement inflammatoire ou si elle tient un rôle important dans la progression de l'IC.

Notre équipe s'intéresse actuellement à la Galectine-3 (Gal-3). La Gal-3 est une protéine initialement identifiée dans les macrophages (221) mais qui est également exprimée dans d'autres types cellulaires et tissulaires comme l'aorte et le cœur (222, 223). La Gal-3 interagit avec différents ligands situés dans la MEC comme la laminine, le collagène, l'élastine, la fibronectine et les intégrines (224). Elle module la migration cellulaire, l'interaction cellule-cellule, le cycle cellulaire et l'apoptose (225). L'expression de la Gal-3 myocardique est augmentée dans les hypertrophies du VG et les IC chez des rats transgéniques homozygotes pour le gène TGRmRen2-27 (rat Ren-2) (223). De plus, ces rats traités par la Gal-3 montrent une augmentation de la fraction du collagène myocardique et une FE diminuée, suggérant un rôle de la Gal-3 dans l'altération de la fonction cardiaque (223). Des données *in vitro* sur des

fibroblastes cardiaques ont également confirmé les effets pro-fibrotiques de la Gal-3 (223). Une étude sur des souris mutées inactivées pour le gène de la Gal-3 ont montré qu'elles étaient protégées de la fibrose rénale et présentaient un dépôt de collagène moindre au niveau du foie en réponse à des stimuli nocifs (226, 227). D'un autre côté, une expression de Gal-3 augmentée a été décrite dans l'aorte de souris mutées inactivées pour le gène de l'apolipoprotéine E sous régime pro-athérosclérotique (228). La Gal-3 emprunte des voies intracellulaires communes à d'autres molécules pro-fibrotiques comme la cardiotrophine 1, l'aldostérone et l'angiotensine II. De plus, ces molécules contrôlent certains ligands extracellulaires de la Gal-3 dans les fibroblastes cardiaques et les cellules des muscles vasculaires lisses. Des études cliniques ont montré une augmentation des concentrations plasmatiques de Gal-3 chez des patients en IC aiguë (229) (augmentation associée à une augmentation de la mortalité) et chez des patients en stade terminal d'IC (230).

Nous avons émis l'hypothèse que la Gal-3 pourrait être un médiateur de molécules pro-fibrotiques (comme la cardiotrophine 1, l'aldostérone ou l'angiotensine II) impliquées dans la transition de l'HTA à l'IC, le remodelage cardiaque et des grosses artères, la dysfonction VG et représenter une cible thérapeutique des stades très précoces de l'IC. Il existe déjà des inhibiteurs de la Gal-3 comme le Thalidomide, d'autres sont actuellement en cours de développement. Les patients de l'étude CARE-HF ainsi que ceux de la cohorte Stanislas serviront de base à l'analyse de l'implication de la Gal-3 dans la progression et la physiopathologie de l'IC.

### **6.2.2. CHOIX DES POPULATIONS**

Afin d'explorer les hypothèses et objectifs développés au chapitre précédent, nous avons actuellement en projet ou en cours d'analyse des échantillons de populations diverses, provenant soit d'études épidémiologiques populationnelles comme NoE, Stanislas et EPICAL II, soit d'études cliniques comme EVEREST, AURORA (A Study to Evaluate the Use of Rosuvastatin in Subjects on Regular Hemodialysis : An Assessment of Survival and Cardiovascular Events) et HF-ACTION (Heart Failure : A Controlled Trial Investigating Outcomes of Exercise Training).

Les études épidémiologiques pourront nous aider à approfondir la physiopathologie de l'IC et étudier le rôle de la fibrose dans le stade évolutif et la transition vers l'IC. De plus, le matériel ADN collecté chez ces patients nous fournira une base pour étudier le déterminisme génétique

de l'IC et le polymorphisme des gènes codant pour les biomarqueurs de la MEC, domaine que nous n'avons pas encore exploré à ce jour.

Les populations d'essais cliniques comme EVEREST et AURORA pourraient nous permettre d'appuyer et confirmer en plus de l'aspect physiopathologique de la fibrose dans l'IC, le potentiel pronostique et l'utilisation des biomarqueurs de la MEC comme cible thérapeutique et comme outil de décision et surveillance des traitements.

#### **6.2.2.1 Réseau European In Genious HyperCare Network of Excellence (NoE)**

Le but du réseau European In Genious HyperCare Network of Excellence [sixième Project for Conflict Resolution and Development (PCRD)] est d'étudier les bases génomiques (approches gènes candidats et issues de wide genome scans) et protéomiques de la prédisposition à l'HTA et à ses complications cardio-vasculaires et rénales. Ce projet comporte une étude transversale ainsi qu'une étude de suivi avec plusieurs milliers de sujets (issus de 1000 familles à risque de développer une HTA) chez qui seront étudiés de nombreux génotypes et phénotypes, pour explorer la physiopathologie de l' HTA et des maladies cardio-vasculaires et rénales qui y sont liées.

Le Centre d'Investigation Clinique (CIC) du CHU de Nancy coordonne plus spécifiquement la partie du réseau consacrée à l'étude de la transition vers l'insuffisance cardiaque [Joint Research Project (JRP) B3, 13 équipes européennes : coordonnateurs Faiez Zannad, Nancy et Javier Diez, Pampelune). Le CIC participe à un protocole intitulé : « Prédisposition à l' HTA et mécanismes de transition de l'hypertension vers la microalbuminurie et l'insuffisance cardiaque ». Il s'agit d'une étude transversale et prospective (à 2 et 4 ans) visant à recruter une cohorte multicentrique familiale. Le recrutement a débuté au 3ème trimestre 2008 et la période théorique de recrutement devrait durer 2 ans. L'objectif de cette étude est d'analyser les mécanismes impliqués dans la prédisposition à l'HTA (approche génomique), et ceux impliqués dans l'évolution vers la microalbuminurie et l'insuffisance cardiaque (génomique et protéomique). Les objectifs secondaires seront d'analyser les facteurs protéomiques associés à la prédisposition à l'HTA ; d'étudier l'influence du stress oxydatif et de la micro-inflammation ; d'étudier les facteurs génétiques, génomiques et protéomiques associés aux phénotypes rénaux (excrétion protéique urinaire, IR, sensibilité au sel), et à l'existence ou la survenue d'une dysfonction ou d'une insuffisance cardiaques au cours de l'HTA. Un nombre total de 1000 familles (dont 50 à Nancy) avec un maximum de 5 volontaires par famille [un sujet hypertendu, 3 personnes de son entourage au premier degré et son/sa conjoint (e)] soit 4000 sujets (dont 250 à Nancy) sera inclus dans l'étude. Parmi les 3 sujets de la famille, l'un

au moins doit présenter une HTA et l'un au moins doit être d'une génération différente du sujet « index ». Le phénotypage détaillé de ces patients « index » et des membres des familles comprendra l'analyse des marqueurs de la micro inflammation, des marqueurs de la fonction et des lésions rénales, des marqueurs de la croissance, du remodelage, de la dysfonction et de l'insuffisance cardiaque et des grandes artères.

#### **6.2.2.2 Cohorte Stanislas**

La réalisation des objectifs du JRPB3 fera également appel à la cohorte Stanislas (231, 232). Il s'agit d'une cohorte monocentrique familiale longitudinale de 1006 familles (4295 sujets) de la région de Nancy recrutée en 1993-1995 au Centre de Médecine Préventive (CMP) de Vandoeuvre-lès-Nancy à l'occasion d'un examen périodique (quinquennal) de santé, sous l'égide de la Caisse Nationale d'Assurance Maladie (CNAM). Cette cohorte a été mise en place avec pour objectif principal la recherche des interactions gène-gène et gène-environnement dans le domaine des maladies cardio-vasculaires, et ce, en se basant sur l'étude de la variabilité inter-individuelle et du déterminisme familial de phénotypes intermédiaires biologiques et morphologiques du risque cardio-vasculaire. Le caractère longitudinal de cette étude doit permettre de prendre en compte l'évolution des phénotypes intermédiaires en relation avec les facteurs génétiques tout au long du suivi. Les familles, composées des deux parents et d'au moins deux enfants biologiques étaient supposées saines, exemptes de maladie aiguë et/ou chronique déclarée afin de pouvoir évaluer l'effet de la génétique sur la variabilité des phénotypes intermédiaires étudiés dans des conditions physiologiques sans l'influence de la pathologie. La Cohorte Stanislas est au niveau national et international, la seule cohorte familiale longitudinale de sujets supposés sains d'une telle envergure.

En 2003, lors de la troisième visite, 1200 personnes formant 357 familles ont été recrutées avant suspension du recrutement, le CMP ayant décidé d'interrompre ses activités de recherche. Cette 3<sup>ème</sup> visite a néanmoins permis d'étendre la collection d'échantillons biologiques, puisqu'aux ADN thèque et plasmathèque ont été ajoutées une ARN thèque et une banque d'extraits cellulaires de lymphocytes visant à permettre l'étude des relations entre facteurs génétiques et phénotypes intermédiaires biologiques de l'inflammation. En 2008, une convention a été ratifiée entre le CMP, le CHU de Nancy, l'Université de Nancy, et l'INSERM, visant à transférer l'ensemble des données et collections de la Cohorte Stanislas sous la responsabilité du CHU de Nancy, qui en devient le promoteur, au CIC de Nancy (232).



Une quatrième visite envisagée en 2010-2011, pourrait permettre de compléter les données cliniques, biologiques et morphologiques, en intégrant l'influence de l'avancée en âge (âge moyen des parents en 1993 : 45 ans et en 2010 : 59 ans), et l'augmentation croissante de la prévalence du syndrome métabolique (SM), puisque dès la deuxième visite, chez une centaine de familles, au moins un membre de la famille présentait un SM selon la définition du National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III (NCEP-ATPIII). Environ 20 % des adultes présentaient une HTA, et 50 % avaient un index de corpulence supérieur à 25 kg/m<sup>2</sup>. Le but de notre équipe sera encore une fois d'analyser dans cette cohorte les mécanismes génomiques impliqués dans l'évolution de l'HTA vers l'IC ainsi que les mécanismes impliqués dans l'évolution de l'HTA vers l'IC par une approche de protéomique différentielle sur plasma et urines et étude des biomarqueurs de l'inflammation, de la croissance du remodelage, de la dysfonction et de la défaillance du cœur et des artères de grand calibre.

### **6.2.2.3 Etude Epidémiologie et Pronostic de l'IC Aigue en Lorraine II (Epical II)**

L'autre étude qui pourrait servir de base à la validation des biomarqueurs du collagène comme outil d'évaluation, de pronostic et de suivi dans la population générale pourrait être l'étude EPICAL II inspirée des précédents travaux de l'étude EPICAL.

L'étude EPICAL était une étude prospective, observationnelle, épidémiologique, populationnelle réalisée pour analyser l'incidence, la qualité de vie, le pronostic et l'utilisation des ressources de prise en charge associées à l'IC sévère chez des patients en Lorraine (233). Au total 2576 patients ont été enregistrés entre le 1<sup>er</sup> janvier 1994 et début 1995 en présentant à l'admission à l'hôpital des antécédents et/ou des symptômes compatibles avec un diagnostic d'IC sévère. Parmi eux, 499 patients ont présenté l'ensemble des critères d'inclusion : patients âgés de 20 à 80 ans, vivant en Lorraine, admis à l'hôpital en 1994, avec un diagnostic d'IC sévère (définie par au moins une hospitalisation sur une période de 1 an avec une IC de classe NYHA III ou IV, des signes radiologiques et cliniques de congestion pulmonaire, et/ou des signes d'œdème périphérique, une FEVG < 30 % ou un ratio cardiothoracique > 60 %). Ces patients étaient inclus dans l'étude EPICAL et suivis pendant 1 an pour analyser leurs caractéristiques initiales, l'incidence de l'IC congestive sévère, son étiologie, la survenue d'évènements, la survie et le taux de ré-hospitalisation (233). Les résultats de cette étude ont mis en évidence la nécessité de ré-organiser les modalités de prise en charge des patients IC autour d'une approche pluridisciplinaire. Elle a permis de montrer les interactions complexes

existant entre IC et IR et l'éventualité que l'amélioration du pronostic de l'IC pourrait passer par le traitement de la dysfonction rénale (233).

Faisant suite à cette étude et s'appuyant sur ses acquis, a été le projet EPICAL II [*protocole EPICAL II version du 27/10/2008\_ Investigateur coordonnateur: Professeur François Alla, PU-PH Centre d'Epidémiologie Clinique (CIC-EC, INSERM-CHU) CHU de Nancy*]. C'est une étude épidémiologique, observationnelle, multicentrique, prospective, populationnelle à visée descriptive, pronostique et évaluative. Cette étude comprend dans un premier temps un enregistrement exhaustif des cas sur un territoire donné (la Lorraine), puis à partir des patients enregistrés la constitution d'une cohorte longitudinale de patients comprenant un suivi d'au moins 3 ans. Cette étude inclura des patients adultes hospitalisés pour SICA ou développant un SICA en cours de séjour dans les services de soins intensifs, réanimation, cardiologie ou gériatrie des établissements hospitaliers de Lorraine en 2010 et les patients adultes décédés en 2010 au service d'accueil des urgences (SAU) ou pendant le transfert au SAU, avec un diagnostic de prise en charge de SICA. L'effectif attendu s'élève à 4500 patients éligibles sur l'année. Une collection biologique sera organisée lors des visites (ADN, ARN, sérum, plasma et urine). Elle permettra d'étudier le rôle des biomarqueurs identifiés par des méthodes de génomique (dont Genome Wide Association Studies), transcriptomique et protéomique différentielles ainsi que d'étudier les liens entre les résultats de certains dosages de biomarqueurs connus (BNP, NT-proBNP) ou nouveaux [pro-adrénomedulline, propeptide N-terminal du facteur atrial natriurétique (Pro-ANP), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)], de marqueurs génétiques, du stress oxydant et de l'inflammation, et autres biomarqueurs identifiés par une approche de protéomique différentielle et les différentes présentations cliniques du SICA incluant la structure et la fonction cardiaque et le pronostic cardiovasculaire du patient. On estime l'effectif des patients participants à la biobanque à 10 % sur la base du volontariat.

Les échantillons de plasma et de sérum collectés pourront servir de matériel pour mesurer les biomarqueurs de la MEC et constituer la première étude épidémiologique sur une base populationnelle pour les biomarqueurs chez des patients en IC sévère.

#### **6.2.2.4 Etude Multicenter, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled study to Evaluate the Long term Efficacy and Safety of Oral Tolvaptan Tablets in Subjects Hospitalized with Worsening Congestive Heart Failure (EVEREST)**

L'étude EVEREST est une étude internationale, multicentrique, randomisée, en double aveugle, placebo-contrôlée réalisée dans le but d'évaluer les effets et la sécurité à long terme d'une dose de 30 mg de Tolvaptan, un antagoniste des récepteurs V2 de la vasopressine, chez

des patients hospitalisés pour aggravation de leur IC. Les patients devaient présenter une FEVG réduite ( $\leq 40\%$ ), des signes d'une surcharge volumique, des symptômes NYHA III/IV (126).

Cet essai comportait en fait 3 études : 2 études identiques ayant pour but d'évaluer les effets à court terme sur le statut des patients et les symptômes, et une étude sur la survenue à long terme d'évènements sur l'ensemble des patients randomisés soit 4133. Deux mille soixante-douze patients étaient randomisés dans le groupe tolvaptan et 2061 dans le groupe placebo (126, 234).

Les résultats de cette étude n'ont pas montré de bénéfices du Tolvaptan instauré en traitement aigu des patients hospitalisés pour une IC sur la mortalité à long terme et sur la morbidité liée à l'IC (234).

Dans le cadre du SICA, les biomarqueurs de la MEC n'avaient pas encore été étudiés. Nous avons analysé l'ICTP circulant chez 126 patients traités par Tolvaptan et 125 patients sous placebo de l'étude EVEREST, pour étudier sa valeur potentielle de stratification du risque et sa valeur pronostique chez ce type de patients. Nous n'en sommes qu'aux résultats préliminaires et d'autres analyses statistiques sont encore à réaliser mais il semble qu'une dégradation augmentée du collagène soit associée à la fois à la sévérité des symptômes d'IC et à la survenue d'évènements, indépendamment de l'étiologie. Si nos résultats finaux confirment cette observation, ceci appuierait encore l'hypothèse que l'ICTP pourrait être une cible thérapeutique du remodelage matriciel.

#### **6.2.2.5 Etude A Study to Evaluate the Use of Rosuvastatin in Subjects on Regular Haemodialysis: An Assessment of Survival and Cardiovascular Events (AURORA)**

Le stade final de l'IR est caractérisé par un vieillissement cardiovasculaire accéléré entraînant une morbi-mortalité cardiovasculaire importante. Les statines réduisent l'incidence des évènements cardiovasculaire chez des patients à haut risque cardiovasculaire (235). Mais les effets de ces statines chez des patients hémodialysés n'avaient pas encore été étudiés avant l'essai AURORA (236). Il s'agit d'un essai international, randomisé, en double aveugle placebo-contrôlé réalisé dans le but d'évaluer les effets de 10 mg de rosuvastatine par jour chez 2776 patients avec une IR en stade terminal et sous hémodialyse (237). Le critère principal était un composite de la mortalité cardiovasculaire, des IDM non fatals et des accidents vasculaires cérébraux non fatals. Le suivi moyen était de 3.2 ans. Les résultats de cette étude ont montré une diminution de 43 % des concentrations de LDL-cholestérol chez

les patients traités par rosuvastatine, mais cette diminution ne s'est pas traduite en amélioration en terme de morbidité ou de mortalité (237).

Des modifications des concentrations plasmatiques des MMPs et TIMPs ont été rapportées dans la maladie rénale chronique à différents stades d'IR, incluant l'hémodialyse (238). Une étude prospective a montré que les concentrations plasmatiques de MMP-9 pouvaient prédire la survenue d'évènements chez des patients avec une maladie coronaire artérielle (239, 240). Chez des sujets sains ou des patients avec soit une HTA soit une maladie cardiovasculaire, les polymorphismes des gènes de la famille des MMPs et des TIMPs étaient associés à des phénotypes (épaisseur carotidienne intima media, rigidité artérielle) indépendamment associés à la survenue d'évènements cardiovasculaires, surtout chez des patients sous hémodialyse.

Nous avons donc décidé de réaliser une sous-étude de l'essai AURORA sur les patients du groupe placebo pour analyser les concentrations des MMPs (9 ; 2 ; 3 ; 7 ; 8 ; 13)/TIMPs et de leurs polymorphismes. L'hypothèse que nous avons émise est que les concentrations plasmatiques de MMP-9 peuvent prédire la survenue d'évènements chez des patients avec une IR chronique en stade terminal.

#### **6.2.2.6 Etude Heart Failure : A Controlled Trial Investigating Outcomes of Exercise Training (HF-ACTION)**

Il est recommandé aux patients ambulatoires avec une IC, médicalement stables d'exercer une activité physique. Mais aucune étude n'avait la puissance statistique nécessaire pour mesurer les effets de l'exercice physique sur les évènements cliniques. L'étude HF-ACTION a donc été réalisée. Il s'agit d'une étude randomisée, multicentrique réalisée pour évaluer l'impact de l'exercice physique sur la survenue d'évènements chez des patients IC chroniques de classe NYHA II à IV, avec une dysfonction du VG ( $FEVG \leq 35\%$ ) (241). Les patients faisaient de l'exercice physique (contrôlé) pendant 3 mois puis suivaient un régime.

L'exercice physique s'est montré sans risque supplémentaire pour le patient, mais n'a pas non plus entraîné de diminution significative sur la mortalité ou les hospitalisations toutes causes confondues (241)

En plus de répondre à des interrogations cliniques sur l'efficacité et la sécurité de l'exercice physique dans l'IC congestive, l'étude HF-ACTION fournit également une cohorte importante de patients avec IC congestive, avec une biobanque d'échantillons plasmatiques à l'inclusion, à 3 et 12 mois. Des analyses des concentrations de NT-ProBNP, de hs-CRP et de troponines T ont déjà été réalisées. Nous voulons analyser les biomarqueurs de synthèse et de dégradation de la MEC dans cette étude afin d'avancer dans notre compréhension des mécanismes de l'IC congestive au niveau matriciel mais également pour évaluer si l'exercice

physique peut avoir un effet sur le remodelage cardiaque, et les mécanismes potentiels de réponse à l'exercice physique.

## CONCLUSION

L'étude EPHEBUS sur les biomarqueurs a décrit pour la 1<sup>ère</sup> fois les cinétiques à long terme des biomarqueurs de la MEC chez des patients avec un IDM compliqué par une dysfonction systolique du VG et une IC chronique. Les concentrations des biomarqueurs variaient de façon significative au cours du suivi et l'éplérénone diminuait significativement les concentrations des biomarqueurs de synthèse du collagène pendant le suivi, impliquant que le turnover de la MEC est un processus actif chez les patients en IC chronique et que ce turnover peut être inhibé par un antagoniste de l'aldostérone. Les biomarqueurs de la MEC se sont montrés associés au BNP et à la hs-CRP confirmant l'intrication dans l'IDM de mécanismes de remodelage matriciel, de stretch myocytaire et d'inflammation. Enfin, l'association de concentrations élevées d'ICTP et de BNP était prédictive de la survenue d'évènements suggérant que le concept de remodelage et de progression de l'IC implique à la fois une dégradation augmentée du support matriciel et une augmentation de la tension pariétale du VG.

Chez les patients souffrant d'une IC modérée à sévère due à une dysfonction systolique compliquée par un asynchronisme cardiaque de l'étude CARE-HF, les concentrations des biomarqueurs du turnover du collagène de la MEC cardiaque ne montrent pas de modification significative au cours du suivi à 18 mois et le traitement par resynchronisation cardiaque ne l'influence pas significativement. Seul le marqueur neurohormonal NT-ProBNP est influencé bénéfiquement à long terme par la thérapie de resynchronisation cardiaque. Ces biomarqueurs sont liés de façon significative à différents déterminants de la sévérité de la maladie. PIIINP est significativement associé à la survenue d'évènements et ce de façon indépendante et donc complémentaire à l'information apportée par le NT-ProBNP. Ni le NT-ProBNP ni aucun des biomarqueurs du collagène ne se sont révélés pouvoir discriminer les patients les plus à même de bénéficier favorablement du traitement par resynchronisation cardiaque.

La validation et la confirmation de ces résultats pourraient passer par l'analyse des biomarqueurs de la MEC dans d'autres populations d'essais cliniques mais également dans des cohortes populationnelles dans le cadre de recherches translationnelles (242), afin de créer des relations stables et permanentes entre les investigateurs travaillant dans les différentes aires de la recherche sur l'insuffisance cardiaque, et pour établir des procédures standardisées de caractérisations phénotypiques et partager des plates-formes génomiques et protéomiques d'investigation (242-245).

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000 Mar 1;35(3):569-82.
2. He J, Ogden LG, Bazzano LA, Vupputuri S, Loria C, Whelton PK. Risk factors for congestive heart failure in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study. *Arch Intern Med.* 2001 Apr 9;161(7):996-1002.
3. Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol.* 1993 Oct;22(4 Suppl A):6A-13A.
4. Kannel WB, D'Agostino RB, Silbershatz H, Belanger AJ, Wilson PW, Levy D. Profile for estimating risk of heart failure. *Arch Intern Med.* 1999 Jun 14;159(11):1197-204.
5. Maumus S, Marie B, Siest G, Visvikis-Siest S. A prospective study on the prevalence of metabolic syndrome among healthy french families: two cardiovascular risk factors (HDL cholesterol and tumor necrosis factor-alpha) are revealed in the offspring of parents with metabolic syndrome. *Diabetes Care.* 2005 Mar;28(3):675-82.
6. Hunt SA. ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). *J Am Coll Cardiol.* 2005 Sep 20;46(6):e1-82.
7. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart.* 2007 Sep;93(9):1137-46.
8. Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KK, et al. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med.* 2002 Oct 31;347(18):1397-402.
9. Cowie MR, Wood DA, Coats AJ, Thompson SG, Poole-Wilson PA, Suresh V, et al. Incidence and aetiology of heart failure; a population-based study. *Eur Heart J.* 1999 Mar;20(6):421-8.
10. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic

- heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). Eur J Heart Fail. 2008 Oct;10(10):933-89.**
- 11. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, et al. Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. Circulation. 2002 Dec 10;106(24):3068-72.**
  - 12. Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, et al. Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Circulation. 2008 Jan 29;117(4):e25-146.**
  - 13. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, et al. Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Circulation. 2009 Jan 27;119(3):e21-181.**
  - 14. Gheorghiade M, Bonow RO. Chronic heart failure in the United States: a manifestation of coronary artery disease. Circulation. 1998 Jan 27;97(3):282-9.**
  - 15. Steg PG, Dabbous OH, Feldman LJ, Cohen-Solal A, Aumont MC, Lopez-Sendon J, et al. Determinants and prognostic impact of heart failure complicating acute coronary syndromes: observations from the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). Circulation. 2004 Feb 3;109(4):494-9.**
  - 16. Grossman W, McLaurin LP, Stefadouros MA. Left ventricular stiffness associated with chronic pressure and volume overloads in man. Circ Res. 1974 Nov;35(5):793-800.**
  - 17. Braunwald E, Bristow MR. Congestive heart failure: fifty years of progress. Circulation. 2000 Nov 14;102(20 Suppl 4):IV14-23.**
  - 18. Gerdes AM, Kellerman SE, Moore JA, Muffly KE, Clark LC, Reaves PY, et al. Structural remodeling of cardiac myocytes in patients with ischemic cardiomyopathy. Circulation. 1992 Aug;86(2):426-30.**
  - 19. Mitchell GF, Lamas GA, Vaughan DE, Pfeffer MA. Left ventricular remodeling in the year after first anterior myocardial infarction: a quantitative analysis of contractile segment lengths and ventricular shape. J Am Coll Cardiol. 1992 May;19(6):1136-44.**



20. Rumberger JA, Behrenbeck T, Breen JR, Reed JE, Gersh BJ. Nonparallel changes in global left ventricular chamber volume and muscle mass during the first year after transmural myocardial infarction in humans. *J Am Coll Cardiol.* 1993 Mar 1;21(3):673-82.
21. Anversa P, Olivetti G, Capasso JM. Cellular basis of ventricular remodeling after myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1991 Nov 18;68(14):7D-16D.
22. Komuro I, Yazaki Y. Molecular mechanism of cardiac hypertrophy and failure. *Clin Sci (Lond).* 1994 Aug;87(2):115-6.
23. Volders PG, Willems IE, Cleutjens JP, Arends JW, Havenith MG, Daemen MJ. Interstitial collagen is increased in the non-infarcted human myocardium after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 1993 Nov;25(11):1317-23.
24. Ieda M, Tsuchihashi T, Ivey KN, Ross RS, Hong TT, Shaw RM, et al. Cardiac fibroblasts regulate myocardial proliferation through beta1 integrin signaling. *Dev Cell.* 2009 Feb;16(2):233-44.
25. Molkenin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell.* 1998 Apr 17;93(2):215-28.
26. Lim HW, De Windt LJ, Steinberg L, Taigen T, Witt SA, Kimball TR, et al. Calcineurin expression, activation, and function in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Circulation.* 2000 May 23;101(20):2431-7.
27. Zheng M, Zhang SJ, Zhu WZ, Ziman B, Kobilka BK, Xiao RP. beta 2-adrenergic receptor-induced p38 MAPK activation is mediated by protein kinase A rather than by Gi or gbeta gamma in adult mouse cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2000 Dec 22;275(51):40635-40.
28. Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, et al. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med.* 1984 Sep 27;311(13):819-23.
29. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med.* 1990 Jul 26;323(4):236-41.
30. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol.* 1996 Apr;27(5):1201-6.

31. D'Angelo DD, Sakata Y, Lorenz JN, Boivin GP, Walsh RA, Liggett SB, et al. Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jul 22;94(15):8121-6.
32. Kotlyar E, Vita JA, Winter MR, Awtry EH, Siwik DA, Keaney JF, Jr., et al. The relationship between aldosterone, oxidative stress, and inflammation in chronic, stable human heart failure. *J Card Fail*. 2006 Mar;12(2):122-7.
33. Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res*. 1993 Sep;73(3):413-23.
34. Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):977-84.
35. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. 1991 Jun;83(6):1849-65.
36. Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol*. 1994 Jul;26(7):809-20.
37. Korup E, Dalsgaard D, Nyvad O, Jensen TM, Toft E, Berning J. Comparison of degrees of left ventricular dilation within three hours and up to six days after onset of first acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1997 Aug 15;80(4):449-53.
38. Jugdutt BI. Effect of captopril and enalapril on left ventricular geometry, function and collagen during healing after anterior and inferior myocardial infarction in a dog model. *J Am Coll Cardiol*. 1995 Jun;25(7):1718-25.
39. Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, Bulkley BH. Global cardiac remodeling after acute myocardial infarction: a study in the rat model. *J Am Coll Cardiol*. 1985 Jun;5(6):1355-62.
40. Sabbah HN, Goldstein S. Ventricular remodelling: consequences and therapy. *Eur Heart J*. 1993 Jul;14 Suppl C:24-9.
41. White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt PW, Whitlock RM, Wild CJ. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation*. 1987 Jul;76(1):44-51.
42. Sharov VG, Sabbah HN, Shimoyama H, Goussev AV, Lesch M, Goldstein S. Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Am J Pathol*. 1996 Jan;148(1):141-9.

43. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, et al. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med*. 1997 Apr 17;336(16):1131-41.
44. Ferrari R, Agnoletti L, Comini L, Gaia G, Bachetti T, Cargnoni A, et al. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur Heart J*. 1998 Feb;19 Suppl B:B2-11.
45. Wagner JA. Biomarkers: principles, policies, and practice. *Clin Pharmacol Ther*. 2009 Jul;86(1):3-7.
46. Lathia CD, Amakye D, Dai W, Girman C, Madani S, Mayne J, et al. The value, qualification, and regulatory use of surrogate end points in drug development. *Clin Pharmacol Ther*. 2009 Jul;86(1):32-43.
47. May A, Wang TJ. Biomarkers for cardiovascular disease: challenges and future directions. *Trends Mol Med*. 2008 Jun;14(6):261-7.
48. Marcovina SM, Crea F, Davignon J, Kaski JC, Koenig W, Landmesser U, et al. Biochemical and bioimaging markers for risk assessment and diagnosis in major cardiovascular diseases: a road to integration of complementary diagnostic tools. *J Intern Med*. 2007 Mar;261(3):214-34.
49. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001 Mar;69(3):89-95.
50. Anwaruddin S, Lloyd-Jones DM, Baggish A, Chen A, Krauser D, Tung R, et al. Renal function, congestive heart failure, and amino-terminal pro-brain natriuretic peptide measurement: results from the ProBNP Investigation of Dyspnea in the Emergency Department (PRIDE) Study. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Jan 3;47(1):91-7.
51. Zairis MN, Tsiaousis GZ, Georgilas AT, Makrygiannis SS, Adamopoulou EN, Handanis SM, et al. Multimarker strategy for the prediction of 31 days cardiac death in patients with acutely decompensated chronic heart failure. *Int J Cardiol*. 2009 Jan 19.
52. Waldo SW, Beede J, Isakson S, Villard-Saussine S, Fareh J, Clopton P, et al. Pro-B-type natriuretic peptide levels in acute decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2008 May 13;51(19):1874-82.
53. Troughton RW, Richards AM. Outpatient monitoring and treatment of chronic heart failure guided by amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide measurement. *Am J Cardiol*. 2008 Feb 4;101(3A):72-5.
54. Jourdain P, Jondeau G, Funck F, Gueffet P, Le Helloco A, Donal E, et al. Plasma brain natriuretic peptide-guided therapy to improve outcome in heart failure: the STARS-BNP Multicenter Study. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Apr 24;49(16):1733-9.

55. Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med.* 2008 May 15;358(20):2148-59.
56. Morrow DA, de Lemos JA. Benchmarks for the assessment of novel cardiovascular biomarkers. *Circulation.* 2007 Feb 27;115(8):949-52.
57. Sabatine MS, Morrow DA, de Lemos JA, Gibson CM, Murphy SA, Rifai N, et al. Multimarker approach to risk stratification in non-ST elevation acute coronary syndromes: simultaneous assessment of troponin I, C-reactive protein, and B-type natriuretic peptide. *Circulation.* 2002 Apr 16;105(15):1760-3.
58. Joseph J, Pencina MJ, Wang TJ, Hayes L, Tofler GH, Jacques P, et al. Cross-sectional relations of multiple biomarkers representing distinct biological pathways to plasma markers of collagen metabolism in the community. *J Hypertens.* 2009 Jun;27(6):1317-24.
59. Lee DS, Vasan RS. Novel markers for heart failure diagnosis and prognosis. *Curr Opin Cardiol.* 2005 May;20(3):201-10.
60. Weber KT. Monitoring tissue repair and fibrosis from a distance. *Circulation.* 1997 Oct 21;96(8):2488-92.
61. Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res.* 2002 Nov 29;91(11):988-98.
62. Mann DL. Tumor necrosis factor-induced signal transduction and left ventricular remodeling. *J Card Fail.* 2002 Dec;8(6 Suppl):S379-86.
63. Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Frampton C, Espiner EA, Turner JG, et al. Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and adrenomedullin: new neurohormonal predictors of left ventricular function and prognosis after myocardial infarction. *Circulation.* 1998 May 19;97(19):1921-9.
64. Stork T, Mockel M, Danne O, Voller H, Eichstadt H, Frei U. Left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction: their relation to coronary heart disease. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1995 Aug;9 Suppl 3:533-7.
65. Sun Y, Weber KT. Cardiac remodelling by fibrous tissue: role of local factors and circulating hormones. *Ann Med.* 1998 Aug;30 Suppl 1:3-8.
66. Jugdutt BI. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation.* 2003 Sep 16;108(11):1395-403.
67. Muller-Brunotte R, Kahan T, Lopez B, Edner M, Gonzalez A, Diez J, et al. Myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in patients with hypertension: results from

the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation versus Atenolol (SILVHIA). *J Hypertens*. 2007 Sep;25(9):1958-66.

68. Briest W, Holz A, Ressler B, Deten A, Leicht M, Baba HA, et al. Cardiac remodeling after long term norepinephrine treatment in rats. *Cardiovasc Res*. 2001 Nov;52(2):265-73.

69. Young MJ. Mechanisms of mineralocorticoid receptor-mediated cardiac fibrosis and vascular inflammation. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008 Mar;17(2):174-80.

70. Funder JW. Minireview: aldosterone and the cardiovascular system: genomic and nongenomic effects. *Endocrinology*. 2006 Dec;147(12):5564-7.

71. Sato A, Takane H, Saruta T. High serum level of procollagen type III amino-terminal peptide contributes to the efficacy of spironolactone and angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy on left ventricular hypertrophy in essential hypertensive patients. *Hypertens Res*. 2001 Mar;24(2):99-104.

72. Lijnen P, Petrov V. Renin-angiotensin system, hypertrophy and gene expression in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 1999 May;31(5):949-70.

73. Lijnen P, Petrov V. Induction of cardiac fibrosis by aldosterone. *J Mol Cell Cardiol*. 2000 Jun;32(6):865-79.

74. Zannad F, Dousset B, Alla F. Treatment of congestive heart failure: interfering the aldosterone-cardiac extracellular matrix relationship. *Hypertension*. 2001 Nov;38(5):1227-32.

75. Lijnen P, Petrov V. Antagonism of the renin-angiotensin-aldosterone system and collagen metabolism in cardiac fibroblasts. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1999 Apr;21(3):215-27.

76. Delcayre C, Silvestre JS. Aldosterone and the heart: towards a physiological function? *Cardiovasc Res*. 1999 Jul;43(1):7-12.

77. Mizuno Y, Yoshimura M, Yasue H, Sakamoto T, Ogawa H, Kugiyama K, et al. Aldosterone production is activated in failing ventricle in humans. *Circulation*. 2001 Jan 2;103(1):72-7.

78. Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, Long CS. The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:657-87.

79. Brilla CG, Maisch B, Weber KT. Renin-angiotensin system and myocardial collagen matrix remodeling in hypertensive heart disease: in vivo and in vitro studies on collagen matrix regulation. *Clin Investig*. 1993;71(5 Suppl):S35-41.

80. Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT. Antifibrotic effects of spironolactone in preventing myocardial fibrosis in systemic arterial hypertension. *Am J Cardiol.* 1993 Jan 21;71(3):12A-6A.
81. Lacolley P, Safar ME, Lucet B, Ledudal K, Labat C, Benetos A. Prevention of aortic and cardiac fibrosis by spironolactone in old normotensive rats. *J Am Coll Cardiol.* 2001 Feb;37(2):662-7.
82. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 1999 Sep 2;341(10):709-17.
83. Weber KT. Aldosterone and spironolactone in heart failure. *N Engl J Med.* 1999 Sep 2;341(10):753-5.
84. Zannad F. Angiotensin-converting enzyme inhibitor and spironolactone combination therapy. New objectives in congestive heart failure treatment. *Am J Cardiol.* 1993 Jan 21;71(3):34A-9A.
85. Zannad F. Aldosterone and heart failure. *Eur Heart J.* 1995 Dec;16 Suppl N:98-102.
86. Iraqi W, Rossignol P, Angioi M, Fay R, Nuee J, Ketelslegers JM, et al. Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with acute myocardial infarction complicated by left ventricular dysfunction and heart failure: insights from the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) study. *Circulation.* 2009 May 12;119(18):2471-9.
87. Varo N, Iraburu MJ, Varela M, Lopez B, Etayo JC, Diez J. Chronic AT(1) blockade stimulates extracellular collagen type I degradation and reverses myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2000 Jun;35(6):1197-202.
88. Pathak M, Sarkar S, Vellaichamy E, Sen S. Role of myocytes in myocardial collagen production. *Hypertension.* 2001 Mar;37(3):833-40.
89. Brilla CG, Funck RC, Rupp H. Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis in patients with hypertensive heart disease. *Circulation.* 2000 Sep 19;102(12):1388-93.
90. Rizvi MA, Katwa L, Spadone DP, Myers PR. The effects of endothelin-1 on collagen type I and type III synthesis in cultured porcine coronary artery vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 1996 Feb;28(2):243-52.

91. De Castro S, Caselli S, Maron M, Pelliccia A, Cavarretta E, Maddukuri P, et al. Left ventricular remodelling index (LVRI) in various pathophysiological conditions: a real-time three-dimensional echocardiographic study. *Heart*. 2007 Feb;93(2):205-9.
92. Poulsen SH. Clinical aspects of left ventricular diastolic function assessed by Doppler echocardiography following acute myocardial infarction. *Dan Med Bull*. 2001 Nov;48(4):199-210.
93. Weber KT. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol*. 2000 Jul;15(4):264-72.
94. Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest*. 2007 Mar;117(3):568-75.
95. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev*. 2007 Oct;87(4):1285-342.
96. Leask A. TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc Res*. 2007 May 1;74(2):207-12.
97. Laviades C, Varo N, Fernandez J, Mayor G, Gil MJ, Monreal I, et al. Abnormalities of the extracellular degradation of collagen type I in essential hypertension. *Circulation*. 1998 Aug 11;98(6):535-40.
98. Lopez B, Gonzalez A, Querejeta R, Diez J. The use of collagen-derived serum peptides for the clinical assessment of hypertensive heart disease. *J Hypertens*. 2005 Aug;23(8):1445-51.
99. Diez J, Panizo A, Gil MJ, Monreal I, Hernandez M, Pardo Mindan J. Serum markers of collagen type I metabolism in spontaneously hypertensive rats: relation to myocardial fibrosis. *Circulation*. 1996 Mar 1;93(5):1026-32.
100. Varo N, Etayo JC, Zalba G, Beaumont J, Iraburu MJ, Montiel C, et al. Losartan inhibits the post-transcriptional synthesis of collagen type I and reverses left ventricular fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1999 Jan;17(1):107-14.
101. Diez J, Laviades C, Mayor G, Gil MJ, Monreal I. Increased serum concentrations of procollagen peptides in essential hypertension. Relation to cardiac alterations. *Circulation*. 1995 Mar 1;91(5):1450-6.
102. Diez J. Arterial stiffness and extracellular matrix. *Adv Cardiol*. 2007;44:76-95.
103. Ishikawa J, Kario K, Matsui Y, Shibasaki S, Morinari M, Kaneda R, et al. Collagen metabolism in extracellular matrix may be involved in arterial stiffness in older hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *Hypertens Res*. 2005 Dec;28(12):995-1001.

104. Uusimaa P, Risteli J, Niemela M, Lumme J, Ikaheimo M, Jounela A, et al. Collagen scar formation after acute myocardial infarction: relationships to infarct size, left ventricular function, and coronary artery patency. *Circulation*. 1997 Oct 21;96(8):2565-72.
105. Poulsen SH, Host NB, Jensen SE, Egstrup K. Relationship between serum amino-terminal propeptide of type III procollagen and changes of left ventricular function after acute myocardial infarction. *Circulation*. 2000 Apr 4;101(13):1527-32.
106. Poulsen SH, Andersen NH, Heickendorff L, Mogensen CE. Relation between plasma amino-terminal propeptide of procollagen type III and left ventricular longitudinal strain in essential hypertension. *Heart*. 2005 May;91(5):624-9.
107. Murakami T, Kusachi S, Murakami M, Sano I, Uesugi T, Hiram R, et al. Time-dependent changes of serum carboxy-terminal peptide of type I procollagen and carboxy-terminal telopeptide of type I collagen concentrations in patients with acute myocardial infarction after successful reperfusion: correlation with left ventricular volume indices. *Clin Chem*. 1998 Dec;44(12):2453-61.
108. Cerisano G, Pucci PD, Sulla A, Tommasi M, Raspanti S, Santoro GM, et al. Relation between plasma brain natriuretic peptide, serum indexes of collagen type I turnover, and left ventricular remodeling after reperfused acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2007 Mar 1;99(5):651-6.
109. Querejeta R, Varo N, Lopez B, Larman M, Artinano E, Etayo JC, et al. Serum carboxy-terminal propeptide of procollagen type I is a marker of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease. *Circulation*. 2000 Apr 11;101(14):1729-35.
110. Delyani JA, Robinson EL, Rudolph AE. Effect of a selective aldosterone receptor antagonist in myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Aug;281(2):H647-54.
111. Pitt B, Reichel N, Willenbrock R, Zannad F, Phillips RA, Roniker B, et al. Effects of eplerenone, enalapril, and eplerenone/enalapril in patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy: the 4E-left ventricular hypertrophy study. *Circulation*. 2003 Oct 14;108(15):1831-8.
112. Schwartzkopff B, Fassbach M, Pelzer B, Brehm M, Strauer BE. Elevated serum markers of collagen degradation in patients with mild to moderate dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*. 2002 Aug;4(4):439-4.
113. Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients



with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation*. 2000 Nov 28;102(22):2700-6.

114. Querejeta R, Lopez B, Gonzalez A, Sanchez E, Larman M, Martinez Ubago JL, et al. Increased collagen type I synthesis in patients with heart failure of hypertensive origin: relation to myocardial fibrosis. *Circulation*. 2004 Sep 7;110(10):1263-8.

115. Radauceanu A, Ducki C, Virion JM, Rossignol P, Mallat Z, McMurray J, et al. Extracellular matrix turnover and inflammatory markers independently predict functional status and outcome in chronic heart failure. *J Card Fail*. 2008 Aug;14(6):467-74.

116. Martos R, Baugh J, Ledwidge M, O'Loughlin C, Conlon C, Patle A, et al. Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction. *Circulation*. 2007 Feb 20;115(7):888-95.

117. Martos R, Baugh J, Ledwidge M, O'Loughlin C, Murphy NF, Conlon C, et al. Diagnosis of heart failure with preserved ejection fraction: improved accuracy with the use of markers of collagen turnover. *Eur J Heart Fail*. 2009 Feb;11(2):191-7.

118. Quilliot D, Alla F, Bohme P, Bruntz JF, Hammadi M, Dousset B, et al. Myocardial collagen turnover in normotensive obese patients: relation to insulin resistance. *Int J Obes (Lond)*. 2005 Nov;29(11):1321-8.

119. Ahmed SH, Clark LL, Pennington WR, Webb CS, Bonnema DD, Leonardi AH, et al. Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases: relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease. *Circulation*. 2006 May 2;113(17):2089-96.

120. Lombardi R, Betocchi S, Losi MA, Tocchetti CG, Aversa M, Miranda M, et al. Myocardial collagen turnover in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2003 Sep 23;108(12):1455-60.

121. Fang ZY, Prins JB, Marwick TH. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Endocr Rev*. 2004 Aug;25(4):543-67.

122. Bozkaya YT, Aydin HH, Celik HA, Kayikcioglu M, Payzin S, Kultursay H, et al. Increased myocardial collagen turnover in patients with progressive cardiac conduction disease. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2008 Oct;31(10):1284-90.

123. Alla F, Kearney-Schwartz A, Radauceanu A, Das Dores S, Dousset B, Zannad F. Early changes in serum markers of cardiac extra-cellular matrix turnover in patients

with uncomplicated hypertension and type II diabetes. *Eur J Heart Fail.* 2006 Mar;8(2):147-53.

124. Orn S, Manhenke C, Anand IS, Squire I, Nagel E, Edvardsen T, et al. Effect of left ventricular scar size, location, and transmuralty on left ventricular remodeling with healed myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2007 Apr 15;99(8):1109-14.

125. Simon T, Boutouyrie P, Gompel A, Christin-Maitre S, Laurent S, Thuillez C, et al. Rationale, design and methods of the CASHMERE study. *Fundam Clin Pharmacol.* 2004 Feb;18(1):131-8.

126. Gheorghide M, Orlandi C, Burnett JC, Demets D, Grinfeld L, Maggioni A, et al. Rationale and design of the multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the Efficacy of Vasopressin antagonism in Heart Failure: Outcome Study with Tolvaptan (EVEREST). *J Card Fail.* 2005 May;11(4):260-9.

127. Zannad F, Rossignol P, Iraqi W. Extracellular matrix fibrotic markers in heart failure. *Heart Fail Rev.* 2009 Apr 29.

128. Jugdutt BI. Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2003 Mar;3(1):1-30.

129. Bishop JE, Laurent GJ. Collagen turnover and its regulation in the normal and hypertrophying heart. *Eur Heart J.* 1995 May;16 Suppl C:38-44.

130. D'Armiento J. Matrix metalloproteinase disruption of the extracellular matrix and cardiac dysfunction. *Trends Cardiovasc Med.* 2002 Apr;12(3):97-101.

131. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003 May 2;92(8):827-39.

132. Risteli J, Risteli L. Analysing connective tissue metabolites in human serum. Biochemical, physiological and methodological aspects. *J Hepatol.* 1995;22(2 Suppl):77-81.

133. Jensen LT, Horslev-Petersen K, Toft P, Bentsen KD, Grande P, Simonsen EE, et al. Serum aminoterminal type III procollagen peptide reflects repair after acute myocardial infarction. *Circulation.* 1990 Jan;81(1):52-7.

134. Zucker S, Hymowitz M, Conner C, Zarrabi HM, Hurewitz AN, Matrisian L, et al. Measurement of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues. Clinical and experimental applications. *Ann N Y Acad Sci.* 1999 Jun 30;878:212-27.

135. Kass DA. Ventricular dyssynchrony and mechanisms of resynchronization therapy. *Eur Heart J Suppl.* 2002 April 1, 2002;4(suppl\_D):D23-30.
136. Masoudi FA, Havranek EP, Smith G, Fish RH, Steiner JF, Ordin DL, et al. Gender, age, and heart failure with preserved left ventricular systolic function. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Jan 15;41(2):217-23.
137. Aaronson KD, Schwartz JS, Chen TM, Wong KL, Goin JE, Mancini DM. Development and prospective validation of a clinical index to predict survival in ambulatory patients referred for cardiac transplant evaluation. *Circulation.* 1997 Jun 17;95(12):2660-7.
138. Thambo JB, Bordachar P, Garrigue S, Lafitte S, Sanders P, Reuter S, et al. Detrimental ventricular remodeling in patients with congenital complete heart block and chronic right ventricular apical pacing. *Circulation.* 2004 Dec 21;110(25):3766-72.
139. Yu CM, Lin H, Zhang Q, Sanderson JE. High prevalence of left ventricular systolic and diastolic asynchrony in patients with congestive heart failure and normal QRS duration. *Heart.* 2003 Jan;89(1):54-60.
140. Nelson GS, Curry CW, Wyman BT, Kramer A, Declerck J, Talbot M, et al. Predictors of systolic augmentation from left ventricular preexcitation in patients with dilated cardiomyopathy and intraventricular conduction delay. *Circulation.* 2000 Jun 13;101(23):2703-9.
141. Baldasseroni S, De Biase L, Fresco C, Marchionni N, Marini M, Masotti G, et al. Cumulative effect of complete left bundle-branch block and chronic atrial fibrillation on 1-year mortality and hospitalization in patients with congestive heart failure. A report from the Italian network on congestive heart failure (in-CHF database). *Eur Heart J.* 2002 Nov;23(21):1692-8.
142. Iuliano S, Fisher SG, Karasik PE, Fletcher RD, Singh SN. QRS duration and mortality in patients with congestive heart failure. *Am Heart J.* 2002 Jun;143(6):1085-91.
143. North American Society of Pacing and Electrophysiology 23rd Annual Scientific Sessions. May 8-11, 2002. San Diego, California, USA. Abstracts. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2002 Apr;25(4 Pt 2):523-750.
144. Agricola E, Galderisi M, Mele D, Ansalone G, Dini FL, Di Salvo G, et al. Mechanical dyssynchrony and functional mitral regurgitation: pathophysiology and clinical implications. *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* 2008 May;9(5):461-9.

145. Donal E, De Place C, Kervio G, Bauer F, Gervais R, Leclercq C, et al. Mitral regurgitation in dilated cardiomyopathy: value of both regional left ventricular contractility and dyssynchrony. *Eur J Echocardiogr.* 2008 Jun 26.
146. Uemura A, Morimoto S, Hiramitsu S, Hishida H. Endomyocardial biopsy findings in 50 patients with idiopathic atrioventricular block: presence of myocarditis. *Jpn Heart J.* 2001 Nov;42(6):691-700.
147. Donal E, Leclercq C, Linde C, Daubert JC. Effects of cardiac resynchronization therapy on disease progression in chronic heart failure. *Eur Heart J.* 2006 May;27(9):1018-25.
148. Bruggink AH, van Oosterhout MF, de Jonge N, Ivangh B, van Kuik J, Voorbij RH, et al. Reverse remodeling of the myocardial extracellular matrix after prolonged left ventricular assist device support follows a biphasic pattern. *J Heart Lung Transplant.* 2006 Sep;25(9):1091-8.
149. Eckardt L, Haverkamp W, Johna R, Bocker D, Deng MC, Breithardt G, et al. Arrhythmias in heart failure: current concepts of mechanisms and therapy. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2000 Jan;11(1):106-17.
150. Conti JB. Biventricular pacing therapy for congestive heart failure: a review of the literature. *Cardiol Rev.* 2001 Jul-Aug;9(4):217-26.
151. Bardy GH, Lee KL, Mark DB, Poole JE, Packer DL, Boineau R, et al. Amiodarone or an implantable cardioverter-defibrillator for congestive heart failure. *N Engl J Med.* 2005 Jan 20;352(3):225-37.
152. Abraham WT, Fisher WG, Smith AL, Delurgio DB, Leon AR, Loh E, et al. Cardiac resynchronization in chronic heart failure. *N Engl J Med.* 2002 Jun 13;346(24):1845-53.
153. D'Ascia C, Cittadini A, Monti MG, Riccio G, Sacca L. Effects of biventricular pacing on interstitial remodelling, tumor necrosis factor-alpha expression, and apoptotic death in failing human myocardium. *Eur Heart J.* 2006 Jan;27(2):201-6.
154. Garcia-Bolao I, Lopez B, Macias A, Gavira JJ, Azcarate P, Diez J. Impact of collagen type I turnover on the long-term response to cardiac resynchronization therapy. *Eur Heart J.* 2008 Apr;29(7):898-906.
155. Pires LA, Abraham WT, Young JB, Johnson KM. Clinical predictors and timing of New York Heart Association class improvement with cardiac resynchronization therapy in patients with advanced chronic heart failure: results from the Multicenter InSync Randomized Clinical Evaluation (MIRACLE) and Multicenter InSync ICD

- Randomized Clinical Evaluation (MIRACLE-ICD) trials. *Am Heart J.* 2006 Apr;151(4):837-43.
156. Bristow MR, Saxon LA, Boehmer J, Krueger S, Kass DA, De Marco T, et al. Cardiac-resynchronization therapy with or without an implantable defibrillator in advanced chronic heart failure. *N Engl J Med.* 2004 May 20;350(21):2140-50.
157. Duncan A, Wait D, Gibson D, Daubert JC. Left ventricular remodelling and haemodynamic effects of multisite biventricular pacing in patients with left ventricular systolic dysfunction and activation disturbances in sinus rhythm: sub-study of the MUSTIC (Multisite Stimulation in Cardiomyopathies) trial. *Eur Heart J.* 2003 Mar;24(5):430-41.
158. Yu CM, Fung JW, Zhang Q, Chan CK, Chan YS, Lin H, et al. Tissue Doppler imaging is superior to strain rate imaging and postsystolic shortening on the prediction of reverse remodeling in both ischemic and nonischemic heart failure after cardiac resynchronization therapy. *Circulation.* 2004 Jul 6;110(1):66-73.
159. Pitzalis MV, Iacoviello M, Romito R, Guida P, De Tommasi E, Luzzi G, et al. Ventricular asynchrony predicts a better outcome in patients with chronic heart failure receiving cardiac resynchronization therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2005 Jan 4;45(1):65-9.
160. Yu CM, Abraham WT, Bax J, Chung E, Fedewa M, Ghio S, et al. Predictors of response to cardiac resynchronization therapy (PROSPECT)--study design. *Am Heart J.* 2005 Apr;149(4):600-5.
161. Yu CM, Zhang Q, Fung JW, Chan HC, Chan YS, Yip GW, et al. A novel tool to assess systolic asynchrony and identify responders of cardiac resynchronization therapy by tissue synchronization imaging. *J Am Coll Cardiol.* 2005 Mar 1;45(5):677-84.
162. Hawkins NM, Petrie MC, MacDonald MR, Hogg KJ, McMurray JJ. Selecting patients for cardiac resynchronization therapy: electrical or mechanical dyssynchrony? *Eur Heart J.* 2006 Jun;27(11):1270-81.
163. Achilli A, Sassara M, Ficili S, Pontillo D, Achilli P, Alessi C, et al. Long-term effectiveness of cardiac resynchronization therapy in patients with refractory heart failure and "narrow" QRS. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Dec 17;42(12):2117-24.
164. Fung JW, Yu CM, Yip G, Zhang Y, Chan H, Kum CC, et al. Variable left ventricular activation pattern in patients with heart failure and left bundle branch block. *Heart.* 2004 Jan;90(1):17-9.
165. Sogaard P, Egeblad H, Kim WY, Jensen HK, Pedersen AK, Kristensen BO, et al. Tissue Doppler imaging predicts improved systolic performance and reversed left

ventricular remodeling during long-term cardiac resynchronization therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2002 Aug 21;40(4):723-30.

166. Yu CM, Fung JW, Chan CK, Chan YS, Zhang Q, Lin H, et al. Comparison of efficacy of reverse remodeling and clinical improvement for relatively narrow and wide QRS complexes after cardiac resynchronization therapy for heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2004 Sep;15(9):1058-65.

167. Chung ES, Leon AR, Tavazzi L, Sun JP, Nihoyannopoulos P, Merlino J, et al. Results of the Predictors of Response to CRT (PROSPECT) trial. *Circulation.* 2008 May 20;117(20):2608-16.

168. Fruhwald FM, Fahrleitner-Pammer A, Berger R, Leyva F, Freemantle N, Erdmann E, et al. Early and sustained effects of cardiac resynchronization therapy on N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in patients with moderate to severe heart failure and cardiac dyssynchrony. *Eur Heart J.* 2007 Jul;28(13):1592-7.

169. Vanderheyden M, Mullens W, Delrue L, Goethals M, de Bruyne B, Wijns W, et al. Myocardial gene expression in heart failure patients treated with cardiac resynchronization therapy responders versus nonresponders. *J Am Coll Cardiol.* 2008 Jan 15;51(2):129-36.

170. Jugdutt BI. Matrix metalloproteinases as markers of adverse remodeling after myocardial infarction. *J Card Fail.* 2006 Feb;12(1):73-6.

171. Radauceanu A, Moulin F, Djaballah W, Marie PY, Alla F, Dousset B, et al. Residual stress ischaemia is associated with blood markers of myocardial structural remodelling. *Eur J Heart Fail.* 2007 Apr;9(4):370-6.

172. Pitt B, Poole-Wilson P, Segal R, Martinez FA, Dickstein K, Camm AJ, et al. Effects of losartan versus captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: rationale, design, and baseline characteristics of patients in the Losartan Heart Failure Survival Study--ELITE II. *J Card Fail.* 1999 Jun;5(2):146-54.

173. Cohn JN, Tognoni G, Glazer RD, Spormann D, Hester A. Rationale and design of the Valsartan Heart Failure Trial: a large multinational trial to assess the effects of valsartan, an angiotensin-receptor blocker, on morbidity and mortality in chronic congestive heart failure. *J Card Fail.* 1999 Jun;5(2):155-60.

174. Swedberg K, Pfeffer M, Granger C, Held P, McMurray J, Ohlin G, et al. Candesartan in heart failure--assessment of reduction in mortality and morbidity (CHARM): rationale and design. ChARM-Programme Investigators. *J Card Fail.* 1999 Sep;5(3):276-82.

175. Lechat P. Beta-blockade treatment in heart failure: the cardiac insufficiency bisoprolol study (CIBIS) project. CIBIS Committees and Investigators. Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1990;16 Suppl 5:S158-63.
176. A randomized trial of beta-blockade in heart failure. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study (CIBIS). CIBIS Investigators and Committees. *Circulation.* 1994 Oct;90(4):1765-73.
177. Design of the cardiac insufficiency bisoprolol study II (CIBIS II). The CIBIS II Scientific Committee. *Fundam Clin Pharmacol.* 1997;11(2):138-42.
178. Leizorovicz A, Lechat P, Cucherat M, Bugnard F. Bisoprolol for the treatment of chronic heart failure: a meta-analysis on individual data of two placebo-controlled studies--CIBIS and CIBIS II. Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study. *Am Heart J.* 2002 Feb;143(2):301-7.
179. Effectiveness of spironolactone added to an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a loop diuretic for severe chronic congestive heart failure (the Randomized Aldactone Evaluation Study [RALES]). *Am J Cardiol.* 1996 Oct 15;78(8):902-7.
180. Host NB, Jensen LT, Bendixen PM, Jensen SE, Koldkjaer OG, Simonsen EE. The aminoterminal propeptide of type III procollagen provides new information on prognosis after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1995 Nov 1;76(12):869-73.
181. Takino T, Nakamura M, Hiramori K. Circulating levels of carboxyterminal propeptide of type I procollagen and left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Cardiology.* 1999;91(2):81-6.
182. Poulsen SH, Host NB, Egstrup K. Long-term changes in collagen formation expressed by serum carboxyterminal propeptide of type-I procollagen and relation to left ventricular function after acute myocardial infarction. *Cardiology.* 2001;96(1):45-50.
183. Radovan J, Vaclav P, Petr W, Jan C, Michal A, Richard P, et al. Changes of collagen metabolism predict the left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Mol Cell Biochem.* 2006 Dec;293(1-2):71-8.
184. Magga J, Puhakka M, Hietakorpi S, Punnonen K, Uusimaa P, Risteli J, et al. Atrial natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide, and serum collagen markers after acute myocardial infarction. *J Appl Physiol.* 2004 Apr;96(4):1306-11.
185. Chatzikyriakou SV, Tziakas DN, Chalikias GK, Stakos DA, Thomaidi AK, Mitrousi K, et al. Resolution of symptoms and serum peptides of collagen type I turnover in acute heart failure patients. *Acta Cardiol.* 2009 Feb;64(1):29-33.

186. Chatzikiyriakou SV, Tziakas DN, Chalikias GK, Stakos DA, Thomaidi AK, Mitrousi K, et al. Serum levels of collagen type-I degradation markers are associated with vascular stiffness in chronic heart failure patients. *Eur J Heart Fail.* 2008 Dec;10(12):1181-5.
187. Berger R, Shankar A, Fruhwald F, Fahrleitner-Pammer A, Freemantle N, Tavazzi L, et al. Relationships between cardiac resynchronization therapy and N-terminal pro-brain natriuretic peptide in patients with heart failure and markers of cardiac dyssynchrony: an analysis from the Cardiac Resynchronization in Heart Failure (CARE-HF) study. *Eur Heart J.* 2009 Jun 2.
188. Richardson M, Freemantle N, Calvert MJ, Cleland JG, Tavazzi L. Predictors and treatment response with cardiac resynchronization therapy in patients with heart failure characterized by dyssynchrony: a pre-defined analysis from the CARE-HF trial. *Eur Heart J.* 2007 Aug;28(15):1827-34.
189. Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M, et al. Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation.* 1994 Jul;90(1):195-203.
190. Klappacher G, Franzen P, Haab D, Mehrabi M, Binder M, Plesch K, et al. Measuring extracellular matrix turnover in the serum of patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy and impact on diagnosis and prognosis. *Am J Cardiol.* 1995 May 1;75(14):913-8.
191. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002 Mar 5;105(9):1135-43.
192. Anand IS, Latini R, Florea VG, Kuskowski MA, Rector T, Masson S, et al. C-reactive protein in heart failure: prognostic value and the effect of valsartan. *Circulation.* 2005 Sep 6;112(10):1428-34.
193. Venugopal SK, Devaraj S, Jialal I. Effect of C-reactive protein on vascular cells: evidence for a proinflammatory, proatherogenic role. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2005 Jan;14(1):33-7.
194. Yin WH, Chen JW, Jen HL, Chiang MC, Huang WP, Feng AN, et al. Independent prognostic value of elevated high-sensitivity C-reactive protein in chronic heart failure. *Am Heart J.* 2004 May;147(5):931-8.
195. Michelucci A, Ricciardi G, Sofi F, Gori AM, Pirolo F, Pieragnoli P, et al. Relation of inflammatory status to major adverse cardiac events and reverse remodeling in



patients undergoing cardiac resynchronization therapy. *J Card Fail.* 2007 Apr;13(3):207-10.

196. Wedel H, McMurray JJ, Lindberg M, Wikstrand J, Cleland JG, Cornel JH, et al. Predictors of fatal and non-fatal outcomes in the Controlled Rosuvastatin Multinational Trial in Heart Failure (CORONA): incremental value of apolipoprotein A-1, high-sensitivity C-reactive peptide and N-terminal pro B-type natriuretic peptide. *Eur J Heart Fail.* 2009 Mar;11(3):281-91.

197. Keller F, Rehbein C, Schwarz A, Fleck M, Hayasaka A, Schuppan D, et al. Increased procollagen III production in patients with kidney disease. *Nephron.* 1988;50(4):332-7.

198. Zeisberg M, Khurana M, Rao VH, Cosgrove D, Rougier JP, Werner MC, et al. Stage-specific action of matrix metalloproteinases influences progressive hereditary kidney disease. *PLoS Med.* 2006 Apr;3(4):e100.

199. Anavekar NS, McMurray JJ, Velazquez EJ, Solomon SD, Kober L, Rouleau JL, et al. Relation between renal dysfunction and cardiovascular outcomes after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2004 Sep 23;351(13):1285-95.

200. Damman K, Navis G, Voors AA, Asselbergs FW, Smilde TD, Cleland JG, et al. Worsening renal function and prognosis in heart failure: systematic review and meta-analysis. *J Card Fail.* 2007 Oct;13(8):599-608.

201. Smith GL, Lichtman JH, Bracken MB, Shlipak MG, Phillips CO, DiCapua P, et al. Renal impairment and outcomes in heart failure: systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2006 May 16;47(10):1987-96.

202. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res.* 2002 Mar 22;90(5):520-30.

203. Schrier RW. Cardiorenal versus renocardiac syndrome: is there a difference? *Nat Clin Pract Nephrol.* 2007 Dec;3(12):637.

204. Ronco C, Haapio M, House AA, Anavekar N, Bellomo R. Cardiorenal syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2008 Nov 4;52(19):1527-39.

205. Umar S, Bax JJ, Klok M, van Bommel RJ, Hessel MH, den Adel B, et al. Myocardial collagen metabolism in failing hearts before and during cardiac resynchronization therapy. *Eur J Heart Fail.* 2008 Sep;10(9):878-83.

206. Fullerton MJ, Funder JW. Aldosterone and cardiac fibrosis: in vitro studies. *Cardiovasc Res.* 1994 Dec;28(12):1863-7.

207. MacFadyen RJ, Barr CS, Struthers AD. Aldosterone blockade reduces vascular collagen turnover, improves heart rate variability and reduces early morning rise in heart rate in heart failure patients. *Cardiovasc Res.* 1997 Jul;35(1):30-4.
208. Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Mabuchi N, Hayashi M, Tsutsui T, et al. Effect of spironolactone on plasma brain natriuretic peptide and left ventricular remodeling in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2001 Apr;37(5):1228-33.
209. Hayashi M, Tsutamoto T, Wada A, Tsutsui T, Ishii C, Ohno K, et al. Immediate administration of mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone prevents post-infarct left ventricular remodeling associated with suppression of a marker of myocardial collagen synthesis in patients with first anterior acute myocardial infarction. *Circulation.* 2003 May 27;107(20):2559-65.
210. Matsunaga T, Abe N, Kameda K, Hagii J, Fujita N, Onodera H, et al. Circulating level of gelatinase activity predicts ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2005 Nov 2;105(2):203-8.
211. Weir RA, Mark PB, Petrie CJ, Clements S, Steedman T, Ford I, et al. Left ventricular remodeling after acute myocardial infarction: does eplerenone have an effect? *Am Heart J.* 2009 Jun;157(6):1088-96.
212. Kelly D, Cockerill G, Ng LL, Thompson M, Khan S, Samani NJ, et al. Plasma matrix metalloproteinase-9 and left ventricular remodelling after acute myocardial infarction in man: a prospective cohort study. *Eur Heart J.* 2007 Mar;28(6):711-8.
213. Squire IB, Evans J, Ng LL, Loftus IM, Thompson MM. Plasma MMP-9 and MMP-2 following acute myocardial infarction in man: correlation with echocardiographic and neurohumoral parameters of left ventricular dysfunction. *J Card Fail.* 2004 Aug;10(4):328-33.
214. Diez J, Laviades C, Monreal I, Gil MJ, Panizo A, Pardo J. Toward the biochemical assessment of myocardial fibrosis in hypertensive patients. *Am J Cardiol.* 1995 Nov 2;76(13):14D-7D.
215. Marie PY, Danchin N, Branly F, Angioi M, Grentzinger A, Virion JM, et al. Effects of medical therapy on outcome assessment using exercise thallium-201 single photon emission computed tomography imaging: evidence of a protective effect of beta-blocking antianginal medications. *J Am Coll Cardiol.* 1999 Jul;34(1):113-21.
216. Biolo A, Rohde LE, Goldraich LA, Mascarenhas M, Palombini DV, Clausell N. Serum procollagen type III is associated with elevated right-sided filling pressures in stable outpatients with congestive heart failure. *Biomarkers.* 2009 Jul 14.

217. Blangy H, Sadoul N, Dousset B, Radauceanu A, Fay R, Aliot E, et al. Serum BNP, hs-C-reactive protein, procollagen to assess the risk of ventricular tachycardia in ICD recipients after myocardial infarction. *Europace*. 2007 Sep;9(9):724-9.
218. Felkin LE, Lara-Pezzi E, George R, Yacoub MH, Birks EJ, Barton PJ. Expression of extracellular matrix genes during myocardial recovery from heart failure after left ventricular assist device support. *J Heart Lung Transplant*. 2009 Feb;28(2):117-22.
219. Granger CB, McMurray JJ, Yusuf S, Held P, Michelson EL, Olofsson B, et al. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Alternative trial. *Lancet*. 2003 Sep 6;362(9386):772-6.
220. Gonzalez A, Lopez B, Ravassa S, Beaumont J, Arias T, Hermida N, et al. Biochemical markers of myocardial remodelling in hypertensive heart disease. *Cardiovasc Res*. 2009 Feb 15;81(3):509-18.
221. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*. 1994 Aug 19;269(33):20807-10.
222. Arar C, Gaudin JC, Capron L, Legrand A. Galectin-3 gene (LGALS3) expression in experimental atherosclerosis and cultured smooth muscle cells. *FEBS Lett*. 1998 Jul 3;430(3):307-11.
223. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, et al. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation*. 2004 Nov 9;110(19):3121-8.
224. Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J*. 2004;19(7-9):527-35.
225. Kim H, Lee J, Hyun JW, Park JW, Joo HG, Shin T. Expression and immunohistochemical localization of galectin-3 in various mouse tissues. *Cell Biol Int*. 2007 Jul;31(7):655-62.
226. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, et al. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 28;103(13):5060-5.
227. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Kipari T, Haslett C, Iredale JP, et al. Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. *Am J Pathol*. 2008 Feb;172(2):288-98.

228. Papaspyridonos M, McNeill E, de Bono JP, Smith A, Burnand KG, Channon KM, et al. Galectin-3 is an amplifier of inflammation in atherosclerotic plaque progression through macrophage activation and monocyte chemoattraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Mar;28(3):433-40.
229. van Kimmenade RR, Januzzi JL, Jr., Ellinor PT, Sharma UC, Bakker JA, Low AF, et al. Utility of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3, and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Sep 19;48(6):1217-24.
230. Milting H, Ellinghaus P, Seewald M, Cakar H, Bohms B, Kassner A, et al. Plasma biomarkers of myocardial fibrosis and remodeling in terminal heart failure patients supported by mechanical circulatory support devices. *J Heart Lung Transplant.* 2008 Jun;27(6):589-96.
231. Siest G, Visvikis S, Herbeth B, Gueguen R, Vincent-Viry M, Sass C, et al. Objectives, design and recruitment of a familial and longitudinal cohort for studying gene-environment interactions in the field of cardiovascular risk: the Stanislas cohort. *Clin Chem Lab Med.* 1998 Jan;36(1):35-42.
232. Visvikis-Siest S, Siest G. The STANISLAS Cohort: a 10-year follow-up of supposed healthy families. Gene-environment interactions, reference values and evaluation of biomarkers in prevention of cardiovascular diseases. *Clin Chem Lab Med.* 2008;46(6):733-47.
233. Zannad F, Briancon S, Juilliere Y, Mertes PM, Villemot JP, Alla F, et al. Incidence, clinical and etiologic features, and outcomes of advanced chronic heart failure: the EPICAL Study. *Epidemiologie de l'Insuffisance Cardiaque Avancee en Lorraine. J Am Coll Cardiol.* 1999 Mar;33(3):734-42.
234. Konstam MA, Gheorghide M, Burnett JC, Jr., Grinfeld L, Maggioni AP, Swedberg K, et al. Effects of oral tolvaptan in patients hospitalized for worsening heart failure: the EVEREST Outcome Trial. *JAMA.* 2007 Mar 28;297(12):1319-31.
235. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Jr., Kastelein JJ, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med.* 2008 Nov 20;359(21):2195-207.
236. Fellstrom B, Zannad F, Schmieder R, Holdaas H, Jardine A, Rose H, et al. Effect of rosuvastatin on outcomes in chronic haemodialysis patients - design and rationale of the AURORA study. *Curr Control Trials Cardiovasc Med.* 2005 May 23;6(1):9.

237. Fellstrom BC, Jardine AG, Schmieder RE, Holdaas H, Bannister K, Beutler J, et al. Rosuvastatin and cardiovascular events in patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med.* 2009 Apr 2;360(14):1395-407.
238. Ebihara I, Nakamura T, Tomino Y, Shimada N, Koide H. Metalloproteinase-9 mRNA expression in monocytes from patients with chronic renal failure. *Am J Nephrol.* 1998;18(4):305-10.
239. Konstantino Y, Nguyen TT, Wolk R, Aiello RJ, Terra SG, Fryburg DA. Potential implications of matrix metalloproteinase-9 in assessment and treatment of coronary artery disease. *Biomarkers.* 2009 Mar;14(2):118-29.
240. Ye ZX, Leu HB, Wu TC, Lin SJ, Chen JW. Baseline serum matrix metalloproteinase-9 level predicts long-term prognosis after coronary revascularizations in stable coronary artery disease. *Clin Biochem.* 2008 Mar;41(4-5):292-8.
241. O'Connor CM, Whellan DJ, Lee KL, Keteyian SJ, Cooper LS, Ellis SJ, et al. Efficacy and safety of exercise training in patients with chronic heart failure: HF-ACTION randomized controlled trial. *JAMA.* 2009 Apr 8;301(14):1439-50.
242. Diez J, Ertl G. A translational approach to myocardial remodelling. *Cardiovasc Res.* 2009 Feb 15;81(3):409-11.
243. Prentice H, Webster KA. Genomic and proteomic profiles of heart disease. *Trends Cardiovasc Med.* 2004 Oct;14(7):282-8.
244. Liew CC, Dzau VJ. Molecular genetics and genomics of heart failure. *Nat Rev Genet.* 2004 Nov;5(11):811-25.
245. Zheng J, Chen Y, Pat B, Dell'italia LA, Tillson M, Dillon AR, et al. Microarray identifies extensive downregulation of noncollagen extracellular matrix and profibrotic growth factor genes in chronic isolated mitral regurgitation in the dog. *Circulation.* 2009 Apr 21;119(15):2086-95.
246. Iraqi W, Rossignol P, Fay R, Nuée J, Daubert JC, Marijanowski M, Tavazzi L, Cleland JC, Zannad F. Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with moderate and severe heart failure due to left ventricular systolic dysfunction complicated by cardiac dyssynchrony: insights from the CARE-HF study. *Article submitted in JACC.*

**THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE EN PHARMACOLOGIE**

**VALIDATION DE BIOMARQUEURS DU REMODELAGE DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE CHEZ DES PATIENTS AYANT UNE INSUFFISANCE CARDIAQUE :  
DONNEES DES ETUDES EPHEBUS ET CARE-HF**

**Soutenance publique prévue le 16 octobre 2009**

**par Wafae IRAQI**

**ABSTRACT :**

**Background**—Left ventricular (LV) remodeling is one of the determinants of heart failure (HF). Circulating biomarkers of collagen turnover provide a useful tool for the assessment of cardiac extracellular matrix (ECM) remodeling. This process has not been investigated in patients with congestive HF and LV systolic dysfunction after acute myocardial infarction (AMI) neither the influence of cardiac resynchronisation therapy (CRT) on such biomarkers was.

The **aim** of this work was to evaluate collagen circulating biomarkers as assessment tools of ECM remodeling, in relation with cardiovascular prognosis:

- In patients from the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHEBUS). This trial evaluated the effects of the selective aldosterone receptor antagonist eplerenone versus placebo in decreasing all cause deaths rate, cardiovascular mortality or cardiovascular hospitalisations, in patients with HF after AMI complicated by LVSD and treated by standard pharmacologic therapy including angiotensin converting-enzyme inhibitors, beta-blockers and diuretics.

and

- In patients with moderate to severe HF with LV dysfunction and cardiac dyssynchrony, already receiving standard pharmacologic therapy including angiotensin converting-enzyme inhibitors, beta-blockers and diuretics. Patients were randomly assigned to treatment with pharmacological therapy alone or with the addition of CRT in the Cardiac Resynchronization in Heart Failure (CARE-HF) trial.

**Methods**— Serum levels of collagen biomarkers: synthesis biomarkers PIIINP and PINP, degradation marker type I collagen telopeptide (ICTP) and metalloproteinase (MMP) inhibitors (TIMP-1), were measured in 476 patients from the EPHEBUS study at baseline, 6 and 9 months. Serial measurements of serum levels of PIIINP, PINP, ICTP and MMP-1 were measured in 260 patients enrolled in the CARE-HF trial at baseline, 3 and 18 months.

**Results**— In the EPHEBUS study the combination of ICTP and brain natriuretic peptide (BNP) levels above median at baseline was associated with all-cause mortality and the composite end point of cardiovascular death or heart failure hospitalization. During follow-up, levels of PINP and PIIINP were found to be consistently lower in the eplerenone group and significantly lower after 6 months.

In the CARE-HF study, baseline serum concentrations of PIIINP were strongly associated with long-term mortality independently from NT-ProBNP. Serum PIIINP concentrations were similar in patients assigned to CRT or control during follow-up. Neither NT-ProBNP nor any of the tested collagen biomarkers predicted the response to CRT.

**Conclusion** : Changes in biomarkers of collagen synthesis and degradation suggest that extracellular matrix remodeling is an active process in patients in the acute phase of HF after AMI. Eplerenone suppresses post-acute myocardial infarction collagen turnover changes and acts through ECM remodeling. Collagen biomarkers are associated with cardiovascular outcomes in acute and chronic HF settings. Fibrosis degree, as assessed by collagen biomarker circulating levels is not associated with dyssynchrony degree and with beneficial effects of CRT, which is recommended in HF patients with dyssynchrony.

**KEYWORDS** — , extracellular matrix, biomarkers, collagen; heart failure, myocardial infarction, dyssynchrony