



HAL
open science

Les microARN : biomarqueurs et cibles thérapeuthiques des maladies cardiovasculaires

Emeline Goretti

► **To cite this version:**

Emeline Goretti. Les microARN : biomarqueurs et cibles thérapeuthiques des maladies cardiovasculaires. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0130 . tel-01750958

HAL Id: tel-01750958

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750958>

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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Emeline GORETTI**

**Les microARN : biomarqueurs et cibles thérapeutiques
des maladies cardiovasculaires**

1^{er} Octobre 2014

Membres du jury :

Rapporteurs :	M. Alexandre MEBAZAA	MD, PhD, PU-PH, INSERM U942 et Hôpital Lariboisière, Paris, France
	Mme Florence PINET	PhD, DR INSERM, INSERM U744, Institut Pasteur de Lille, Lille, France
Examineurs :	M. Athanase BENETOS	MD, PhD, PU-PH, INSERM U961, Nancy, FRANCE
	M. Yvan DEVAUX	PhD, Centre de Recherche Public-Santé, Luxembourg, Luxembourg Directeur de thèse
	M. Stéphane HEYMANS	MD, PhD, CARIM et Centre Médical Universitaire, Maastricht, Hollande
	M. Daniel WAGNER	MD, PhD, Centre hospitalier de Luxembourg, Luxembourg, Luxembourg

**Laboratoire de recherche cardiovasculaire, Centre de Recherche Public-Santé
84, val Fleuri L-1526 Luxembourg**

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Docteur Daniel Wagner pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Recherche Cardiovasculaire et pour son soutien tout au long de ce travail de thèse.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Docteur Yvan Devaux pour m'avoir encadrée, soutenue et surtout pour m'avoir fait confiance durant ces 4 années de thèse.

Je remercie ensuite tous les membres du Laboratoire de Recherche Cardiovasculaire pour leur sympathie et la bonne ambiance dans laquelle ils m'ont permis de mener à bien cette thèse, et en particulier mes collègues les plus proches, que je remercie pour leur soutien quotidien et nos moments de détente.

Mes sincères remerciements vont aux Docteurs Alexandre Mebazaa et Athanase Benetos pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse. Je veux également remercier tous les membres de mon jury de thèse, pour avoir accepté d'évaluer mon travail et plus particulièrement les Docteurs Alexandre Mebazaa et Florence Pinet d'être les rapporteurs de cette soutenance de thèse.

J'adresse également mes remerciements au Fonds National de la Recherche et au Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche de Luxembourg, pour avoir financé ces 4 années de thèse.

Je remercie tous les membres du Centre de Recherche Public-Santé qui ont contribué à cette thèse autant au niveau scientifique que moral.

Enfin je remercie ma famille et mes proches pour m'avoir soutenue tout au long de ces 4 années de thèse.

« Etre rebelle, c'est refuser l'idée que le monde est figé. »

Benoît Duteurtre

« Des chercheurs qui cherchent, on en trouve. Mais des chercheurs qui trouvent, on en
cherche. »

Charles De Gaulle

A tous ceux qui m'ont « sup-porté » ...

LISTE DES TRAVAUX

Publications relatives à ce mémoire

Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction

Devaux Y, Vausort M, Goretti E, Nazarov PV, Azuaje F, Gilson G, Corsten MF, Schroen B, Lair ML, Heymans S, Wagner DR.

Clin Chem. 2012;58:559-567.

Circulating microRNAs after cardiac arrest

Stammet P, Goretti E, Vausort M, Zhang L, Wagner DR, Devaux Y.

Crit Care Med. 2012;40(12):3209-3214.

MicroRNAs in patients on chronic hemodialysis (MINOS Study)

Emilian C, Goretti E, Prosperit F, Pouthier D, Duhoux P, Gilson G, Devaux Y, Wagner DR.

Clin J Am Soc Nephrol 2012;7:619-23.

MicroRNA-16 affects key functions of human endothelial progenitor cells

Goretti E, Rolland-Turner M, Léonard F, Zhang L, Wagner DR, Devaux Y.

J Leukoc Biol. 2013 May;93(5):645-55.

Adenosine stimulates the migration of human endothelial progenitor cells. Role of CXCR4 and microRNA-150

Rolland-Turner M, Goretti E, Bousquenaud M, Léonard F, Nicolas C, Zhang L, Maskali F, Marie PY, Devaux Y, Wagner DR.

PLoS One. 2013;8(1):e54135.

Association between circulating microRNAs, cardiovascular risk factors and outcome in patients with acute myocardial infarction

Goretti E, Vausort M, Wagner DR, Devaux Y.

Int J Cardiol. 2013 Oct 9;168(4):4548-50.

Diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs in patients with acute chest pain

Devaux Y, Mueller M, Haaf P, Goretti E, Twerenbold R, Zangrando J, Vausort M, Reichlin T, Wildi K, Moehring B, Wagner DR, Mueller C.

J Intern Med. 2013 Dec 17. (sous presse)

Circulating microRNAs and outcome in patients with acute heart failure

Seronde MF, Goretti E, Vausort M, Gayat E, Vodovar N, Sadoune M, Samuel JL, Thum T, Cohen Solal A, Laribi S, Plaisance P, Wagner DR, Mebazaa A, Devaux Y, the GREAT network.

(soumise)

Publications non présentées dans ce mémoire

Human muscle LIM protein (MLP) dimerizes along the actin cytoskeleton and crosslinks actin filaments

Hoffmann C, Moreau F, Moes M, Luthold C, Dieterle M, Goretti E, Neumann K, Steinmetz A, Thomas C.

Mol Cell Biol. 2014 Juin 16. (sous presse)

Role of microRNAs in endothelial progenitor cells: implication for cardiac repair

Goretti E, DR Wagner, Y Devaux.

ed. Nova Science Publishers 2013.

Regulation of endothelial progenitor cells function by micrornas

Goretti E, DR Wagner, Y Devaux.

Minerva Cardioangiol. 2013 Dec;61(6):591-604.

Communications orales

Adenosine stimulates the recruitment of endothelial progenitor cells to the ischemic heart. Involvement of the microRNA-150-CXCR4-SDF-1 α pathway

Goretti E, Bousquenaud M, Rolland-Turner M, Nicolas C, Maskali F, Marie PY, Devaux Y, Wagner DR.

European Society of Cardiology Congress, Munich, Août 2012.

MicroRNAs in acute conditions: update 2013

Goretti E, Wagner DR, Devaux Y.

Great Network VI International Meeting. Prague, Juin 2013.

Circulating microRNAs and outcome in patients with acute heart failure

Goretti E, Seronde MF, Vausort M, Gayat E, Thum T, Cohen-Solal A, Wagner DR, Mebazaa A, Devaux Y.

Heart Failure congress from the European Society of Cardiology, Athènes, Mai 2014.

Posters

MicroRNA-16 down regulates cyclin expression in endothelial progenitor cells

Rolland-Turner M, Goretti E, Leonard F, Zhang L, Nicolas C, Leners B, Jeanty C, Azuaje F, Wagner DR, Devaux Y.

Heart Failure Congress, Göteborg, Mai 2011.

Adenosine stimulates the migration of human endothelial progenitor cells through regulation of miR-150 and CXCR4

Goretti E, Rolland-Turner M, Nicolas C, Devaux Y, Wagner DR.

American Heart Association Congress, Los Angeles, Novembre 2012.

Association between circulating microRNAs and risk factors in myocardial infarction patients

Goretti E, Vausort M, Devaux Y, Wagner DR.

European Society of Cardiology Congress, Amsterdam, Août 2013.

MicroRNAs and myocardial infarction: a step forward towards personalized medicine?

Goretti E, Wagner DR, Devaux Y.

Heart Failure congress from the European Society of Cardiology, Athènes, Mai 2014.

Circulating microRNAs and outcome in patients with acute heart failure

Goretti E, Seronde MF, Vausort M, Gayat E, Thum T, Cohen-Solal A, Wagner DR, Mebazaa A, Devaux Y.

International Society for Heart Research, European section, Barcelone, Juin 2014.

Circulating microRNAs and outcome in patients with acute heart failure

Goretti E, Seronde MF, Vausort M, Gayat E, Thum T, Cohen-Solal A, Wagner DR, Mebazaa A, Devaux Y.

Frontiers in CardioVascular Biology, Barcelone, Juin 2014.

LISTE DES ABBREVIATIONS

AC → arrêt cardiaque
ADNc → ADN complémentaire
ALDH → aldéhyde déshydrogénase
AMP → adénosine monophosphate
ARNm → ARN messenger
ATP → adénosine tri phosphate
AUC → *area under the curve*
BNP → *brain natriuretic peptide*
BSA → albumine de sérum bovin
CADO → 2-chloroadénosine
CCNE1 → cycline E1
CCND1 → cycline D1
CD → cluster de différenciation
CDK6 → kinase dépendante des cyclines 6
CK → créatine kinase
CPC → *cerebral performance category*
CPK → créatine phosphokinase
CT → *cycle threshold*
cTn → troponines cardiaques
CV → cardiovasculaire
CXCR4 → *chemokine (C-X-C motif) receptor 4*
DMEM → *dulbecco's modified eagle medium*
ECG → électrocardiogramme
EPC → *endothelial progenitor cell*
ESC → *european society of cardiology*
FE → fraction d'éjection
FGF → facteur de croissance fibroblastique
GABBR1 → *gamma-aminobutyric acid type B receptor 1*
hEGF → facteur de croissance endothélial humain
HEK293 → cellules rénales embryonnaires humaines

HDL → *high-density lipoprotein*
Hs-cTnT → troponines cardiaques hypersensibles
HUVEC → cellules endothéliales de veine de cordon ombilical humaines
IC → insuffisance cardiaque
ICA → insuffisance cardiaque aiguë
ICC → insuffisance cardiaque chronique
IL → interleukine
IM → infarctus du myocarde
IMC → indice de masse corporelle
I/R → ischémie/reperfusion
KI → *knock in*
KO → *knock out*
LDL → *low density lipoprotein*
MCV → maladies cardiovasculaires
MEC → matrice extracellulaire
MiARN → microARN
MMP → *matrix metalloproteinases*
MR-proADM → *mid-regional pro-adrenomedullin*
NSE → *neuron-specific enolase*
NSTEMI → *non-ST elevation myocardial infarction*
Nt-pro-BNP → *N-terminal pro-brain natriuretic peptide*
OMS → organisation mondiale de la santé
OR → *odds ratio*
PBMC → cellules mononucléaires du sang périphérique
PBS → *phosphate buffer saline*
PCR → *polymerase chain reaction*
PCT → procalcitonine
PDGF → *platelet derived growth factor*
R3-IGF → facteur de croissance insulino-dépendant-1
ROC → *receiver operating characteristic*
SDF-1 α → *stromal cell-derived factor-1 α*
SERBP1 → *serpine1 mRNA binding protein 1*
SH-SY5Y → cellules neuroblastiques humaines
SNRK → *SNF related kinase*

STEMI → *ST-elevation myocardial infarction*
SYT-5 → *synaptogamin-5*
SVF → *sérum de veau fœtal*
TGFB → *transforming growth factor β*
TNF α → *tumor necrosis factor α*
TSP-1 → *thrombospondine-1*
UBE2V1 → *ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1*
USP25 → *ubiquitin specific peptidase 25*
UTR → *untranslated region*
VEGF → *vascular endothelial growth factor*
VEGFR2 → *vascular endothelial growth factor receptor 2*
VG → *ventricule gauche*

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Schéma du cœur humain	23
Figure 2: Le cœur et la circulation sanguine.....	24
Figure 3: Tracé de l'ECG caractéristique des STEMI et NSTEMI.....	30
Figure 4: Schéma pour émettre le diagnostic chez des patients avec ICA suspectée	34
Figure 5: Voie de biosynthèse des miARN.....	37
Figure 6: Origines des miARN circulants.....	40
Figure 7: Liste de miARN identifiés pour leur association avec un facteur de risque CV.....	44
Figure 8: L'infarctus du myocarde	51
Figure 9: Comparaison entre un cœur sain et un cœur fibrosé	52
Figure 10: Les 3 phases du remodelage du VG post-IM	54
Figure 11: Les différentes étapes de l'angiogenèse.....	57
Figure 12: Caractéristiques phénotypiques des EPC précoces et tardives.....	60
Figure 13: Structure chimique et représentation tridimensionnelle de l'adénosine.	63
Figure 14: Voies de biosynthèse et de transport de l'adénosine	64
Figure 15: Mécanismes d'action des récepteurs à l'adénosine	65
Figure 16: MicroARN modifiés après IM	66
Figure 17: Organigramme de la population de l'étude LARIBOISIERE.	84
Figure 18: Scan d'une puce à miARN.....	99
Tableau 1: Caractéristiques des 1155 patients APACE.....	81
Tableau 2: Caractéristiques des patients de la cohorte LUCKY.....	83
Tableau 3: Caractéristiques des patients de la cohorte LARIBOISIERE.....	85
Tableau 4: Caractéristiques des 28 patients NORTH POLE.....	87
Tableau 5: Caractéristiques des 41 patients MINOS.....	89
Tableau 6: Caractéristiques des amorces utilisées en RT-qPCR.....	103
Tableau 7: Kits ELISA utilisés pour mesurer les concentrations de certaines protéines dans les milieux conditionnés.....	104

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	1
LISTE DES TRAVAUX	3
LISTE DES ABREVIATIONS	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	10
TABLE DES MATIERES	11
INTRODUCTION	15
PRESENTATION GENERALE DU MANUSCRIT	22
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	23
Axe 1: Intérêt des miARN comme biomarqueurs des MCV aigus	23
1. Les maladies cardiovasculaires	23
1.1. Le cœur	23
1.2. Généralités, épidémiologie et étiologie des MCV	25
1.3. Les MCV aigus étudiées	26
2. Les miARN circulants.....	37
2.1. Biogénèse des miARN et mode d'action	37
2.2. Les miARN circulants.....	39
3. Les miARN circulants dans les MCV aigus.....	41
3.1. Influence des facteurs de risque CV	41
3.2. Biomarqueurs lors de douleurs thoraciques	44
3.3. Biomarqueurs de l'IM.....	46
3.4. Biomarqueurs de l'ICA.....	48
3.5. Biomarqueurs de l'AC	50
Axe 2: Potentiel des miARN pour la réparation cardiaque post infarctus	51
1. La réparation cardiaque post-IM.....	51
1.1. Généralités sur l'IM	51
1.2. Mécanismes mis en jeu	53
2. Les Cellules Endothéliales Progénitrices	59
2.1. Leur découverte et leurs propriétés	59
2.2. Les EPC dans l'IM.....	61

2.3. Effets de l'adénosine sur les EPC	63
3. Les miARN	66
3.1. Fonction et régulation cardiaque.....	66
3.2. Potentiel thérapeutique des miARN.....	67
4. Les miARN, les EPC et la réparation cardiaque.....	73
4.1. Effets des miARN sur la biologie des EPC	73
4.2. Effets paracrines des miARN sécrétés par les EPC	77
MATERIEL ET METHODES.....	79
Axe 1: Intérêt des miARN comme biomarqueurs des MCV aigües	79
1. Cohortes de patients	79
1.1. Le registre APACE	79
1.2. Le registre LUCKY.....	82
1.3. Le registre LARIBOISIÈRE	83
1.4. Le registre NORTH POLE.....	85
1.5. Le registre MINOS	87
2. Mesure des miARN circulants	89
2.1. Extraction d'ARN total	89
2.2. Rétrotranscription (RT) et PCR quantitative en temps réel des miARN.....	90
3. Analyses statistiques	91
Axe 2: Intérêt des miARN pour la réparation cardiaque post infarctus	93
1. Culture cellulaire.....	93
1.1. Cellules endothéliales progénitrices humaines (EPC)	93
1.2. Cellules endothéliales de veine de cordon ombilical humaines (HUVEC) ...	96
1.3. Cellules rénales embryonnaires humaines (HEK293)	97
1.4. Cellules neuroblastiques humaines (SH-SY5Y).....	97
2. Transfection d'inhibiteurs ou de mimiques de miARN	98
3. Mesures d'expression des miARN.....	98
3.1. Extraction d'ARN total contenant les miARN	98
3.2. Pucés à miARN.....	99
3.3. RT et PCR quantitative en temps réel de miARN	100
4. Mesures d'expression des gènes	101
4.1. Extraction d'ARN total	101
4.2. Pucés à ARNm.....	102
4.3. RT et PCR quantitative en temps réel d'ARN messagers.....	102
5. Mesures d'expression des protéines.....	103

5.1. Western Blot	103
5.2. ELISA	104
6. Analyses statistiques	104
RESULTATS	107
Axe 1: Intérêt des miARN comme biomarqueurs des MCV aigües	107
Etude n°1: Détermination de la capacité diagnostique des miARN circulants chez des patients arrivés aux urgences avec une douleur thoracique (cohorte APACE)	107
Etude n°2: Détermination de la capacité diagnostique et pronostique des miARN circulants chez des patients après IM (cohorte LUCKY) et association potentielle avec les facteurs de risque CV.....	109
• Détermination de la capacité diagnostique de certains miARN circulants lors d'un IM	109
• Association entre les miARN circulants, les facteurs de risque CV et le pronostic après IM	111
Etude n°3: Détermination de la capacité diagnostique et pronostique des miARN circulants chez des patients avec ICA (cohorte LARIBOISIERE).....	113
Etude n°4: Détermination de la capacité pronostique des miARN circulants chez des patients après AC (cohorte NORTH POLE).....	115
Etude n°5: Intérêt des miARN circulants chez les patients hémodialysés (cohorte MINOS)	117
Axe 2: Intérêt des miARN pour la réparation cardiaque post infarctus	119
Etude n°1: Implication du miR-16 dans les fonctions principales des EPC	119
Etude n°2: Implication du miR-150 dans l'effet de l'adénosine sur la migration des EPC par le CXCR4	123
DISCUSSION.....	127
Axe 1: Intérêt des miARN comme biomarqueurs des MCV aiguës	127
Etude n°1: Détermination de la capacité diagnostique des miARN circulants chez des patients arrivés aux urgences avec une douleur thoracique (cohorte APACE)	130
Etude n°2: Détermination de la capacité diagnostique et pronostique des miARN circulants chez des patients après IM (cohorte LUCKY) et association potentielle avec les facteurs de risque CV.....	133
• Détermination de la capacité diagnostique de certains miARN circulants lors d'un IM	133
• Association entre les miARN circulants, les facteurs de risque CV et le pronostic après IM	135
Etude n°3: Détermination de la capacité diagnostique et pronostique des miARN circulants chez des patients avec ICA (cohorte LARIBOISIERE).....	137

Etude n°4: Détermination de la capacité pronostique des miARN circulants chez des patients après arrêt cardiaque (cohorte NORTH POLE).....	139
Axe 2: Intérêt des miARN pour la réparation cardiaque post infarctus	143
Etude n°1: Implication du miR-16 dans les fonctions principales des EPC	144
Etude n°2: Implication du miR-150 dans l'effet de l'adénosine sur la migration des EPC par le CXCR4	147
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	151
BIBLIOGRAPHIE	153

INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la cause principale de décès dans le monde selon l'Organisation Mondiale de la santé (OMS). Elles sont à l'origine de la mort de plus de personnes que n'importe quelle autre cause, et cela ne risque pas de changer dans les années à venir ¹. Parmi toutes les MCV, les cardiopathies coronariennes sont les maladies entraînant le plus de décès, dont l'infarctus du myocarde (IM) aigu est la plus connue.

Tout démarre par le symptôme le plus commun: la douleur thoracique ². Une fois arrivé aux urgences, tout patient présentant ce symptôme aigu doit être pris en charge rapidement car il peut s'agir d'un véritable danger de mort pour le patient. Il est donc primordial de diagnostiquer au plus vite l'origine de sa douleur car différentes MCV aiguës peuvent être impliquées, telles que l'IM ³ ou une insuffisance cardiaque aiguë (ICA) ⁴. Cependant, le diagnostic n'est pas toujours aisé, car les symptômes sont parfois peu évidents, et les techniques classiquement utilisées en clinique peuvent manquer de spécificité ou de sensibilité.

Emettre un pronostic sur le devenir des patients après MCV est également important car cela va permettre d'adapter le traitement des patients (par exemple après arrêt cardiaque (AC) ⁵ où le pronostic neurologique influence énormément le choix du traitement), mais également d'avoir un meilleur suivi et de mieux éduquer les patients. Cependant, à nouveau, les outils actuellement utilisés en clinique ne sont pas parfaits et manquent de spécificité et de sensibilité.

Il faudrait donc trouver de nouveaux outils permettant de mieux diagnostiquer et pronostiquer ces patients.

Il y a quelques années ont été découverts les microARN (miARN) ⁶. Il s'agit de petits ARN simples brins, non-codants, de 18 à 22 nucléotides de long. Ils ont la capacité d'inhiber l'expression génique en ciblant des ARN messagers (ARNm) spécifiques. Ils peuvent en effet soit inhiber la traduction, soit dégrader l'ARNm cible ⁷. Actuellement, plus de 30424 miARN ont été identifiés dans 206 espèces différentes (selon miRBase version 20, <http://www.mirbase.org/>). Un seul de ces petits ARN peut cibler plus de 200 ARNm et un seul ARNm peut être ciblé par de multiples miARN. Ils peuvent donc réguler de nombreuses voies biologiques, impliquées dans les MCV, telles que l'hypertrophie ou l'angiogenèse.

Une de leur particularité est qu'ils ont été détectés dans des fluides biologiques tels que l'urine ⁸ ou le sang ⁹. Ces miARN dits circulants, sont très stables et résistant aux RNAses. Ils proviennent soit de cellules mourantes, comme des cardiomyocytes lors d'un IM, soit de cellules vivantes qui vont les sécréter comme des facteurs paracrines. Ces particularités de circuler dans le sang et de réguler l'expression de gène suggèrent qu'ils pourraient être utilisés comme biomarqueurs diagnostiques et/ou pronostiques des MCV. Notre laboratoire avait participé à une étude préliminaire de leur capacité diagnostique dans une petite cohorte de patients avec IM ¹⁰.

Très récemment, de nouvelles technologies ont été développées afin de moduler l'expression de miARN spécifiques: soit par des inhibiteurs (antimiRs) ou par des mimiques (prémiRs) ¹¹. De cette façon, les miARN deviennent également de potentiels outils thérapeutiques.

Lors d'un IM, l'organisme va mettre en place une réparation cardiaque afin de réduire au maximum l'impact de l'ischémie. Différentes cellules vont être impliquées telles que les cellules endothéliales progénitrices ou EPC. Découvertes en 1997 ¹², elles sont recrutées de la moelle osseuse jusqu'à la zone infarctée pour prendre part à cette réparation en augmentant la revascularisation. Ces cellules partagent des propriétés de cellules endothéliales et progénitrices. Deux types majoritaires d'EPC ont été identifiés: les EPC précoces et les EPC tardives. Cependant leurs caractéristiques biologiques sont encore controversées, à cause de leur faible abondance dans la circulation et des multiples techniques d'isolation qui existent ¹³. De plus, l'administration d'EPC pour revasculariser le cœur est limitée par leur faible recrutement et attachement dans le cœur ¹⁴.

Différentes stratégies sont actuellement testées pour augmenter leurs capacités réparatrices lors de la réparation cardiaque, en agissant soit sur leur recrutement et leur attachement au cœur ¹⁵, soit sur une meilleure caractérisation de leur biologie. Les miARN pourraient être utilisés comme outils pour augmenter les capacités régénératives de ces cellules.

Hypothèses et organisation de ce travail

Ce travail de thèse est basé sur l'hypothèse que les miARN pourraient avoir une capacité diagnostique et/ou pronostique dans certaines MCV et qu'ils seraient également capables de moduler la fonction cardiaque post-IM.

Nous nous sommes donc proposé d'étudier la capacité des miARN en tant que potentiels biomarqueurs des MCV mais également en tant que potentiel traitement des MCV. Deux axes ont été définis:

- L'axe 1: il s'agit de mettre en évidence l'intérêt des miARN circulants comme biomarqueurs de différentes MCV.
- L'axe 2: il s'agit d'étudier l'intérêt thérapeutique des miARN dans la réparation post-IM, plus particulièrement chez un type cellulaire spécifique, les EPC.

Concernant l'axe 1, nous avons dans un premier temps déterminé la capacité diagnostique et/ou pronostique de certains miARN circulants dans différentes cohortes de patients atteints de MCV.

- La cohorte APACE: il s'agit de patients arrivés aux urgences pour douleur thoracique (étude n°1).
- La cohorte LUCKY: il s'agit de patients diagnostiqués avec un IM (étude n°2). Cette cohorte a également servi à identifier de potentielles associations entre les miARN circulants, les facteurs de risque cardiovasculaires (CV) et le pronostic après IM.
- La cohorte LARIBOISIERE: il s'agit de patients diagnostiqués avec une ICA (étude n°3).
- La cohorte NORTHPOLE: il s'agit de patients ayant subi un AC et qui ont été traités par hypothermie (étude °4).

Nous avons également travaillé sur une cohorte de patients en insuffisance rénale terminale traités par hémodialyse (cohorte MINOS, étude n°5).

Concernant l'axe 2, nous avons dans un premier temps identifié un miARN impliqué dans la biologie des EPC, le miR-16, et caractérisé les effets de sa modulation afin d'augmenter les capacités réparatrices de ces cellules intervenant lors d'un IM (étude n°1).

Puis nous avons mis en évidence l'implication d'un miARN, le miR-150, dans l'action stimulatrice de l'adénosine sur les EPC, suggérant son utilisation pour augmenter les capacités réparatrices de ces cellules (étude n°2).

Ces études ont donné lieu à la publication de différents articles:

- L'axe 1:

Etude n°1:

Diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs in patients with acute chest pain

Devaux Y, Mueller M, Haaf P, Goretti E, Twerenbold R, Zangrando J, Vausort M, Reichlin T, Wildi K, Moehring B, Wagner DR, Mueller C.

J Intern Med. 2013 Dec 17. (sous presse)

Etude n°2:

Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction

Devaux Y, Vausort M, Goretti E, Nazarov PV, Azuaje F, Gilson G, Corsten MF, Schroen B, Lair ML, Heymans S, Wagner DR.

Clin Chem. 2012;58:559-567.

Association between circulating microRNAs, cardiovascular risk factors and outcome in patients with acute myocardial infarction

Goretti E, Vausort M, Wagner DR, Devaux Y.

Int J Cardiol. 2013 Oct 9;168(4):4548-50.

Etude n°3 (soumis):

Circulating microRNAs and outcome in patients with acute heart failure

Seronde MF, Goretti E, Vausort M, Gayat E, Vodovar N, Sadoune M, Samuel JL, Thum T, Cohen Solal A, Laribi S, Plaisance P, Wagner DR, Mebazaa A, Devaux Y, the GREAT network.

Etude n°4:

Circulating microRNAs after cardiac arrest

Stammet P, Goretti E, Vausort M, Zhang L, Wagner DR, Devaux Y.

Crit Care Med. 2012;40(12):3209-3214.

Etude n°5:

MicroRNAs in patients on chronic hemodialysis (MINOS Study)

Emilian C, Goretti E, Prospert F, Pouthier D, Duhoux P, Gilson G, Devaux Y, Wagner DR.
Clin J Am Soc Nephrol 2012;7:619-23.

- L'axe 2:

Etude n°1 :

MicroRNA-16 affects key functions of human endothelial progenitor cells

Goretti E, Rolland-Turner M, Léonard F, Zhang L, Wagner DR, Devaux Y.
J Leukoc Biol. 2013 May;93(5):645-55.

Etude n°2:

Adenosine stimulates the migration of human endothelial progenitor cells. Role of CXCR4 and microRNA-150

Rolland-Turner M, Goretti E, Bousquenaud M, Léonard F, Nicolas C, Zhang L, Maskali F, Marie PY, Devaux Y, Wagner DR.
PLoS One. 2013;8(1):e54135.

Lors de ce travail de thèse, j'ai également contribué à l'écriture d'un article de revue (non présenté dans ce manuscrit):

Regulation of endothelial progenitor cells function by micrornas

Goretti E, DR Wagner, Y Devaux.
Minerva Cardioangiol. 2013 Dec;61(6):591-604.

J'ai pu de même participer à la publication d'un livre intitulé « **Progenitor cells: biology, characterization and potential clinical applications** », en y écrivant un chapitre (non présenté dans ce manuscrit):

Role of microRNAs in endothelial progenitor cells: implication for cardiac repair

Goretti E, DR Wagner, Y Devaux.
ed. Nova Science Publishers. 2013;105-121.

J'ai aussi eu la possibilité lors de ma thèse de participer à un projet en collaboration avec un autre laboratoire du CRP-Santé, qui a donné lieu à une publication (non présentée dans ce manuscrit):

Human muscle LIM protein (MLP) dimerizes along the actin cytoskeleton and crosslinks actin filaments.

Hoffmann C, Moreau F, Moes M, Luthold C, Dieterle M, Goretti E, Neumann K, Steinmetz A, Thomas C.

Mol Cell Biol. 2014 Juin 16. (sous presse)

Contribution personnelle dans chaque étude

Dans l'axe 1, ma contribution aux études 1 à 5 s'est surtout portée sur la partie technique, c'est-à-dire de l'extraction d'ARN des échantillons aux résultats de PCR (polymerase chain reaction) quantitative et ensuite l'analyse des résultats.

Dans l'axe n°2, ma contribution à l'étude n°1 a été multiple, en démarrant par la culture cellulaire et la caractérisation des cellules. J'ai également effectué les expériences sur puces à miARN et j'ai participé à l'analyse de ces puces, avec la bio-informaticienne de notre laboratoire Lu Zhang. J'ai aussi contribué à la partie biologie moléculaire, et aux tests fonctionnels sur les cellules. Je tiens à préciser que j'ai bénéficié de l'aide technique de Christelle Nicolas tout au long de cette étude.

Ma contribution à l'étude n°2 de cet axe s'est surtout portée sur l'étude du miR-150, c'est-à-dire de la culture cellulaire aux tests fonctionnels sur les cellules.

Lors de chacune des études de l'axe n°2, j'ai également participé à l'analyse des résultats ainsi qu'à la rédaction de l'article.

PRESENTATION GENERALE DU MANUSCRIT

Ce manuscrit est composée de 5 parties, chacune divisée en 2 axes principaux répondant aux 2 hypothèses principales de cette thèse: l'axe 1 concerne l'intérêt des miARN comme biomarqueurs des MCV aiguës, et l'axe 2 concerne l'intérêt des miARN pour la réparation cardiaque post-IM.

La première partie est une revue de la littérature sur les différents points importants de cette thèse, c'est-à-dire pour l'axe 1, les MCV, les miARN circulants et ce qui est connu de l'utilité des miARN circulants dans les MCV, et pour l'axe 2, la réparation cardiaque post-IM, les EPC, les miARN, et enfin ce qui est connu des miARN dans les fonctions régénératrices des EPC lors de la réparation post-IM.

La deuxième partie décrit les caractéristiques des cohortes de patients, les types cellulaires ainsi que les techniques de biologie moléculaire et cellulaire utilisées dans chacun de ces axes.

La troisième partie décrit les résultats obtenus.

La quatrième partie est une discussion de ces résultats.

Enfin, la cinquième partie est dédiée aux conclusions et perspectives émises à partir de ce travail de thèse.

Ce travail de thèse s'est déroulé au sein du Laboratoire de Recherche Cardiovasculaire du Centre de Recherche Public-Santé à Luxembourg sous la direction du Docteur Yvan Devaux. Il a été financé par le Fonds National de la Recherche (FNR) de Luxembourg, ainsi que par le ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche de Luxembourg.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

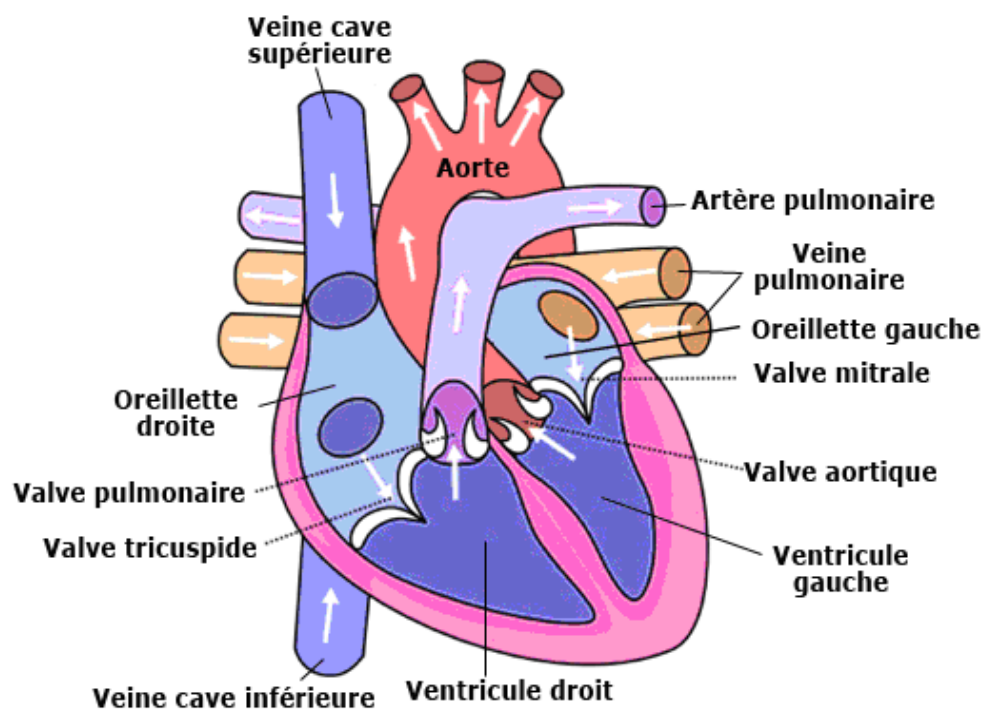
Axe 1: Intérêt des miARN comme biomarqueurs des MCV aigus

1. Les maladies cardiovasculaires

1.1. Le cœur

Le cœur est l'organe vital permettant la circulation du sang dans tout l'organisme. Il permet d'oxygéner les tissus, de distribuer les nutriments et d'éliminer les déchets de l'organisme grâce à ses contractions régulières.

Il est constitué de 4 cavités: deux cavités supérieures, les oreillettes ou atria, et deux cavités inférieures, les ventricules. Il se divise donc en deux parties, le cœur gauche (composé de l'oreillette gauche, et du ventricule gauche, VG) et le cœur droit (oreillette droite et ventricule droit), séparées par le septum atrio-ventriculaire (figure 1).

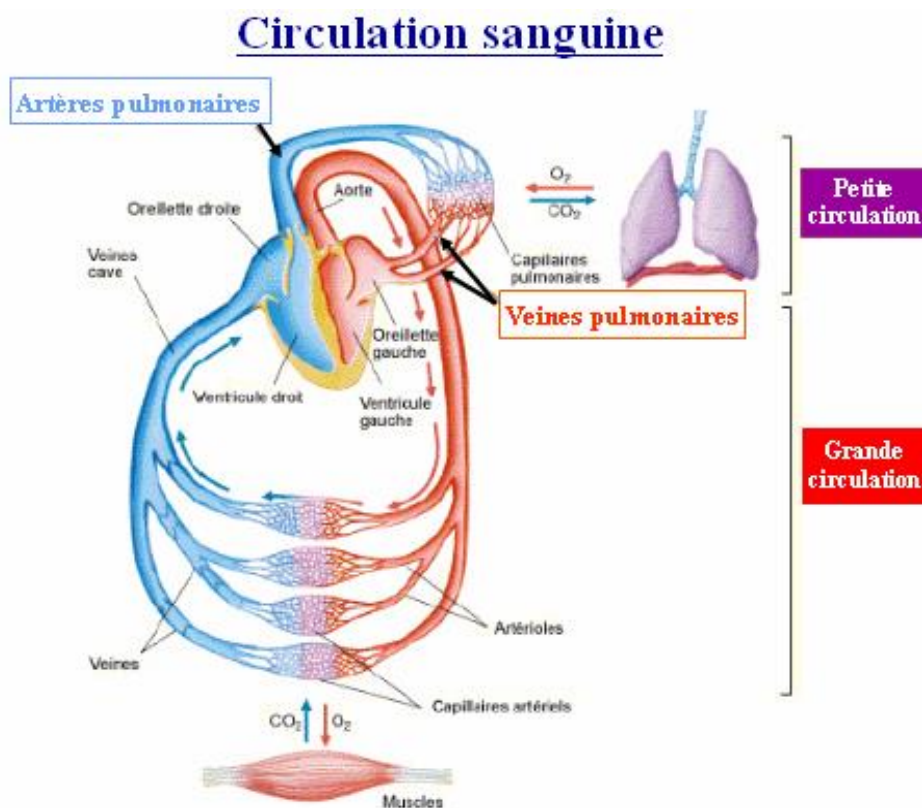


*Figure 1: Schéma du cœur humain
(extrait du site internet http://reflexions.ulg.ac.be/upload/docs/image/jpeg/2008-12/schema_coeu.jpg).*

Le cœur est à l'origine de la petite et la grande circulation (figure 2):

- La petite circulation, également appelée circulation pulmonaire, fait circuler le sang appauvri en oxygène provenant de tout le corps par les veines caves dans l'oreillette droite, puis dans le ventricule droit, et l'éjecte par l'artère pulmonaire dans les poumons, où il va se décharger en gaz carbonique et se charger en oxygène.

- La grande circulation, également appelée circulation corporelle, fait circuler le sang chargé en oxygène provenant des poumons jusqu'au cœur via les veines pulmonaires, il traverse l'oreillette gauche et le VG pour finalement être éjecté dans tout le corps par l'aorte afin d'atteindre les organes et les muscles.



*Figure 2: Le cœur et la circulation sanguine
(image tirée de:*

*<http://www.iav.ac.ma/veto/filveto/guides/phys/physiopharmazine/imagerespir/Image1.png>).
Le sang qui transporte l'oxygène circule entre le cœur et les organes par un réseau d'artères
et de veines très dense.*

Il possède également des valves cardiaques qui permettent au sang de circuler toujours dans le même sens, et de ne pas refluer.

Le cœur possède son propre système d'irrigation: les artères coronaires, qui sont disposées sur sa surface et permettent la vascularisation du myocarde. Il existe 2 artères coronaires

principales, l'artère coronaire droite et l'artère coronaire gauche, chacune se divisant en plusieurs branches. Par exemple, l'artère coronaire gauche se divise en deux branches principales, l'artère interventriculaire antérieure et l'artère circonflexe.

Le cœur possède également son propre système nerveux végétatif, appelé le tissu nodal, présent dans l'épaisseur du myocarde et qui permet sa contractilité. Les battements cardiaques possèdent un cycle particulier appelé la révolution cardiaque, divisée en 3 phases: la systole auriculaire, correspondante au remplissage des oreillettes et leur contraction afin d'éjecter le sang dans les ventricules, suivi de la systole ventriculaire, c'est-à-dire la contraction des ventricules afin d'éjecter le sang dans la circulation, et enfin la diastole, correspondante au remplissage passif des oreillettes dû à la décontraction cardiaque.

Au niveau histologique, le cœur est constitué de 3 tuniques:

- Le péricarde, qui correspond à l'enveloppe externe du cœur, et qui est composé de feuillets: le feuillet fibreux à l'extérieur du cœur, puis le feuillet pariétal, qui est séparé du feuillet viscéral par l'espace péricardique. Cet espace est rempli de liquide interstitiel afin de permettre les mouvements cardiaques, composé principalement de tissu conjonctif et de fibroblastes. L'épicarde fait également parti de cette couche: il s'agit du feuillet externe du feuillet viscéral, en contact avec l'espace péricardique.

- Le myocarde, qui correspond au muscle cardiaque. Il possède plusieurs types cellulaires dont majoritairement des cardiomyocytes (représentant 70% du volume cardiaque) et des cellules telles que des fibroblastes, et plus rarement des cellules endothéliales ¹⁶.

- L'endocarde, qui correspond à la fine membrane tapissant la face interne des cavités. Il s'agit d'un endothélium se prolongeant par l'intima des vaisseaux.

1.2. Généralités, épidémiologie et étiologie des MCV

Les MCV sont la première cause de décès dans le monde, selon l'OMS. En effet, le nombre de décès imputables chaque année aux MCV est supérieur à n'importe quelle autre cause. L'OMS estime que 17,3 millions de personnes sont décédées à la suite de MCV en 2008, ce qui représente 30% de la mortalité mondiale totale. Plus en détails, parmi ces 17,3 millions de décès, l'OMS estime que 7,3 millions sont imputables à des cardiopathies coronariennes et 6,2 millions à des accidents vasculaires cérébraux (AVC) ¹⁷. D'ici 2030, le nombre de personnes décédant de MCV devrait atteindre 23,3 millions, ce qui maintiendrait les MCV comme première cause de décès au niveau mondial ¹.

Les MCV correspondent à des désordres affectant le cœur et les vaisseaux sanguins. Il en existe plusieurs types: les cardiopathies coronariennes (atteintes des artères coronaires, irriguant le muscle cardiaque, tel que l'IM), les maladies cérébro-vasculaires (atteintes des vaisseaux irriguant le cerveau), les artériopathies périphériques (atteintes des artères alimentant les membres supérieurs et/ou inférieurs), les cardiopathies rhumatismales (dommages myocardiques et valvulaires, dus à un rhumatisme articulaire aigu provoqué par une bactérie streptocoque), les malformations cardiaques congénitales, les thromboses veineuses profondes et les embolies pulmonaires (obstruction des veines des jambes ou des bras par un thrombus, susceptible de se détacher et de migrer vers le cœur ou les poumons).

Il existe plusieurs facteurs de risque CV connus, responsables du développement des MCV. Il s'agit de facteurs de risque dits modifiables tels que le tabagisme, l'alcool, une mauvaise alimentation entraînant de l'hyperlipidémie ou de l'obésité, un manque d'activité physique, de l'hypertension artérielle ou du diabète, mais également des facteurs de risque inévitables tels que l'hérédité ou l'historique familial, des antécédents CV, l'âge ou le genre. Il a été prouvé que des modifications comportementales comme cesser de fumer, réduire l'apport en sel dans l'alimentation, manger équilibré, pratiquer une activité physique régulière et éviter l'alcool pourraient permettre de réduire le risque de MCV, tout comme il est également possible de traiter l'hypertension, le diabète ou l'hyperlipidémie pour cela.

1.3. Les MCV aiguës étudiées

Nous nous sommes donc intéressés tout particulièrement à certaines MCV, telles que la douleur thoracique, l'IM, l'ICA et l'AC. Ces MCV ont la particularité d'être des événements aigus, arrivant soudainement et dont le diagnostic et le pronostic sont encore partiellement imparfaits.

1.3.1. La douleur thoracique

La douleur thoracique ou douleur à la poitrine est un symptôme clinique communément associé aux MCV, alors qu'il est souvent dû à une cause non cardiaque². Lorsque quelqu'un arrive aux urgences avec ce symptôme, il peut être à la fois bénin ou un véritable danger de mort pour ce patient parce qu'il apparaît de façon aiguë, subitement. Il est donc important de pouvoir diagnostiquer et traiter au plus vite, car beaucoup de patients dans une condition

sérieuse attendent beaucoup trop longtemps avant d'arriver aux urgences ou de consulter un médecin.

La prise en charge de ces patients démarre par émettre au plus vite et de la façon la plus sûre un diagnostic. Pour cela, différentes étapes sont à prendre en compte.

Tout d'abord, il est important de connaître l'historique du patient ainsi que les facteurs de risque CV qu'il pourrait avoir.

Après, un examen physique doit permettre d'éliminer ou de confirmer la cause de la douleur. Elle doit être décrite au mieux et bien perçue par le patient, ainsi que tout autre symptôme physique. Par exemple, s'il s'agit d'une douleur suggérant une ischémie cardiaque: la douleur doit être lourde, irradiant le bras gauche et le cou, accompagnée de nausées, palpitations, sueurs, ou d'un souffle raccourci. Si certains de ces signes sont détectés, la prise en charge de ces patients peut se faire dans des unités spécialisées, comme les soins intensifs en cardiologie. La sévérité de la douleur n'est pas un très bon prédicteur de complications imminentes telles que l'AC, c'est pour cela qu'il faut au mieux décrire l'inconfort de cette douleur afin de réduire une mortalité hors hôpital, et d'exclure des conditions bénignes.

Des tests médicaux sont également demandés tels qu'un électrocardiogramme (ECG), un monitoring continu d'ECG, une oxymétrie de pouls, des tests sanguins standards ou une radiographie du thorax. Leur choix dépend de la piste suivie par le clinicien. Parmi les tests sanguins, il s'agit surtout d'une numération sanguine mais aussi d'une mesure des troponines cardiaques (cTn), des créatines phosphokinases (CPK) ou des enzymes du foie par exemple. Différents traitements peuvent être à ce niveau-là administrés suivant la piste du clinicien, même si le diagnostic n'est pas complètement établi, comme de l'aspirine.

Les patients sont généralement classés dans une de ces catégories selon le diagnostic:

- Les patients avec IM aigu.
- Les patients avec angine de poitrine instable .
- Les patients à maladies cardiaques mais non-coronaires, c'est-à-dire les myocardites, péricardites, l'IC, les dysrythmies cardiaques, ou les urgences hypertensives.
- Les patients avec des douleurs à la poitrine non cardiaques, comme les douleurs musculo-squelettiques ou les désordres gastro-œsophagiens.
- Les patients à symptômes d'origine inconnue.

Le diagnostic n'est donc pas évident à émettre lors d'une douleur thoracique, et la prise en charge du patient peut prendre un certain temps et engager le pronostic vital du patient.

Il faudrait trouver de nouveaux outils permettant de mieux diagnostiquer ces patients.

De plus, dans le cas d'une suspicion de syndrome coronarien aigu, le diagnostic n'est pas évident car certains tests très importants comme la mesure des cTn nécessitent souvent plusieurs dosages à différents temps, chez la majorité des patients avec douleur thoracique aiguë¹⁸. La capacité diagnostique de ces marqueurs a été améliorée par l'introduction du dosage de troponines T cardiaques hypersensibles (hs-cTnT). En effet, les tests actuels de mesure de hs-cTnT^{19,20} peuvent détecter des cTn à des concentrations plus de 10 fois plus faibles que les tests conventionnels et donc plus précocement comme lors d'un IM. C'est pour cela qu'ils ont été récemment ajoutés dans la démarche à suivre lors du diagnostic d'un IM¹⁸. Cependant, les cliniciens doivent souvent faire face à un nombre élevé de patients avec des valeurs positives de hs-cTnT qui peuvent être dues à des causes non cardiaques²¹, à d'autres maladies²² ou à l'âge²³, mais aussi parfois au manque de sensibilité du dosage de la hs-cTnT durant la phase initiale d'un IM.

Cela peut compliquer le diagnostic des patients en insuffisance rénale terminale traités par hémodialyse, car ces patients ont des taux élevés de cTn^{24,25}. Le diagnostic d'un syndrome coronarien aigu reposant sur des variations de taux de cTn^{26,27}, plusieurs mesures au cours du temps sont nécessaires ce qui implique un délai avant l'émission du diagnostic. Chez ces patients, il est suggéré que les cTn ne seraient pas éliminées par hémodialyse, mais l'origine de leur élévation n'a pas été clarifiée. Plusieurs hypothèses ont été mises en évidence²⁸ mais actuellement rien n'a été prouvé car même une transplantation rénale ou une amélioration de la fonction rénale ne régularise pas le taux de cTn²⁹.

Il est donc important de trouver un nouvel outil diagnostique pour détecter les syndromes coronariens chez ces patients arrivant aux urgences avec une douleur thoracique.

1.3.2. L'infarctus du myocarde

L'IM aigu correspond à une nécrose d'une partie du cœur (le VG généralement) due à une ischémie d'une artère coronaire provoquée par rupture d'une plaque d'athérome. Plusieurs grands groupes tels que l'ESC (European Society of Cardiology) ou l'AHA (American Heart Association) ont défini ensemble l'IM comme une pathologie menant à une mort des cellules myocardique par ischémie prolongée³. Cette pathologie se reconnaît généralement par l'historique du patient et par des données cliniques incluant les résultats d'ECG, une élévation de marqueurs de nécrose myocardique et de l'imagerie.

Plus en détails, au niveau clinique, il se caractérise par une soudaine douleur thoracique lourde, à gauche au niveau de la poitrine, et qui parfois irradie jusqu'au bras ou jusqu'au côté gauche de la nuque. Cela peut s'accompagner d'un souffle court, de sueurs, nausées, vomissements, battements cardiaques anormaux, fatigue et d'anxiété.

La prise en charge de ces patients doit se faire très rapidement. En effet, plus le temps passe avant le diagnostic et le début du traitement, plus le cœur souffre et plus l'IM s'étend. Le diagnostic doit donc se faire de façon très rapide.

Pour cela, il est tout d'abord important de connaître les antécédents médicaux du patient ainsi que ses facteurs de risque CV, tels qu'un antécédent de MCV, l'âge, le genre, l'hypertension, le diabète, l'hyperlipidémie, le manque d'exercice, le tabac ou l'obésité.

S'en suit un examen médical physique afin de vérifier qu'il s'agit bien de la douleur correspondante à un IM et non pas une autre pathologie (liée au cœur ou non). Des tests médicaux sont aussi effectués comme une échocardiographie ou un ECG caractérisé par des ondes Q pathologiques et parfois par une élévation du segment ST. Des examens sanguins sont également demandés avec en priorité une mesure des marqueurs de dommage des cellules myocardiques tels que les cTn (cTnT ou cTnI) et la fraction MB de la créatine kinase (CK) qui augmentent lors d'un IM³⁰. Pour les cTn, un seuil décisionnel correspondant au 99^{ième} percentile de la concentration de la population de référence est déterminé pour chaque test. Le diagnostic de l'IM est donc basé sur une élévation et/ou baisse d'au moins 1 point par rapport au seuil de décision des concentrations de cTn. Les mesures doivent être effectuées sur prélèvements sanguin dès l'arrivée du patient aux urgences et doivent être répétées au moins 3 à 6 heures plus tard.

On distingue donc 2 types d'IM (figure 3):

- STEMI (ST elevation myocardial infarction), caractérisé par la présence d'un segment ST élevé au-dessus du tracé basal de l'ECG, une occlusion complète d'une artère coronaire (absence de flux), et des CK supérieures au 99^{ième} percentile associé au test donné (600U/L généralement).

- NSTEMI (non-ST elevation myocardial infarction), caractérisé par l'absence d'élévation du segment ST ou dépression du segment ST, la mise en évidence clinique d'une lésion dans une des artères coronaires, et un taux de cTnT positif après 24h, (supérieur au 99^{ième} percentile associé au test donné, donc >0,03µg/L généralement).

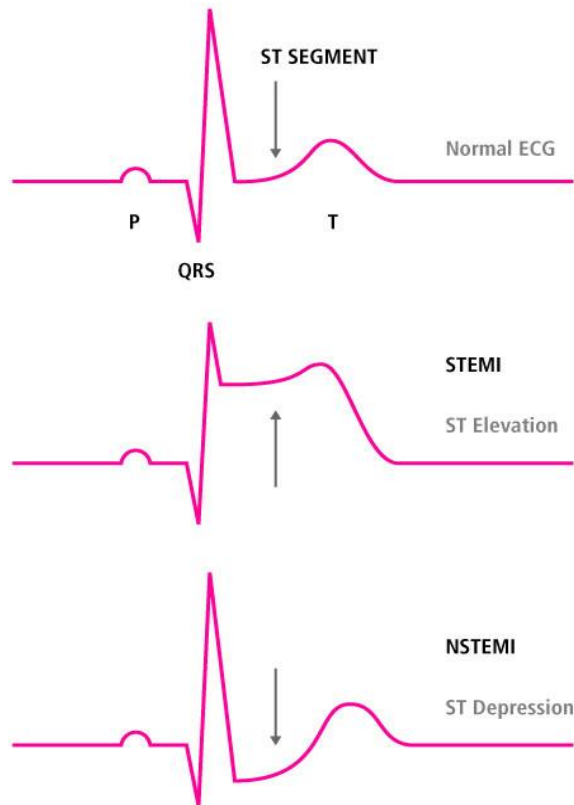


Figure 3: Tracé de l'ECG caractéristique des STEMI et NSTEMI (image issue de www.thrombosisadviser.com).

Les patients STEMI sont très vite caractérisés par l'élévation du segment ST. Par contre, le diagnostic est plus difficile pour les patients NSTEMI.

Actuellement, une amélioration de la prise en charge de patients a permis de réduire l'étendue de l'atteinte myocardique, grâce au développement de biomarqueurs cardiaques spécifiques du myocarde comme la hs-cTnT^{19,20} et de techniques d'imageries plus sensibles permettant de détecter au mieux les IM dont l'atteinte myocardique est faible.

Cependant, comme expliqué précédemment, ce dosage n'est pas totalement spécifique d'un dommage cardiaque. Il est important de pouvoir distinguer les causes aiguës de l'élévation de ces marqueurs qui nécessitent une variation des valeurs de cTn, des élévations chroniques qui ne doivent pas changer de façon subite ou d'autres causes telles que l'âge³¹.

Il y a donc un besoin clinique au niveau du diagnostic de l'IM, en particulier pour les patients NSTEMI ou ayant d'autres syndromes perturbant le dosage des cTn.

Concernant le pronostic de ces patients post-IM, il varie énormément en fonction de l'état de santé des patients, de l'extension des dommages au cœur pendant l'IM ainsi que du traitement donné. Il est important de préciser que le risque de mort ou d'un IM récurrent peut

diminuer grâce à l'amélioration des conditions de vie des patients en diminuant les facteurs de risque CV. De plus, après IM, les patients sont souvent sous médication à long terme, afin de prévenir la survenue d'un autre évènement cardiaque.

Il est également possible de prédire le devenir de ces patients par des paramètres cliniques enregistrés lors de l'hospitalisation due à l'IM ainsi que par un suivi à quelques mois. Les outils actuels pour le pronostic post-IM sont la mesure du taux de Nt-pro-BNP (N-terminal pro-brain natriuretic peptide), l'échocardiographie et l'IRM (imagerie par résonance magnétique) pour pouvoir mesurer différents paramètres tels que la fonction diastolique et systolique du VG, ainsi que la fraction d'éjection (FE) du VG. Cependant, le taux plasmatique du BNP varie beaucoup après IM, et encore plus avec un antécédent d'IM, ce qui implique de multiples mesures et limite l'utilisation de ce biomarqueur³². De plus, son taux peut être également modulé par un changement de la fonction diastolique et systolique du VG, une hypertrophie du VG, une tachycardie, ischémie, ou même une dysfonction du rein. Tous ces facteurs expliquent au moins en partie l'absence de consensus ou de recommandations de son utilisation pour prédire le devenir des patients après IM³³. La dysfonction du VG reste le seul prédicteur de mortalité après STEMI. Beaucoup de candidats ont été identifiés comme potentiels biomarqueurs pronostiques tels que la galectine 3, le ST2 soluble, la MR-proADM (mid-regional pro-adrenomedullin), mais aucun n'est recommandé au niveau clinique. Il n'y a donc actuellement aucun biomarqueur pronostique post-IM satisfaisant.

1.3.3. L'Insuffisance cardiaque

L'ICA correspond à une défaillance de la structure ou de la fonction cardiaque, le cœur devenant incapable de maintenir un débit cardiaque satisfaisant les besoins énergétiques et métaboliques de l'organisme⁴. Il s'agit principalement d'une dysfonction systolique et/ou diastolique, empêchant le cœur de bien éjecter le sang vers l'aorte quand cela touche le VG, ou vers l'artère pulmonaire pour le ventricule droit.

Le corps va s'adapter à la baisse du débit cardiaque en irriguant au maximum les organes vitaux (cœur, cerveau) et en baissant l'apport de sang aux autres organes par vasoconstriction. Cette baisse de débit affecte surtout les reins, ce qui va provoquer une activation du système rénine-angiotensine, qui lui-même entraîne une diminution du volume d'urine et donc une augmentation du volume sanguin. Cela s'accompagne par une légère augmentation de la pression télédiastolique due au sang stagnant dans le ventricule. Ce

phénomène complexe s'accompagne également par une diminution de la FE, provoquant une tachycardie et une hypertrophie des cardiomyocytes, ce qui entraîne une augmentation de la taille du cœur. L'ICA peut également s'accompagner d'atteintes extra-cardiaques comme par exemple un œdème pulmonaire.

Au niveau clinique, il s'agit d'un syndrome associé à des symptômes typiques tels qu'une dyspnée aiguë, de la fatigue, un gonflement des chevilles, et parfois une douleur thoracique, des nausées, un ralentissement psychomoteur et un syndrome confusionnel.

Comme toutes les MCV, l'historique du patient ainsi que ces facteurs de risque de CV sont importants. S'en suit un examen médical physique afin de mettre en évidence une pression veineuse jugulaire élevée, des râles crépitants et un choc de pointe.

Les principaux tests médicaux effectués sont une échocardiographie et un ECG afin de mettre en évidence une potentielle hypertrophie du VG. Une radiographie de la poitrine peut également être effectuée mais son utilisation est limitée pour l'ICA.

Des examens sanguins sont également effectués tels que la mesure du sodium, du potassium, de la créatinine, taux de filtration glomérulaire estimée, mais aussi des tests hématologiques, et parfois une mesure du taux d'enzymes hépatiques, ou d'hormones thyroïdiennes. Il faut surtout mesurer les peptides natriurétiques (BNP ou Nt-proBNP plus particulièrement), qui augmentent fortement lors d'une ICA. Cette famille d'hormones est sécrétée en grande quantité quand le cœur est malade ou quand la charge de sang dans les cavités du cœur est augmentée (par embolie pulmonaire ou insuffisance rénale). Selon l'ESC, le seuil d'exclusion chez des patients avec ICA est de 300 pg/mL pour la NT-proBNP et 100 pg/mL pour le BNP. La mesure des cTn peut également se faire, indiquant un problème au niveau des artères coronaires, mais son élévation lors d'une ICA est plutôt associée à un mauvais pronostic. En effet, l'ICA est associée à un haut taux de mortalité et de réhospitalisation ³⁴.

Il existe plusieurs façons de classer les patients avec insuffisance cardiaque (IC). Au sein de cette thèse nous utilisons uniquement la classification suivante: les patients qui ont de l'IC depuis un certain temps sont des patients avec insuffisance cardiaque chronique (ICC), et un patient sous traitement, avec symptômes et signes mais qui est stable depuis au moins un mois est considéré comme « stable ». Si un patient avec ICC stable se détériore, alors il devient un patient IC décompensé, et si cela arrive soudainement, c'est-à-dire de façon aiguë menant à une hospitalisation, alors on parle d'un patient ICA décompensé. Il y a également les patients ICA de novo, c'est à dire développant de l'ICA de façon soudaine, qui apparaît comme conséquence d'une autre maladie telle qu'un IM, ou une maladie totalement résolue

comme une myopéricardite virale aiguë. Le terme « IC congestive » est parfois également utilisé, il s'agit d'ICC ou d'ICA avec signe de congestion, c'est-à-dire avec rétention d'eau ou de sodium, qui peut se traiter par un traitement diurétique.

Il est très difficile d'émettre un diagnostic, surtout dans les stades précoces de la maladie, car beaucoup des symptômes ne sont pas uniquement associés à l'ICA ou ont une valeur diagnostic limitée³⁵. Beaucoup des signes associés à l'ICA tels que l'œdème périphérique sont dus à la congestion et sont non-spécifiques. De plus, d'autres MCV peuvent causer une dysfonction ventriculaire systolique. On note également que certains des symptômes plus spécifiques sont moins communs comme l'orthopnée ou la dyspnée paroxystique nocturne ou sont très difficiles à détecter. Les symptômes et signes sont également difficile à identifier chez des patients obèses³⁶, âgés³⁷ ou ayant une maladie chronique des poumons³⁸.

Les peptides natriurétiques ont été démontrés très utiles pour améliorer le diagnostic et les thérapies à court ou long terme mais leur utilité est modérée puisqu'ils sont modulés par l'âge ou l'obésité. Même si un algorithme basé sur l'ECG et la mesure des peptides natriurétiques a été créé pour diagnostiquer les patients (figure 4), le diagnostic de l'ICA n'est pas encore parfait et certains patients restent difficile à diagnostiquer.

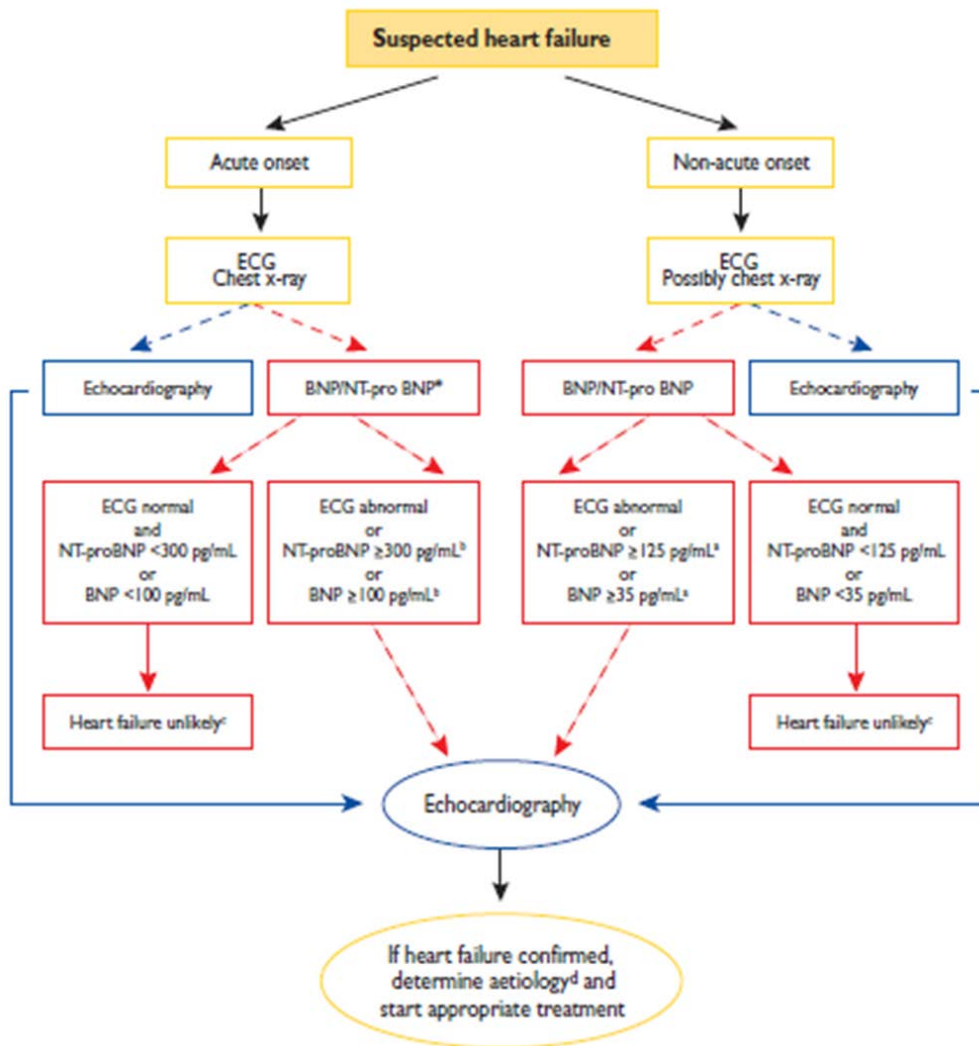


Figure 4: Schéma pour émettre le diagnostic chez des patients avec ICA suspectée (figure issue des recommandations de l'ESC⁴).

Deux voies alternatives existent pour le diagnostic: la voie bleue basée sur l'échocardiographie et la voie rouge basée sur les peptides natriurétiques.

Le problème concerne surtout le pronostic post-ICA qui reste très incertain. En effet, malgré une amélioration du taux de survie après IC ces dernières années, le taux de réadmission à 30 jours après sortie de l'hôpital pour ICA reste supérieur à 20%³⁹. Le risque standardisé de réadmission toutes causes confondues à 30 jours après ICA n'a pas changé ces dernières années⁴⁰. Beaucoup d'éléments apportent des informations aidant au pronostic, tels que l'examen physique ou l'historique du patient. Les peptides natriurétiques sont utilisés avec d'autres facteurs comme la ST-2 soluble ou la galectine-3⁴¹ mais ils n'ont pas été démontrés très efficaces⁴². D'autres facteurs tels que les facteurs de stress (MR-proADM) ou des

marqueurs de l'inflammation (protéine C-réactive) ont été démontrés capable de prédire la mort à long terme, que ce soit utilisé seul, combinés ou ajoutés à des modèles cliniques ⁴². Même si le diagnostic n'est pas parfait, il y a surtout un manque de biomarqueurs spécifiques pronostiques de l'ICA.

1.3.4. L'Arrêt cardiaque

L'AC est caractérisé par un arrêt de la circulation sanguine, suffisant pour causer une perte de conscience et une arrêt respiratoire chez un individu ⁵. Il peut mener à la mort de l'individu s'il n'est pas immédiatement traité. Tout dépend s'il s'agit d'un AC ayant lieu dans un hôpital ou hors hôpital: le patient sera immédiatement réanimé si cela se passe à l'hôpital alors qu'hors hôpital, il faut rapidement prévenir les secours et effectuer une réanimation cardio-pulmonaire ou utiliser un défibrillateur automatique externe si il y en a un à proximité afin de choquer le cœur et de tenter de le refaire battre.

Durant les 30 dernières années, la prévalence d'AC étaient de 38 patients pour 100 000 par an en Europe ⁴³. Le taux de survie après AC est très faible (>20%) ⁴⁴.

Il existe différents facteurs de risque reconnus tels que des antécédents de MCV (IM ou IC principalement) ou un précédant AC, des antécédents familiaux d'AC ou une FE relativement basse.

Les causes d'AC peuvent être multiples, tels qu'un traumatisme, une électrocution ou une intoxication. Mais concernant l'AC soudain, sans facteurs externes, il s'agit principalement d'un dérèglement des mécanismes électriques cardiaques comme une fibrillation ventriculaire qui dégénèrent (comme lors d'un IM) ou une tachycardie ventriculaire sévère. Cependant, beaucoup d'AC démarrent également par une sévère bradyarythmie, une asystolie (comme lors d'un trouble de la conduction cardiaque) ou une activité électrique sans pouls.

Au niveau clinique, il s'agit d'un état de mort apparente, caractérisé généralement par une perte de connaissance, une absence de mouvement, de réaction à la parole, au toucher ou à la douleur, une absence de respiration mais également de pouls, accompagnés d'une pâleur ou cyanose et d'une dilatation des pupilles. Parfois, des convulsions et une respiration brève d'agonie peuvent également s'ajouter.

Au niveau de la prise en charge des patients, il s'agit surtout ici de réanimer la personne en priorité et ensuite d'essayer de limiter les dégâts au cœur, mais également au cerveau. Pour cela, après réanimation cardio-pulmonaire, les patients sont suivis par ECG et

électroencéphalogramme. Différents paramètres sont également mesurés afin d'évaluer les dommages cardiaques comme la mesure de la CPK et de cTnT, ainsi que les dommages neurologiques, avec la mesure de la procalcitonine (PCT) et de l'énolase spécifique des neurones (NSE). Une évaluation neurologique est effectuée durant l'hospitalisation des patients, afin de les classer dans le score CPC (cerebral performance category) et d'émettre un pronostic neurologique:

- CPC-1: pas de séquelles neurologiques.
- CPC-2: peu de séquelles neurologiques.
- CPC-3: sévère séquelles neurologiques.
- CPC-4: coma.
- CPC 5: mort.

Concernant le diagnostic de l'AC, seul le médecin peut évaluer le risque d'avoir un AC grâce à différents examens tels qu'une échocardiographie, un ECG, une radiographie thoracique, une épreuve d'effort ou un cathétérisme cardiaque.

Concernant le pronostic après AC, l'une des thérapies actuellement utilisée et prouvée efficace est l'hypothermie thérapeutique^{45,46}. Malgré cela, le devenir des patients est variable. Il est important de trouver un biomarqueur pronostique chez les patients ressuscités pour éviter les traitements à long terme chez des patients à faible chance de rétablissement (en coma ou état végétatif) et d'assurer un traitement maximal aux patients à bon pronostic. Cependant, actuellement, il n'y a pas de biomarqueur pronostique « idéal »⁴⁷.

Plusieurs biomarqueurs potentiels peuvent être utilisés comme la PCT⁴⁸, dont le taux élevé est associé avec un mauvais pronostic post ressuscitation⁴⁹ ou la NSE, qui semble être le biomarqueur le plus prometteur car elle est un très bon prédicteur d'un mauvais pronostic, et est moins efficace pour la prédiction d'un bon pronostic⁵⁰. Cependant, il n'y a pas eu d'études à grandes échelles testant ces biomarqueurs après hypothermie.

Il n'y a donc actuellement pas de biomarqueur idéal pouvant permettre de prédire le devenir de patients ayant survécu à un AC.

2. Les miARN circulants

2.1. Biogénèse des miARN et mode d'action

Les miARN sont de petits ARN non codants (18 à 22 nucléotides), simple brin, qui inhibent l'expression des gènes par appariement avec les ARNm cibles⁷. Découverts en 1993 chez *Caenorhabditis Elegans*⁶, leur mécanisme de biosynthèse et d'action est assez complexe et pas encore totalement élucidé (voir figure 5). Les miARN peuvent provenir d'introns de gènes codant pour des protéines, mais aussi de gènes de miARN ou de transcrit polycistroniques⁵¹.

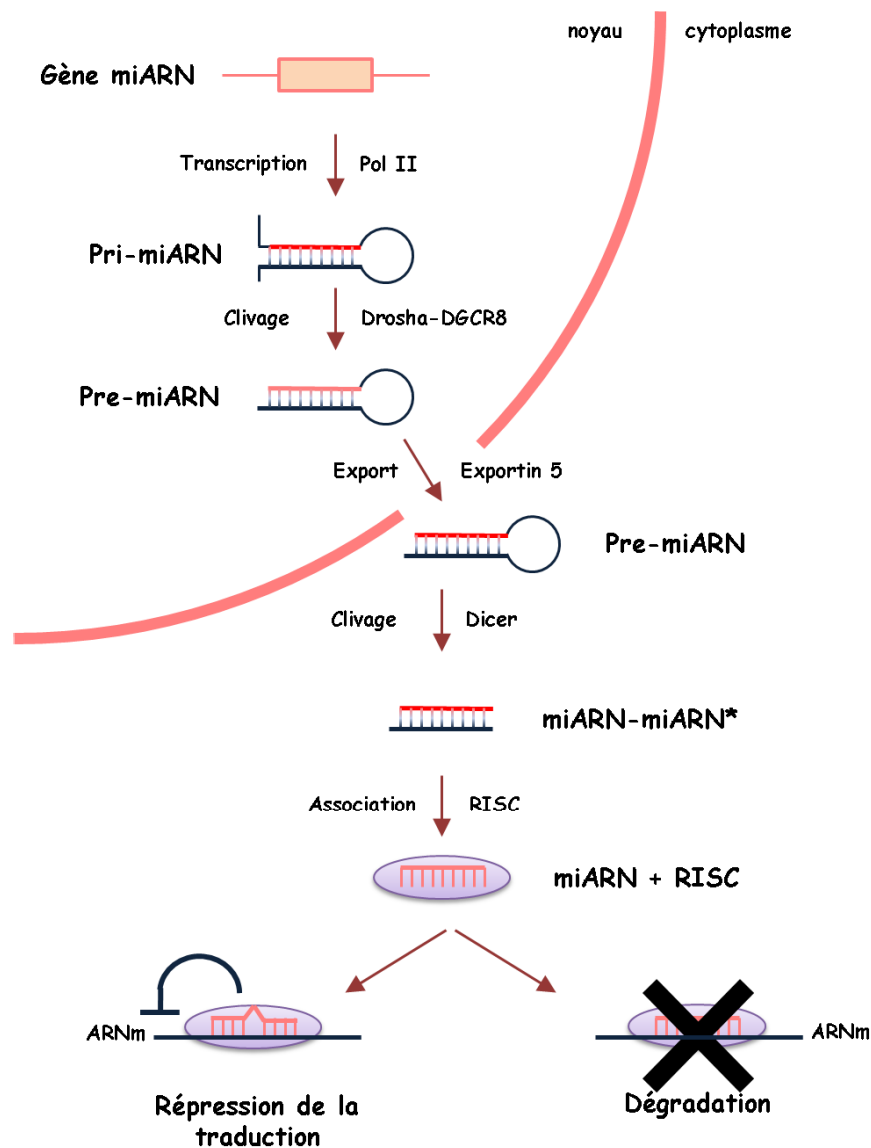


Figure 5: Voie de biosynthèse des miARN.

Les miARN sont d'abord transcrits par l'ARN polymérase II en pri-miARN, qui sont de longs précurseurs doubles brins polyadénylés avec une coiffe et contenant des motifs tige/boucle. Ce pri-miARN est ensuite clivé en pré-miARN par un complexe microprocesseur contenant l'endonucléase Drosha et son cofacteur DGCR8 (di george syndrome critical region gene 8) ainsi que d'autres facteurs. Ce précurseur pré-miARN fait entre 65 et 70 nucléotides de long, et est formé d'une seule structure tige/boucle imparfaite. Il est ensuite exporté dans le cytoplasme grâce à l'exportine 5, par un transport actif GTP-dépendant. Dans le cytoplasme, l'endonucléase Dicer va couper la structure tige/boucle: un duplex miARN-miARN* est alors formé, entre 18-24 nucléotides de long. Un des deux brins est dégradé alors que le deuxième est préférentiellement choisi et maintenu dans le complexe: il s'agit du miARN mature. Celui-ci va être incorporé dans un complexe multiprotéique RISC (RNA-induced silencing complex) comprenant une endonucléase de la famille des Argonautes, Ago2, qui va stabiliser l'interaction entre le miARN et son ARNm cible. Le miARN mature contient une séquence spécifique dites « seed »: il s'agit des nucléotides 2 à 7 de sa région 5'UTR (untranslated region). Le miARN mature, toujours associé au complexe RISC, va alors se fixer sur l'ARNm cible: la séquence seed va interagir par appariement avec le 3'UTR de l'ARNm. Si l'appariement n'est que partiel, il n'y aura qu'une répression traductionnelle de l'ARNm alors que si la complémentarité est parfaite, cela entraîne une coupure et dégradation du duplex miARN-ARNm. Ces deux voies mènent donc à l'inhibition de l'expression du gène cible. Il existe un autre mode de biogenèse de miARN, appelés mirtrons, qui proviennent d'introns et forment directement des pré-miARN en échappant au clivage par Drosha ⁵².

Chez les mammifères, la répression traductionnelle est la situation la plus commune. Très rarement, le miARN peut se lier au 5'UTR de l'ARNm cible au lieu du 3'UTR ⁵³, dans une séquence codante de l'ARNm ou à la jonction intron-exon ⁵⁴. Il a aussi été reporté que les miARN peuvent augmenter l'expression protéique du gène cible en activant son ARNm ⁵⁵, ou même retourner dans le noyau pour réguler l'expression de gènes ⁵⁶. Cependant, ces mécanismes ne sont pas encore totalement élucidés.

Actuellement, plus de 30424 miARN matures ont été identifiés dans 206 espèces différentes (selon miRBase version 20, <http://www.mirbase.org/>). Il est important de préciser qu'un seul miARN peut cibler plus de 200 ARNm et qu'un seul ARNm peut être ciblé par de multiples miARN. De cette façon, les miARN peuvent réguler plus de 30% de tous les gènes codant

pour des protéines. Cela montre le degré de régulation de l'expression des gènes par les miARN.

2.2. Les miARN circulants

Des miARN ont été découverts circulants dans des fluides biologiques tels que l'urine ⁸ et la circulation sanguine ^{9, 57}. Au sein de ces fluides, les miARN circulants sont très stables et résistants à la dégradation par des RNases. Leur présence dans le sang peut s'expliquer par une libération par des cellules mortes (mécanisme passif), ou par une sécrétion de cellules vivantes (mécanisme actif).

Les miARN peuvent agir comme des facteurs paracrines ^{58, 59}: ils sont sécrétés par différents types cellulaires, circulent en étant inclus soit dans des composants cellulaires tels que des microvésicules ^{60, 61}, des exosomes ^{62, 63}, des corps apoptotiques ⁶⁴ pour aller réguler l'expression de gènes dans d'autres types cellulaires (l'association de ces miARN avec diverses molécules telles que RISC ou Ago2 détermine le type de vésicule ⁶⁵), ou soit en étant intégrés au sein de complexes protéiques ⁶⁶, de lipides ou de HDL (high-density lipoprotein) ⁶⁷.

Par exemple, le miR-150 est sécrété dans des microvésicules par des cellules sanguines pour stimuler la migration de cellules endothéliales microvasculaires ⁶⁸. La sécrétion au sein d'exosomes a été caractérisée dans des cellules infectées par EBV (Epstein-Barr virus): en effet, des cellules de carcinomes atteintes par le virus latent secrètent des exosomes contenant des miARN de ce virus ⁶⁹.

Toutes ces données sont résumées dans la figure suivante:

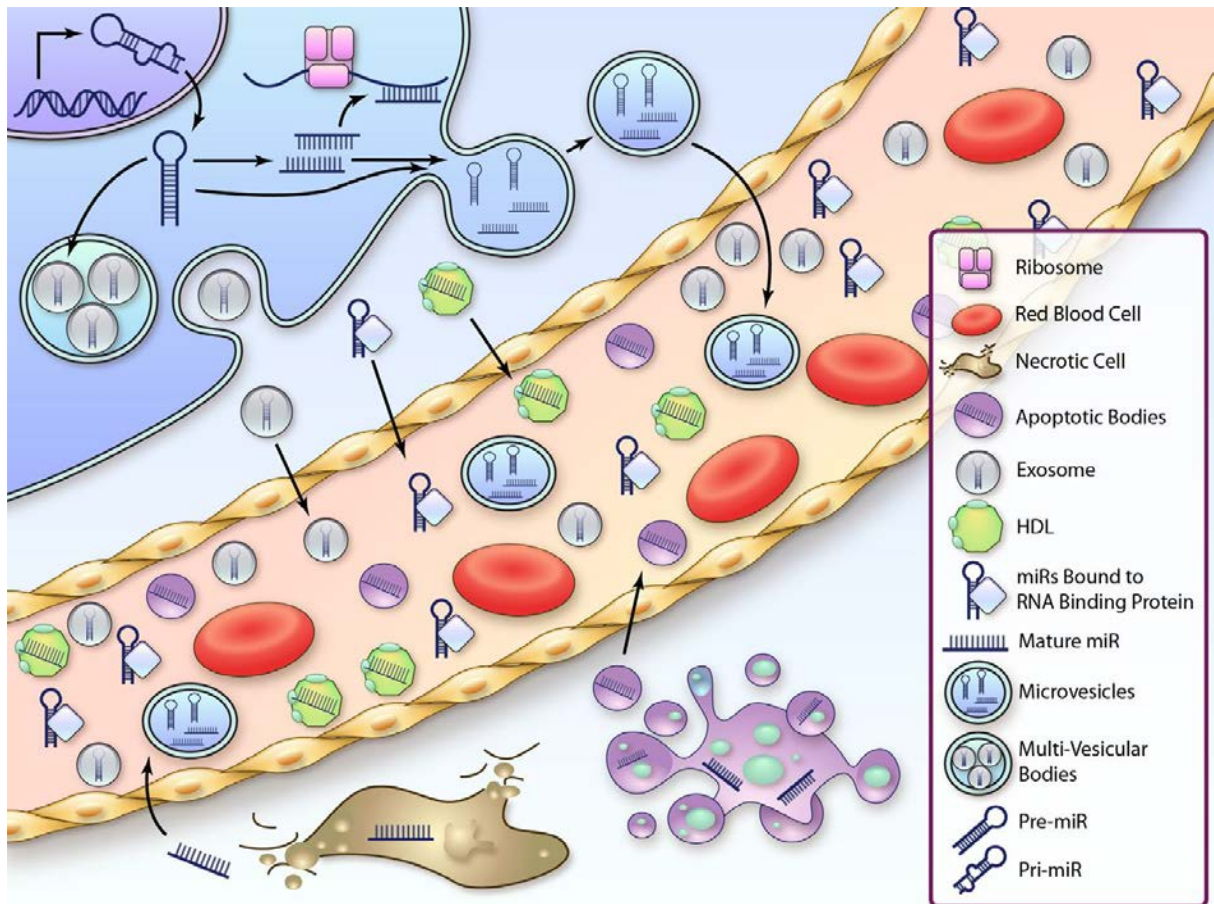


Figure 6: Origines des miARN circulants (figure issue de Kumarswamy et coll. ⁷⁰).

Les miARN peuvent provenir de cellules apoptotiques ou nécrotiques, ou être sécrétés dans des microvésicules ou exosomes. Ils peuvent également être associés à des complexes protéiques ou des HDL.

Tous ces éléments, tels que leur présence dans le sang, leur stabilité, et leur rôle de facteur paracrine, sont en faveur d'un potentiel rôle des miARN circulants comme biomarqueurs, et cibles thérapeutiques, en particulier pour les MCV.

Pour cela, de nouvelles technologies ont été développées afin de pouvoir mesurer et quantifier de manière fiable dans ces fluides le taux de miARN circulants, en raison de leur petite taille. Nous avons donc utilisé ces nouvelles technologies au cours de cette thèse qui sont spécifiques des miARN.

3. Les miARN circulants dans les MCV aiguës

Nous allons tout d'abord développer une partie sur les miARN circulants et l'influence des facteurs de risque CV sur leur taux puis nous allons ensuite nous focaliser sur les MCV d'intérêt uniquement, et voir ce qui est connu sur les miARN circulants et leur utilisation en tant que biomarqueurs diagnostiques et pronostiques.

3.1. Influence des facteurs de risque CV

- L'hypertension

L'hypertension est l'une des causes de mort prématurée les plus importantes, puisque plusieurs millions de personnes dans le monde en souffrent ⁷¹. Peu d'associations avec les miARN circulants ont été mises en évidence. Vingt-sept miARN étaient différentiellement exprimés entre des patients hypertensifs et des patients non-hypertensifs, dont le miARN let-7^e (exprimé par les cellules endothéliales microvasculaires du myocarde), qui augmentait chez les hypertensifs et le miR-296-5p (régulant l'angiogenèse) qui diminuait chez les hypertensifs ⁷². Une étude a comparé les miARN circulants chez des patients ayant un syndrome métabolique, hypertendus et des contrôles. Les miR-130a et miR-195 étaient surexprimés chez les patients avec syndrome métabolique ou hypertendus, et corrélés avec la pression sanguine ⁷³. Par contre, aucune association n'a été mise en évidence entre les miARN circulants et l'hypertension chez des patients avec MCV telles que des patients avec syndrome coronarien aiguë ⁷⁴, avec dysfonction diastolique ¹⁰, chez des NSTEMI ⁷⁵ ou des ICC ⁷⁵.

- Le diabète

Le diabète de type II (diabetes mellitus) est associé avec une augmentation de 2 à 3 fois du risque de développement de MCV ¹⁷. Certaines études ont identifié des miARN circulants associés au diabète dans une population saine ^{73, 76-78}. Concernant les patients ayant des MCV, le taux de miR-1 circulant était associé au diabète chez des patients avec syndrome coronarien aigu, mais seulement en analyses univariées ⁷⁴. Aucune association n'a été mise en évidence entre les miARN circulants et le diabète chez des patients atteints de cardiopathies coronariennes ⁷⁹, chez des NSTEMI ⁷⁵ et des ICC ⁷⁵.

- L'hyperlipidémie

Pratiquement 1/3 des MCV ischémiques sont dues au moins en partie à un haut taux de cholestérol¹⁷. Certaines études ont été effectuées dans une population saine, mettant en évidence des associations entre certains miARN circulants et l'hyperlipidémie⁷³. Une étude intéressante effectuée chez 255 patients avec hyperlipidémie (avec ou sans cardiopathie coronarienne) et 100 contrôles a mis en évidence une surexpression des miR-122 et miR-370 chez les patients hyperlipidémiques, qui sont associés avec le taux de cholestérol, de triglycérides et de LDL (low density lipoprotein)-cholestérol, mais également avec la présence et la sévérité d'une cardiopathie coronarienne chez des patients hyperlipidémiques⁸⁰. Le miR-155 était associé avec le taux de cholestérol, LDL et HDL et le miR-208a avec le taux de HDL chez des patients avec cardiopathie coronarienne⁷⁹. Le miR-126 était corrélé avec le taux de LDL-cholestérol chez des patients atteints de cardiopathie coronarienne⁸¹.

- Le manque d'exercice

Une activité physique inférieure à 5 fois 30 minutes d'activité modérée par semaine ou 3 fois 20 minutes d'activité soutenue par semaine est considéré comme une inactivité physique, qui est un important risque de MCV¹⁷. Plusieurs publications récentes suggèrent que l'activité physique modulerait le taux de miARN circulants et que cela refléterait la santé CV des individus⁸²⁻⁸⁴ mais aucune n'a été effectuée chez des patients atteints de MCV.

- L'obésité

L'obésité, caractérisée par un IMC (indice de masse corporelle) supérieur à 30kg/m², est un facteur de risque CV hautement associé à d'autres facteurs de risque CV tels que l'hyperlipidémie, le diabète, et l'inactivité physique. Peu de données existent sur un lien entre les miARN et l'obésité. Seule une étude a montré que les miR-97/-23a/-509-5p étaient surexprimés chez des patients avec syndrome métabolique et hypercholestérolémie, et qu'ils étaient associés avec l'IMC⁷³.

- Le tabac

Il y a actuellement plusieurs dizaines de millions de fumeurs dans le monde¹⁷. Récemment, une seule publication a rapporté les effets de la cigarette sur les profils de miARN circulants chez 11 fumeurs et 7 non-fumeurs⁸⁵, dans laquelle 43 miARN étaient surexprimés chez les fumeurs, et parmi eux, 24 miARN précédemment décrits comme potentiels biomarqueurs de

maladies. Chez des patients atteints de cardiopathies coronariennes, l'abus de tabac était associé avec le taux circulant de miR-1 et de miR-133 en analyses univariées, et avec le miR-208b en analyses multivariées ⁷⁴.

- L'âge

Il semble évident qu'un âge avancé entraîne un plus haut risque de développement de MCV. Plusieurs études ont mis en évidence des associations entre des miARN circulants et l'âge chez des patients sains comme le miR-126 ⁸⁶. Chez des patients atteints de MCV, le miR-155 était inversement corrélé avec l'âge chez 36 patients avec maladie coronaire et 17 contrôles, cette association ayant été validée dans une seconde cohorte de 31 patients avec maladie coronaire et 14 contrôles ⁷⁹. Une autre étude a mis en évidence une association entre le miR-133a et miR-208b et l'âge en analyses multivariées chez des patients avec syndrome coronarien aiguë ⁷⁴.

- Le genre

Tout comme pour l'âge avancé, il est évident pour tout le monde que les hommes ont un plus grand risque de développer des MCV que les femmes. Plusieurs études ont étudié le lien entre les miARN circulants et le genre: dans un petit groupe de volontaires sains, les miARN circulants miR-548-3p/-940/-1292/-1323 étaient surexprimés chez les femmes ⁸⁷. Chez des patients avec syndrome coronarien, le miR-499 était surexprimé chez les hommes ⁷⁴ et le miR-155 chez les femmes ⁷⁹.

- Les miARN comme facteurs de risque CV

L'association entre les miARN circulants et un futur IM a été étudié dans l'étude Bruneck, une cohorte prospective de 820 participants ⁸⁸. Dans cette cohorte, 47 patients ont eu un IM durant les 10 ans de suivi. Parmi les 19 miARN étudiés, le miR-126 était positivement associé avec un futur IM, alors que le miR-223 et miR-197 montraient une relation inverse avec un futur IM. Le miR-223 montrait une forte association avec un IM fatal comparé à un IM non-fatal, et les miR-126 et miR-197 étaient associés à des événements précoces. L'association entre ces miARN et un futur IM était plus forte que la CRP ou d'autres facteurs de risque. Cette étude suggère que les miARN circulants pourraient être utiles en tant que facteurs de risque CV.

Les miARN circulants semblent donc être affectés par de multiples facteurs de risque CV, même si peu d'études ont recherché ces associations. La figure 7 résume les associations trouvées entre les facteurs de risque CV et les miARN circulants chez des patients atteints de MCV, mais également chez des contrôles.

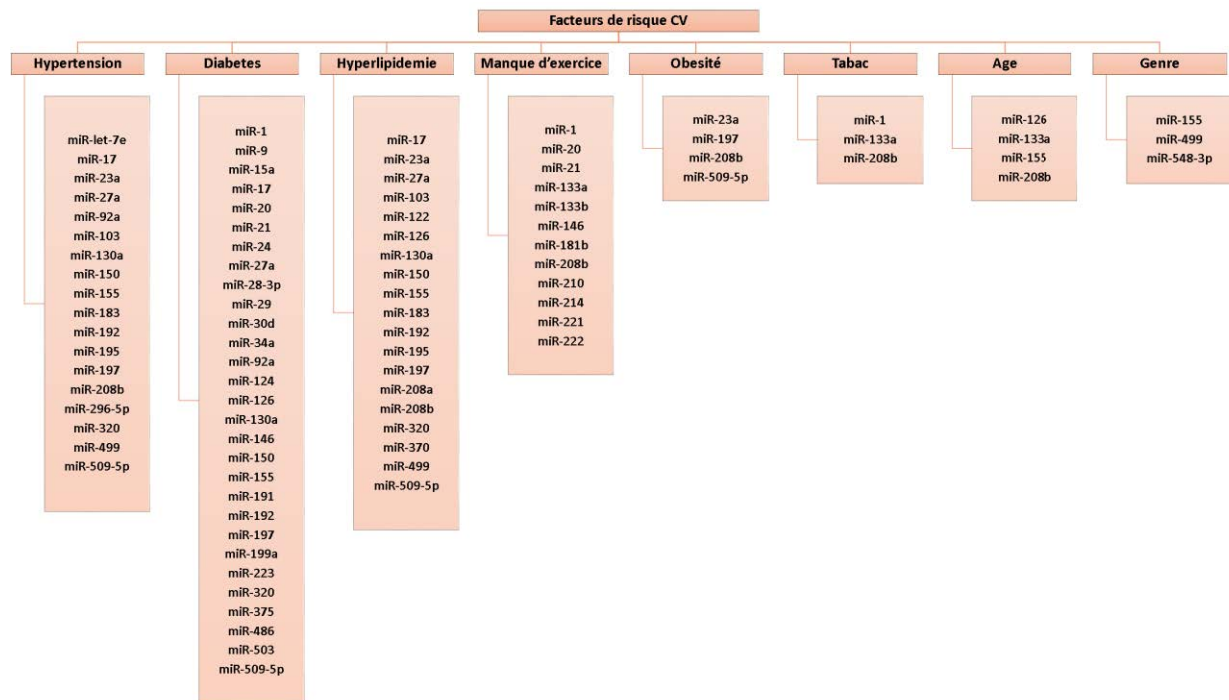


Figure 7: Liste de miARN identifiés pour leur association avec un facteur de risque CV.

3.2. Biomarqueurs lors de douleurs thoraciques

Peu d'études se sont intéressées au pouvoir diagnostique des miARN circulants pour la douleur thoracique. Généralement, la plupart des études ont pour but de cibler une MCV particulière, et utilisent des cohortes de plus ou moins grandes tailles, avec des patients atteints de cette MCV. Cependant, ces situations ne reflètent pas la situation clinique de ces patients qui arrivent aux urgences avec une douleur thoracique. Il n'y a que peu d'études cherchant à évaluer la capacité des miARN à diagnostiquer des MCV sur une population de patients se présentant aux urgences avec suspicion de MCV.

Une publication de Oerlemans et coll. a mesuré les taux de miR-1/-21/-146a/-208a/-499 chez 332 patients se présentant aux urgences avec suspicion de MCV⁸⁹. Les 5 miARN étaient augmentés dans les 106 patients diagnostiqués avec MCV, et une combinaison de miR-1/-21/-499 a permis d'augmenter la valeur diagnostique de la hs-cTnT. Une autre publication a

évalué la valeur diagnostique des miARN enrichis dans le cœur miR-1/-208b/-499-5p chez 424 patients avec suspicion de MCV ⁹⁰. Cependant, dans cette publication, les auteurs ne sont intéressés qu'à l'IM, identifiant les miR-208b et 499-5p surexprimés chez les patients avec IM comparés à ceux sans IM (contenant les patients avec douleur thoracique, mais également avec d'autres MCV). Ces 2 miARN étaient corrélés avec le taux de cTnT, même après ajustement à de multiples paramètres cliniques. Le miR-208b avait la plus haute valeur diagnostique, suivi du miR-499 et du miR-1. Cependant, aucun de ces miARN ne dépassait la capacité diagnostique des cTnT. A part ces publications, il n'y a actuellement aucune étude ayant été menée pour vraiment refléter la situation des patients avec douleur thoracique se présentant aux urgences.

Au niveau pronostique il n'y a également rien de connu sur la valeur des miARN circulants chez des patients ayant une douleur thoracique.

C'est pour cela que nous nous sommes proposés d'étudier la valeur diagnostique mais également pronostique des miARN circulants dans une cohorte de 1155 patients arrivés aux urgences pour une douleur thoracique: la cohorte APACE.

Un autre point est important concerne les patients en insuffisance rénale terminale traités par hémodialyse. Il s'avère que ces patients ont souvent des taux de cTnT positifs et qu'il est encore plus difficile d'émettre un diagnostic de MCV chez ces patients arrivant aux urgences avec une douleur à la poitrine. Ces patients sont souvent éliminés des banques de patients atteints de MCV utilisées pour l'étude des miARN circulants. En effet, il est connu que les cTnT ne sont pas éliminées après dialyses ²⁸. Concernant l'utilisation des miARN circulants comme biomarqueurs diagnostiques et/ou pronostiques, il a été montré récemment que les taux de certains miARN circulants ne semblent pas affectés par l'hémodialyse chez des patients en insuffisance rénale de stade terminale, comme les miR-155 et miR-126 ⁹¹, le miR-15b ⁹² ou encore les miR-21 et miR-210 ⁹³.

Cependant aucune étude n'a cherché à mettre en évidence l'utilisation des miARN circulants pour diagnostiquer les MCV chez ses patients.

Nous avons donc cherché à évaluer l'utilisation des miARN circulants dans une cohorte de patients en insuffisance rénale terminale: la cohorte MINOS.

3.3. Biomarqueurs de l'IM

Beaucoup d'études ont été menées pour évaluer la valeur diagnostique des miARN circulants lors de l'IM, et un peu moins leur valeur pronostique. L'IM reste la MCV dans laquelle les miARN circulants ont été le plus étudiés.

3.3.1. Potentiel diagnostique

Les premières études cherchant à évaluer la valeur diagnostique des miARN circulants ont été menées sur animaux et ont démontré que l'expression des miARN est régulée de façon très dynamique et rapidement après IM dans le cœur⁹⁴⁻⁹⁷. Une publication récente a montré que les taux des miARN miR-1 et miR-133, enrichis dans les muscles, sont augmentés dès 15 minutes après ablation transcoronaire de l'hypertrophie septale, et restent élevés durant 4 heures⁹⁸. Ces observations suggèrent que les miARN circulants peuvent être un indicateur précoce des dommages myocardiques.

Après les études chez l'animal, de multiples études à petite échelle chez l'humain ont apporté des résultats très encourageants suggérant que les miARN pourraient être une nouvelle classe de biomarqueurs cardiaques. Au final, 4 miARN enrichis dans le cœur, ont été constamment trouvés augmentés après IM et corrélés avec le taux de biomarqueurs cardiaques dans la majorité des études: les miR-1^{99, 100} et le miR-133^{96, 100}, enrichis dans les muscles, et les miR-208⁹⁷ et miR-499^{10, 100, 101} connus comme des myomiRs puisqu'ils ciblent le gène de la β -MHC (beta myosin heavy chain)¹⁰². Il est important de préciser qu'aucune de ces études n'a pu démontrer de capacité diagnostique des miARN circulants supérieure aux cTn¹⁰³ pour l'IM. Cependant beaucoup de revues ont été publiées sur ce sujet^{70, 104, 105}.

Des études à plus grande échelle ont rapporté des résultats mitigés. Par exemple, Widera et coll. ont comparé les taux de miARN circulants des miR-1/-133a/-133b/-208a/-208b/-499 entre des patients avec angine de poitrine instable, STEMI, ou NSTEMI dans une cohorte de 444 patients avec cardiopathie coronarienne. Les patients STEMI et NSTEMI avaient plus de miR-1/-133a/-208b que les patients avec angine de poitrine. Cependant, les taux d'expression de ces miARN se chevauchaient beaucoup entre les 3 groupes. Les miR-1/-33a/-133b/-208b étaient associés avec les taux de hs-cTnT⁷⁴. Dans une étude mesurant la capacité diagnostique des miR-1/-208b/-499-5p circulants pour l'IM chez des patients arrivés aux

urgences avec une douleur thoracique ou MCV suspectée ⁹⁰, les miR-208b et miR-499-5p étaient supérieurs chez les patients avec IM comparés aux non-IM, avec une augmentation plus marquée chez les STEMI par rapport aux NSTEMI. Ces 2 miARN étaient corrélés avec le taux de cTnT, même après ajustement à de multiples paramètres cliniques. Ces corrélations étaient conservées dans le groupe de patients avec IM, mais étaient perdues dans le groupe de patients non-IM. Le miR-208b avait la plus haute valeur diagnostique, suivi du miR-499 et du miR-1. Cependant, encore une fois, aucun de ces miARN ne dépassait la capacité diagnostique des cTnT.

3.3.2. *Potentiel pronostique*

En comparaison avec les études menées sur la valeur diagnostique des miARN circulants pour l'IM, peu d'études ont été faites sur la valeur pronostique des miARN circulants après IM.

Après avoir identifié ces miARN comme potentiel biomarqueurs diagnostiques de l'IM, les miARN enrichis dans le cœur ont été les premiers à être étudiés pour le pronostic après IM. Dans l'étude de Widera et coll., chez des patients avec syndrome coronarien, les miR-133a et miR-208b étaient associés avec la mortalité à 6 mois ⁷⁴. Cependant cette association était perdue après ajustement avec la hs-cTnT. Dans l'étude de Eitel et coll., avec des patients STEMI, le miR-133a était corrélé avec des indicateurs pronostiques tels que la taille de l'IM, et le MSI (indicateur de sauvetage du myocarde), et les patients avec des taux de miR-133a supérieurs à la valeur médiane avaient un risque augmenté d'évènement CV ¹⁰⁶. Cependant, cette étude n'a pas cherché l'impact du miR-133a sur les valeurs prédictives de la hs-cTnT et du BNP. Chez des patients avec syndrome coronarien suspecté, les miR-208b et miR-499-5p étaient associés avec un risque élevé de mortalité ou de développement d'IC après 30 jours, mais ces associations étaient perdues après ajustement avec la cTnT ⁹⁰.

Sachant que les miARN enrichis dans le cœur ne semblent pas être cliniquement utiles par leur valeur pronostique, d'autres miARN furent étudiés pour leur potentielle valeur pronostique. Les miR-155 et miR-380* étaient augmentés chez des patients ayant subi une mort cardiaque dans l'année suivant l'IM aigu ¹⁰⁷. Cependant la valeur diagnostique de ces miARN dans cette étude n'est pas établie. Le profil temporel des miR-1/-2/-29a/-133a/-208 circulants après IM a été caractérisé et associé avec le remodelage du VG dans une petite cohorte de patients avec IM ¹⁰⁸. Des variations importantes des taux de miARN ont été observées entre 2 et 90 jours post-IM, suggérant que plusieurs mesures successives pourraient

être utiles pour le pronostic. Les taux circulants des miR-192/-194/-34a, associés à p53, mesuré à 18 jours après IM étaient augmentés chez les patients avec IM aigu qui ont développé de l'IC dans l'année suivant l'IM ¹⁰⁹. De plus, les miR-194 et miR-34 étaient corrélés avec la dimension télédiastolique du VG. L'augmentation des taux circulants de miR-328 et miR-134 chez 359 patients avec IM était associée avec un fort risque de mortalité ou de développement d'IC dans les 6 mois, avec des odds ratios (OR) ajustés de 7,35 pour le miR-328 et de 2,28 pour le miR-134 ¹¹⁰.

En utilisant une approche systémique avec des réseaux d'interactions de miARN-gènes au sein du laboratoire, plusieurs miARN ont été identifiés pour leur association avec le remodelage du VG après IM ¹¹¹. En particulier, 10 miARN ont été mis en évidence pour leur implication au sein des réseaux, c'est-à-dire ayant le plus grand nombre d'interactions avec des gènes connus pour réguler le remodelage du VG. L'association entre un de ces miARN, le miR-150 et le remodelage du VG a été validée dans 2 cohortes indépendantes de patients avec IM. Le miR-150 était capable de prédire la variation du volume télédiastolique entre la sortie de l'hôpital et le suivi à 4 mois, avec une valeur pronostique supérieure à celle de la Nt-pro-BNP. Un modèle incluant à la fois le miR-150 et la Nt-pro-BNP a eu une valeur prédictive encore plus importante. Des analyses de reclassification ont mis en évidence que le miR-150 pouvait reclassifier correctement la moitié des patients mal classés par la Nt-pro-BNP. Au laboratoire également, la valeur pronostique d'un panel de 4 miARN a été étudiée chez 150 patients avec IM avec un suivi de 6 mois post IM ¹¹². Le panel, composé des miR-16/-27a/-101/-150 a permis d'augmenter la valeur pronostique de la Nt-pro-BNP. Ces résultats indiquent que d'autres miARN que ceux enrichis dans le cœur peuvent avoir une valeur pronostique significative chez des patients après IM.

Au vu de cette bibliographie, nous avons donc cherché à caractériser le pouvoir diagnostique et/ou pronostique de certains miARN circulants dans une cohorte de 510 patients avec IM, contenant 397 STEMI et 113 NSTEMI: la cohorte LUCKY.

3.4. Biomarqueurs de l'ICA

Contrairement à l'IM, le potentiel diagnostique et pronostique des miARN après IC a été brièvement étudié dans la littérature. En effet, il s'agit principalement d'études à petite échelle, dans lesquelles sont mélangés les patients avec ICA et ICC ou dans lesquelles il n'est

pas précisé quels types de patients avec IC ont été sélectionnés. Au niveau du diagnostic, plusieurs études ont identifié des miARN circulants comme biomarqueurs de l'IC, tels que les miR-103/-142-3p/-30b/-342-3p chez des patients avec IC ¹¹³ ou encore les miR-423-5p/-320a/-22/-92b chez des patients avec ICC ¹¹⁴. Au niveau du pronostic, seuls 2 miARN circulants sont connus comme biomarqueurs pronostiques de l'IC congestif, le miR-126 ⁸⁶ et le miR-210 ¹¹⁵.

Lorsqu'il s'agit de l'ICA, le nombre de publication se réduit encore plus. Actuellement, seules 3 études ont mis en évidence un potentiel diagnostique des miARN circulants dans l'ICA:

- Les miR-122 et miR-499 ont été montrés surexprimés dans le plasma de 33 patients avec ICA comparés à 20 contrôles ¹⁰.

- Les miR-21/-133a/-423-5p/-499-5p ont également été trouvés surexprimés dans le plasma de 81 patients avec ICA, comparés à 99 contrôles, et plus particulièrement le miR-499-5p a démontré une bonne capacité diagnostique avec une AUC (area under the curve) de 0,88 supérieure à la cTnT (0,78) ⁷⁵.

- Les taux de miR-18b*/-129-5p/-423-5p/-622/-675/-1254 étaient augmentés dans le plasma de 12 patients avec ICA comparés à 12 contrôles, puis cela a été confirmé dans une seconde cohorte contenant 30 patients avec ICA et 39 contrôles. Seul le miR-423-5p a montré une capacité diagnostique très forte avec une AUC de 0,91 et était corrélé avec le taux de pro-BNP ¹¹⁶.

Concernant le potentiel pronostique des miARN circulants pour l'ICA, il n'y a actuellement aucune étude qui s'y est intéressée dans l'ICA.

Au vu de cette faible littérature sur les miARN circulants dans l'ICA, il est évident qu'il reste beaucoup à faire dans ce domaine, que ce soit au niveau du diagnostic, mais encore plus particulièrement au niveau du potentiel pronostique des miARN circulants chez ces patients où il n'existe rien à ce jour.

Nous avons donc cherché à étudier le potentiel diagnostique et également pronostique de certains miARN circulants dans une cohorte de 236 patients avec ICA: la cohorte LARIBOISIERE.

3.5. Biomarqueurs de l'AC

Ce n'est que très récemment, en 2014, qu'est sorti un papier étudiant le potentiel des miARN circulants en tant que biomarqueurs après AC. Le papier de Gilje et coll. inclut une cohorte de 65 patients ayant subi un AC et qui ont été traités par hypothermie ¹¹⁷. Les échantillons sanguins ont été récoltés 24 et 48 heures après admission. A 48 heures, les miR-146/-122/-208b/-21/-9/-128 n'étaient pas différentiellement exprimés entre les 35 patients à CPC 1-2 (à bon pronostic neurologique) et les 30 patients à CPC 3-5 (à mauvais pronostic neurologique). Seul le miR-124, connu pour être surexprimé dans le cerveau, était surexprimé dans le plasma de patients à mauvais pronostic comparés aux patients à bon pronostic à 24 et 48 heures après AC, avec une AUC diagnostique du mauvais pronostic neurologique de 0,87 à 24 heures et de 0,89 à 48 heures (légèrement inférieur à la NSE, avec des AUC de 0,8 à 24 heures et de 0,9 à 48 heures). Il n'y avait pas de valeurs additives du miR-124 à la NSE et celui-ci n'est corrélé que modérément à la NSE. Le miR-124 semble donc être un bon biomarqueur pronostique après AC, même si il ne devance pas la NSE.

Il faut souligner qu'au début de cette thèse, il n'y avait aucun article étudiant le potentiel des miARN circulants comme biomarqueurs après AC. Il s'agissait donc d'un domaine dans lesquels il pourrait être intéressant de mettre en évidence un lien entre le pronostic des patients après ressuscitation et le taux de miARN circulants.

C'est donc bien avant la publication du papier de Gilje et coll que nous avons voulu mettre en évidence un lien entre le taux de miARN circulants et le pronostic neurologique après AC dans une cohorte de 28 patients traités par hypothermie après AC: la cohorte NORTHPOLE.

Axe 2: Potentiel des miARN pour la réparation cardiaque post infarctus

1. La réparation cardiaque post-IM

1.1. Généralités sur l'IM

L'IM se caractérise par une nécrose d'une partie du myocarde, généralement le VG, suite à un défaut d'oxygénation du cœur par thrombose d'une artère coronaire (figure 8).

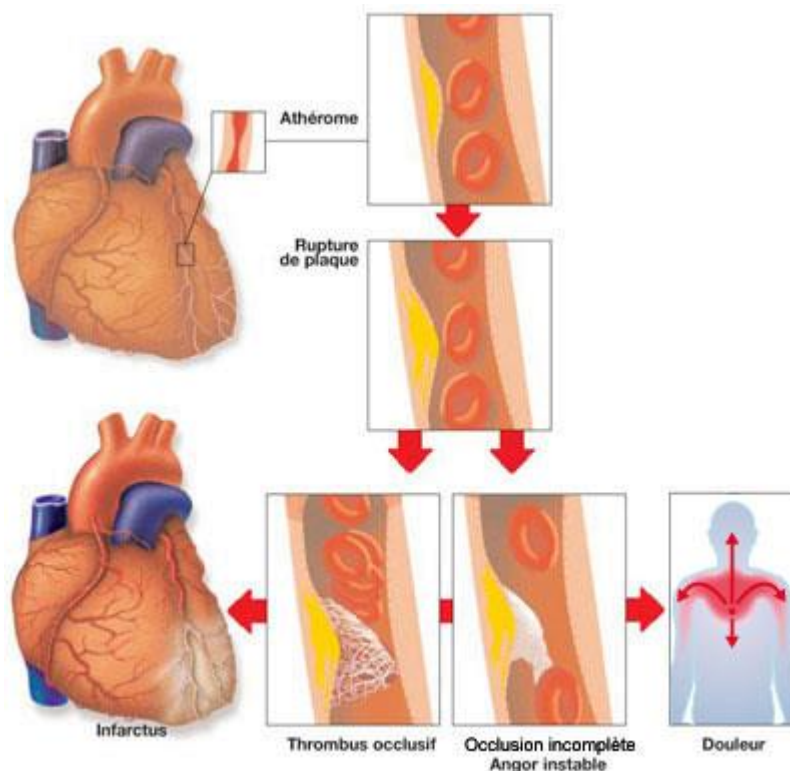


Figure 8: L'infarctus du myocarde

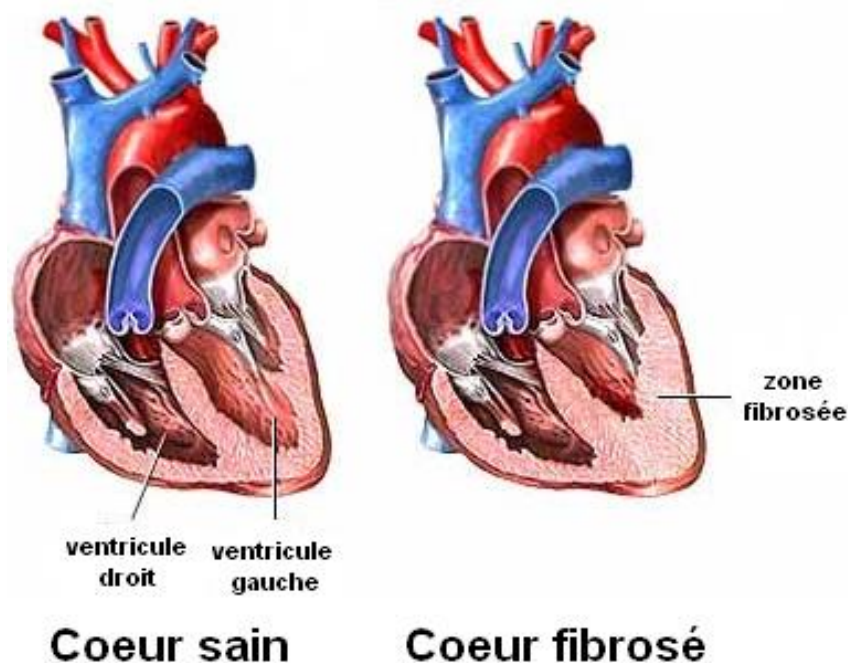
(figure issue de: <http://bilingue.iesvegadelturia.es/infarct.htm>)

Une plaque d'athérome se forme et se rompt au sein d'une artère coronaire: cela provoque l'IM, par occlusion complète de l'artère coronaire (Si l'occlusion est partielle, on parle d'angor instable).

Dans plus de 90% des cas, cela démarre par le développement d'une plaque d'athérome au sein d'une artère coronaire entraînant une ischémie, c'est-à-dire une diminution du flux sanguin vers le cœur¹¹⁸. Cette pathologie, l'athérogenèse artérielle, est le principal facteur à l'origine de l'IM. Elle est provoquée par un déséquilibre du métabolisme lipidique entraînant une réponse inflammatoire inadaptée^{119, 120}. Cette plaque peut alors se rompre et va former

un thrombus dans l'artère, c'est-à-dire un caillot de sang formé de plaquettes qui s'agrègent . Lorsque l'obstruction est partielle on parle alors de sténose, c'est-à-dire d'une diminution du diamètre de l'artère qui peut être à l'origine d'un angor instable chez les patients. Mais lorsque l'obstruction est totale, l'ischémie devient alors irréversible et la partie du cœur irriguée par l'artère coronaire, généralement le VG, n'est plus irriguée. Les cardiomyocytes vont alors subir un fort stress cellulaire, par privation d'oxygène, de nutriments et par accumulation de déchets métaboliques au sein du cytoplasme, et vont progressivement mourir. Il faut compter quelques heures suite à la privation d'oxygène et de nutriments pour entrainer la mort d'un cardiomyocyte ¹²¹. L'ischémie prolongée va donc être à l'origine d'une zone nécrotique plus ou moins étendue au sein du tissu myocardique, c'est ce que l'on appelle la zone infarctée. Dans cette zone, les cardiomyocytes seront alors incapables de proliférer de façon significative et ne peuvent pas remplacer cette perte de cellules qui s'avère irrévocable ^{122, 123}. Le cœur va donc tout d'abord remplacer les tissus endommagés par un tissu cicatriciel composé majoritairement de fibroblastes.

Cette zone infarctée va entrainer une perte de contractilité du VG, le cœur ne sera plus capable de battre normalement, il va donc falloir des modification structurales importantes du VG, en particulier en se dilatant ¹²⁴. C'est ce que l'on appelle le remodelage ventriculaire (figure 9).



*Figure 9: Comparaison entre un cœur sain et un cœur fibrosé
(Image tirée du site internet <http://www.scf-fr.net/themes/scf/userfiles/image/scf/cmh/coeur4.jpg>).*

On distingue deux types de remodelage: adaptatif ou délétère. Lorsqu'on parle de remodelage adaptatif, il permet de restituer une fonction cardiaque « normale », équivalente à avant l'IM. Par contre, lorsqu'il est délétère, cela conduit au développement d'une IC car le cœur est incapable de compenser la perte contractile.

Au départ le remodelage ventriculaire correspond principalement à une réaction de stress du cœur face à une surcharge systolique/diastolique du myocarde excessive. La durée de ce stress va définir l'évolution du remodelage, l'apparition d'anomalies ou encore sa progression. Des facteurs environnementaux ou encore génétiques peuvent également influencer sa progression.

A partir de là, plusieurs mécanismes vont se mettre en place afin de pouvoir réparer le cœur face aux dégâts causés par l'IM. Ces mécanismes sont de plusieurs types: une modification structurelle va démarrer par l'hypertrophie des cardiomyocytes afin de compenser la perte contractile du cœur, ce qui va s'accompagner d'une augmentation du volume du cœur et un amincissement des parois du VG ¹²⁵, ou encore une modification constitutionnel de la matrice extracellulaire (MEC), un recrutement de cellules inflammatoires, et surtout une modification de la vascularisation, l'angiogenèse.

1.2. Mécanismes mis en jeu

1.2.1. Les 3 phases post-IM

Lors de la réparation cardiaque après IM, plusieurs phases vont s'enchaîner et faire intervenir différents mécanismes (figure 10).

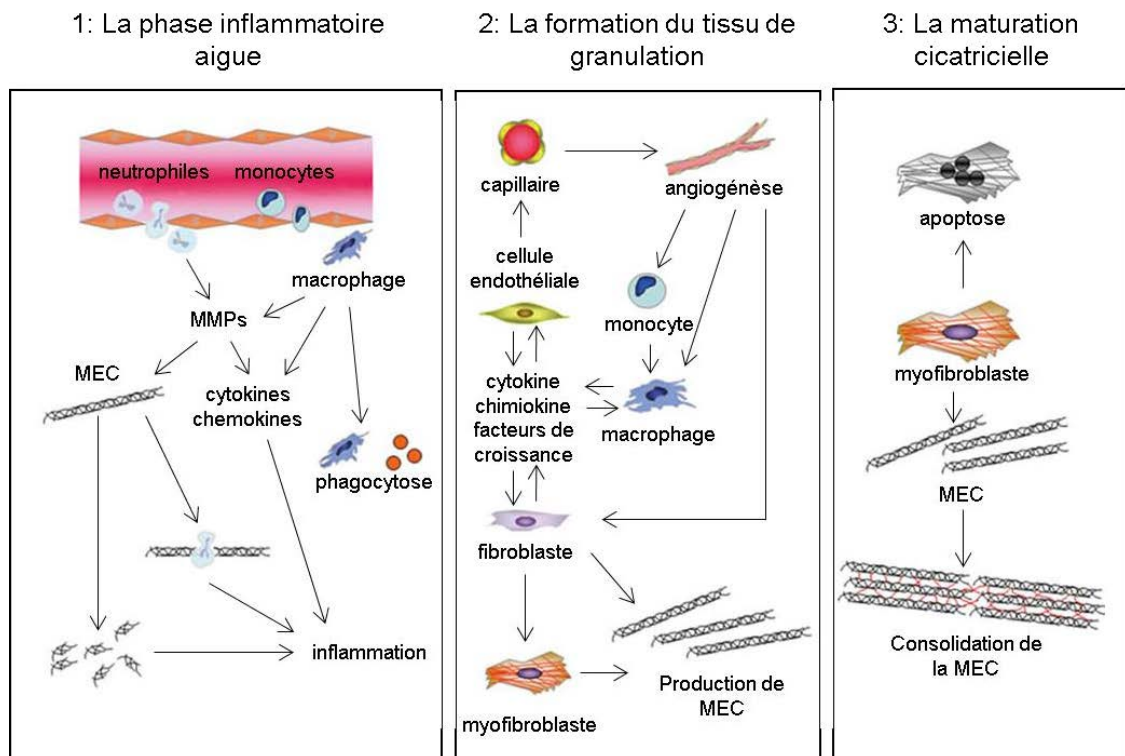


Figure 10: Les 3 phases du remodelage du VG post-IM

La première phase est la phase inflammatoire aiguë. Dans les 4 premiers jours suivant l'IM, une première vague de cellules, composée de neutrophiles et monocytes, est recrutée sur le site de l'inflammation, pour nettoyer les débris cellulaires¹²⁶. Ces cellules sont attirées sur le site par un gradient de chimiokines (cytokines chimioattractantes) qui sont synthétisées par les leucocytes, les cellules endothéliales et les cardiomyocytes de la zone infarctée. Plusieurs chimiokines pro-inflammatoires interviennent dans ce recrutement telles que IL-17 (interleukine-17), TNF α (tumor necrosis factor α) et CXCL1/CXCR2^{127, 128}. Une fois sur place, les monocytes vont se différencier en macrophages puis vont phagocyter les cellules mortes et dégrader en partie la MEC, en relarguant des MMP (matrix metalloproteinases) comme la gélatinase MMP-9¹²⁹. Ces MMP sont également synthétisées par d'autres cellules telles que les neutrophiles, les fibroblastes, les myocytes et les cellules endothéliales. Le maintien et la dégradation de la MEC est un phénomène important afin de récupérer des conditions physiologiques normales lors du remodelage. Un déséquilibre peut mener soit à une rigidité cardiaque (fibrose massive due à une synthèse excessive) ou à une relaxation trop abondante (menant à l'hypertrophie après dégradation excessive).

Ces MMP vont donc creuser la MEC pour permettre aux cellules inflammatoires de pouvoir s'infiltrer et pour faciliter la néovascularisation, à l'aide également de la sécrétion par les neutrophiles/macrophages de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF (vascular

endothelial growth factor) ou le TNF- α ¹³⁰ qui est également pro-inflammatoire. Ces cellules libèrent également des facteurs de croissance pour attirer et activer d'autres cellules pro-inflammatoires.

Tout cela s'accompagne d'une dysfonction endothéliale, avec une augmentation de la perméabilité et des molécules d'adhésion permettant le recrutement des leucocytes.

La seconde phase est la formation du tissu de granulation ou cicatrice immature. La transition entre ces deux phases est décisive car le cœur, nettoyé des cardiomyocytes nécrosés et des débris de la MEC, est sans nouvelle structure de support. Il faut d'abord arrêter la phase inflammatoire pour éviter d'endommager le cœur et permettre une réparation optimale, grâce à des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10.

Dans cet environnement riche en cytokines et facteurs de croissance, les macrophages vont donc synthétiser également du VEGF et TGF β -1 (transforming growth factor β -1), responsables de la néovascularisation: l'angiogenèse. Des cellules endothéliales vont également intervenir en migrant et en proliférant au niveau de cette zone pour participer à l'angiogenèse.

Les cardiomyocytes nécrosés vont progressivement être phagocytés puis être remplacés par des fibroblastes qui vont se différencier en myofibroblastes grâce à des facteurs de différenciation comme le TGF β . Ces cellules vont proliférer et synthétiser des collagènes 1 et 3 qui vont permettre la cicatrisation du myocarde grâce à une fibrose de remplacement du tissu myocardique endommagé, et également de l' α -SMA (α -smooth muscle actin) pour contracter et diminuer la zone infarctée. A partir de là, les cellules vont se retirer de la zone infarctée (sauf les myofibroblastes) et les cardiomyocytes vont commencer à s'hypertrophier, afin de maintenir la contractilité du myocarde¹³¹.

D'autres cellules interviennent également dans la réparation cardiaque comme les lymphocytes mais cela ne sera pas détaillé ici.

Finalement, une longue phase de maturation cicatricielle ou remodelage tardif se met en place deux à trois semaines après IM, et peut durer sur plusieurs années.

Les myofibroblastes vont permettre une fibrose cicatricielle, au niveau de la zone nécrosée ce qui est bénéfique, mais également au niveau de la zone saine, ce qui rend le myocarde rigide et perturbe sa contractilité. Ces cellules vont majoritairement entrer en apoptose et disparaître. Ce remodelage peut donc permettre de restaurer la fonction cardiaque mais peut également mener au développement de l'IC.

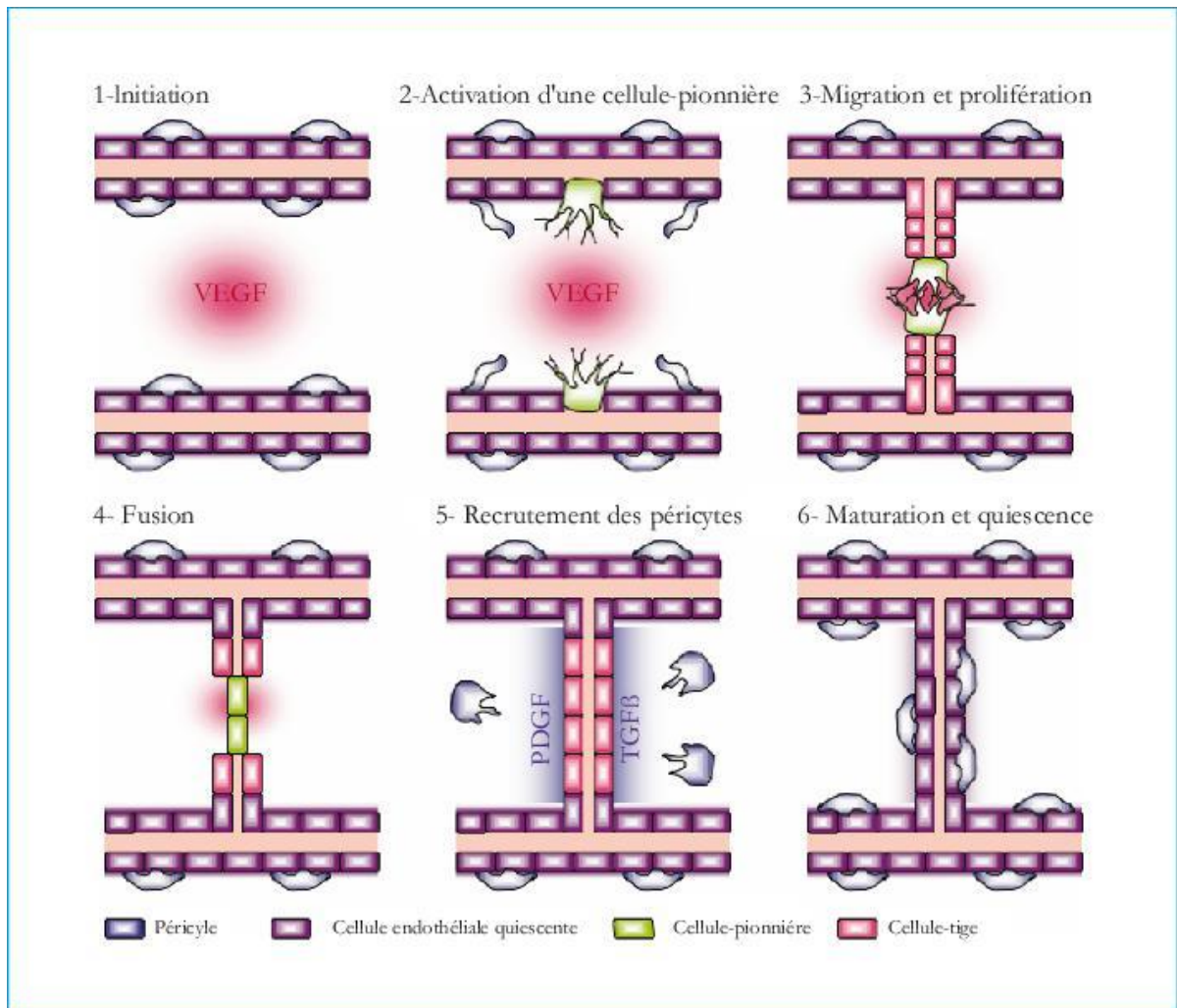
1.2.2. L'angiogenèse

Dans ce manuscrit, nous allons développer en particulier ce mécanisme très important dans la réparation cardiaque post-IM: l'angiogenèse.

En effet, l'apport en sang est très important pour la survie et la fonction du cœur, c'est pour cela que l'angiogenèse est considérée comme une cible thérapeutique primordiale¹³². Une thérapie pro-angiogénique permettrait de favoriser la reperfusion et la fonction du cœur ischémique. Cependant, les études précliniques actuelles n'ont pas eu les résultats attendus, c'est pourquoi il est important de comprendre ce mécanisme.

Le remodelage post-IM entraîne donc une modification de la vascularisation, c'est le phénomène d'angiogenèse. Il s'agit de la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. C'est un processus biologique très important, intervenant dans différents processus pathologiques tels que la croissance des tumeurs, mais également les maladies inflammatoires ou MCV¹³³.

L'angiogenèse se caractérise par un phénomène appelé le « sprouting »: il s'agit de l'activation des cellules endothéliales quiescentes dans un vaisseau existant lorsqu'elles sont exposées à des signaux angiogéniques, comme de l'hypoxie ou des facteurs de croissance (VEGF). Les jonctions entre les cellules endothéliales se relâchent et les cellules murales (péricytes, cellules musculaires lisses) se détachent du mur vasculaire ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire. Cela s'accompagne d'une dégradation de la membrane basale et de la MEC environnante dans laquelle une cellule pionnière va migrer de façon orientée vers le site où l'angiogenèse est nécessaire, grâce à des chimiokines libérées par les fibroblastes ou monocytes par exemple. Lorsque 2 cellules pionnières se rencontrent, elles forment une jonction, qui correspond à la « pousse » microvasculaire. Les cellules endothéliales sécrètent alors des facteurs de maturation comme le TGF β ou le PDGF (platelet derived growth factor) qui recrutent des progéniteurs mésenchymateux et induisent leur différenciation en péricytes et qui stimulent également la synthèse d'une MEC. A la fin, une structure capillaire avec lumière est formée et les cellules murales sont recrutées pour la stabilité du vaisseau. Ce mécanisme est résumé dans la figure suivante:



*Figure 11: Les différentes étapes de l'angiogenèse
(Figure issue de Feige et coll.¹³⁴).*

L'angiogenèse physiologique se décompose en deux phases: une phase d'activation (étapes 1-4) et une phase de maturation (étapes 5 et 6). Le processus est initié par un gradient de VEGF (1) qui conduit au détachement des péricytes et à la sélection d'une cellule pionnière (2), qui migre ensuite en direction de la source de VEGF en émettant des filopodes (3). Les cellules tiges qui suivent la cellule pionnière se divisent mais ne forment pas de filopodes (3). Lorsque deux cellules pionnières se rencontrent, elles forment alors une jonction qui conduit à un nouveau vaisseau (4). Les cellules endothéliales sécrètent alors des facteurs de maturation (PDGF-B, TGFβ) qui recrutent des progéniteurs mésenchymateux, induisent leur différenciation en péricytes et stimulent la synthèse d'une MEC autour du néovaisseau (5). Une fois couvert par des péricytes, le néovaisseau est stabilisé et entre en quiescence (6).

Il ne faut pas le confondre avec la vasculogenèse qui se déroule durant l'embryogenèse, ni avec l'artériogenèse, qui correspond au remodelage des vaisseaux collatéraux existants: ceux-ci vont croître et proliférer car ils sont recrutés pour contourner le site de l'occlusion et rétablir le flux sanguin ¹³⁵.

Au niveau des mécanismes moléculaires de l'angiogenèse, ils sont multiples, complexes et surtout ils impliquent des signaux extra et intracellulaires ¹³⁶. L'angiogenèse est régulée par des inducteurs et des inhibiteurs produits par les cellules (en particulier les monocytes): on retrouve donc en inducteurs clés les VEGF et leurs récepteurs ¹³⁷, mais également du FGF (facteur de croissance fibroblastique) et leurs récepteurs ¹³⁸. Ces deux inducteurs régulent entre autre la dégradation de la membrane basale, la prolifération des cellules endothéliales ainsi que le recrutement et l'adhésion des leucocytes.

D'autres molécules sont impliquées comme les angiopoïétines, Tie-1, Tie-2, les MMP et leurs inhibiteurs, ainsi que les activateurs du plasminogène. Les MMP par exemple sont très importantes dans l'invasion de la MEC et la formation de la lumière du vaisseau.

En inhibiteurs on retrouve par exemple les thrombospondines, l'angiostatine, l'endostatine, et le facteur plaquettaire-4. Les intégrines jouent également un rôle très important en contrôlant l'adhésion et la migration des cellules endothéliales grâce aux interactions avec la MEC ¹³⁹.

Le monoxyde d'azote participe également à plusieurs processus de l'angiogenèse comme lors d'un IM, dans l'activation du VEGF.

C'est pour cela qu'une thérapie cellulaire à partir de cellules souches pourrait permettre de restaurer une fonctionnalité à la zone infarctée et de régénérer le cœur, un des organes le moins régénératif du corps. De nombreuses études ont été effectuées chez l'animal, pour une réparation cardiaque basée sur l'injection de facteurs de croissance mais également basée sur une thérapie cellulaire utilisant des cellules souches pluripotentes induites ou des cellules souche mésenchymateuses, ou progénitrices cardiaques, en agissant également sur leur recrutement ou leur attachement au tissu lésé ¹³².

Cependant, l'efficacité thérapeutique de la thérapie cellulaire est encore controversée avec des résultats peu satisfaisants, d'où la nécessité d'optimiser ces thérapies pour permettre surtout une meilleure greffe de ces cellules dans la zone infarctée. Il est à noter également que le phénotype de ces cellules souches mésenchymateuse n'est pas clairement défini et que l'existence de sous populations peut influencer les résultats de la thérapie cellulaire ¹⁴⁰.

Il semble donc important d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin de pouvoir réduire au maximum les dégâts causés par l'IM mais également l'incidence du développement de l'IC après IM et ainsi de restaurer l'intégrité du cœur.

2. Les Cellules Endothéliales Progénitrices

2.1. Leur découverte et leurs propriétés

Les cellules endothéliales progénitrices ou EPC ont été découvertes en 1997 par Asahara et coll.¹². Ces cellules ont la particularité de posséder à la fois des propriétés des cellules endothéliales et de cellules progénitrices. Elles ont été initialement distinguées des autres types cellulaires par leur capacité à lier les lectines et d'intégrer les LDL acétylés par leurs récepteurs de surface mais également par l'expression en surface de marqueurs de cellules progénitrices CD (cluster de différenciation) 133 et CD34 et de marqueurs de cellules endothéliales VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2). Les EPC sont principalement isolées à partir de sang périphérique¹⁴¹ (comme lors de leur découverte), et plus rarement de sang de cordon ombilical^{142, 143}.

Les EPC ont fait l'objet de nombreuses études in vitro et in vivo, cependant leur caractérisation phénotypique et leurs propriétés fonctionnelles font toujours débat^{73, 74}. En effet, la controverse provient de leur faible quantité dans le sang périphérique et de la multiplicité de technique d'isolation et de culture de ces cellules. En fonction de ces méthodes, différentes populations cellulaires peuvent être obtenues, caractérisées par différents marqueurs de surface, des capacités angiogéniques et de prolifération différentes^{144, 145}.

Néanmoins, une majorité de scientifiques se sont accordés sur le fait que 2 populations distinctes peuvent être isolées, distinctes à la fois par leur phénotype et par leur capacités angiogéniques: les EPC précoces et tardives¹⁴⁶ (figure 12).

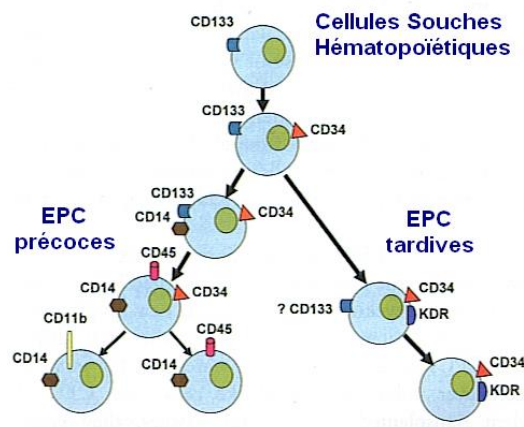


Figure 12: Caractéristiques phénotypiques des EPC précoces et tardives (figure d'après Shantsila et coll. ¹⁴⁴).

Les EPC précoces sont caractérisées par leur capacité à sécréter des facteurs pro-angiogéniques ¹⁴⁷ et par leur faible capacité à proliférer. De plus, même si elles sont incapables de former un réseau microtubulaire in vitro (sur Matrigel), elles sont capables de s'intégrer à un réseau de cellules endothéliales. Les EPC précoces correspondent à une population hétérogène de cellules, mais avec des marqueurs de surface spécifiques: des marqueurs de cellules progénitrices comme le CD34, CD133, le marqueur panleucocytaire CD45, les marqueurs endothéliaux CD31 et vWF (facteur de Von Willebrand), et le marqueur myélocytaire CD14 ¹⁴⁶. Ces cellules sont considérées comme proches de la population leucocytaire. Les EPC précoces possèdent plusieurs noms: selon différentes études, et avec quelques différences dans le phénotype, les EPC précoces sont également nommées cellules angiogéniques circulantes, EPC monocytiques, ou encore cellules angiogéniques progénitrices.

Les EPC tardives correspondent à une population beaucoup plus homogène morphologiquement, et sont caractérisées par des marqueurs de surface comme les marqueurs de cellules progénitrices CD34 et CD113 et de cellules endothéliales CD31, CD141, CD105, CD146, CD144, vWF et flk-1. Elles diffèrent des EPC précoces par leur faible capacité à sécréter des cytokines, mais également par leur capacité à proliférer et à former spontanément des réseaux de microtubules en culture sur Matrigel ^{142, 146}. Les EPC tardives ressemblent beaucoup plus à des cellules endothéliales que les EPC précoces.

Les EPC précoces et tardives participent à la stimulation de la néovascularisation de façon fonctionnellement complémentaire^{139, 146}. C'est pour cela que l'utilisation simultanée de ces 2 types cellulaires semble plus efficace qu'un type cellulaire seul: les EPC précoces sécrètent des cytokines qui potentialisent la capacité des EPC tardives à former des microtubules. Il est important de préciser que les EPC ont une forte activité d'aldéhyde déshydrogénase (ALDH), ce qui peut servir à facilement mettre en évidence la présence d'EPC dans des échantillons biologiques¹⁴⁸.

2.2. Les EPC dans l'IM

Les EPC sont mobilisées après IM de la moelle osseuse au site de l'ischémie, où elles participent à la cicatrisation du tissu ischémique en augmentant la revascularisation de la zone péri-infarctie¹⁵.

Dans le cœur, les EPC permettent de réparer le cœur infarcté en augmentant l'apport de sang^{81, 82}. La première étude clinique, TOPCARE-AMI (transplantation of progenitors cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction) qui a transplanté des cellules progénitrices après IM a montré des résultats prometteurs¹⁴⁹. Une méta-analyse de 37 études cliniques a démontré qu'une transplantation autologue de cellules dérivées de moelle osseuse est réalisable, de façon relativement sûre, et est potentiellement efficace pour des patients atteints d'ischémie des membres inférieurs¹⁵⁰. Une transplantation de cellules ALDH2 positives, isolées de moelle osseuse, permettrait de revasculariser une ischémie des membres inférieurs¹⁵¹. Une étude a rapporté que des progéniteurs de cordon ombilical avec une forte activité ALDH2 après IM permettraient d'augmenter la densité vasculaire¹⁵². Cependant, certains essais cliniques n'ont montré que des effets modestes d'une thérapie avec des EPC, en ne restaurant qu'en partie la fonction cardiaque. Cela s'explique par la faible nombre de cellules recrutées jusqu'au site de l'ischémie¹⁴, et par la difficulté de choisir les cellules adéquates. De ce fait, différentes stratégies sont actuellement testées afin d'augmenter le nombre de cellules recrutées, leur adhésion au tissu et la fonction des EPC¹⁵³.

Tout d'abord, la migration et le recrutement des EPC au cœur infarcté sont stimulés par le couple ligand-récepteur composé du SDF-1 α (stromal cell-derived factor 1 α) et de son récepteur le CXCR4 (chemokine (C-X-C motif) receptor 4)^{154, 155}. Le SDF-1 α est produit après IM dans la zone infarctée, à la surface de l'endothélium vasculaire, et peut interagir avec

des molécules d'adhésion présentes à la surface des EPC circulantes, de cette manière il permet d'initier leur recrutement et leur migration dans le tissu cardiaque ¹⁵⁶. Une des stratégies pour augmenter les capacités réparatrices serait d'augmenter le recrutement des EPC jusqu'au site ischémique en amplifiant l'expression du CXCR4. En effet, il a été démontré qu'une augmentation du CXCR4 à la surface des EPC peut améliorer la migration des EPC ¹⁵⁷. De plus, une baisse de l'expression du CXCR4 peut diminuer les capacités régénératrices des EPC au cœur chez des patients avec cardiopathie coronarienne ¹⁵⁸. Une autre étude a démontré que des cellules endothéliales capables de former des colonies, surexprimant le CXCR4, ont augmenté significativement la réparation tissulaire et la densité capillaire dans un modèle d'ischémie des membres inférieurs ¹⁵⁹. En plus de l'axe SDF-1 α /CXCR4, notre laboratoire a montré que lier le MCP-3 (monocyte chemoattractant protein) à la chimiokine CCR1 permet également de stimuler la migration des EPC ¹⁶⁰. Cette étude a identifié le MCP-3 comme une cible thérapeutique potentielle pour améliorer les capacités fonctionnelles des EPC.

Une autre stratégie serait de modifier les EPC génétiquement ¹⁶¹. Si cela est fait avant transplantation chez des patients, cette modification pourrait permettre d'augmenter leur mobilisation au site ischémique.

Une autre stratégie serait d'intervenir en prévention des MCV. En effet, les EPC semblent être un indicateur de la fonction vasculaire et du risque CV, et un taux anormalement élevé d'EPC a été mis en évidence chez des patients avec ICC ¹⁶².

En plus de leur rôle fonctionnel dans la réparation cardiaque, les EPC ont été considérées comme potentiels biomarqueurs chez des patients avec IC, bien qu'il ait été prouvé que le taux circulant d'EPC est influencé par différents facteurs comme les médicaments, la sévérité de la maladie et les facteurs de risque CV ¹⁶³. Par exemple, il a été montré que les statines augmentent le taux d'EPC circulantes chez des patients avec cardiopathie coronarienne stable ¹⁶⁴.

Une meilleure connaissance de la biologie des EPC permettrait d'améliorer la thérapie cellulaire.

2.3. Effets de l'adénosine sur les EPC

L'adénosine (9- β -D-ribofuranosyl-6-aminopurine) est un nucléoside ubiquitaire à base purique, synthétisé par catabolisme de l'ATP (adénosine tri phosphate) lorsqu'il y a un déséquilibre entre l'apport en oxygène et le besoin en oxygène, ce qui est le cas par exemple lors d'un IM ou d'une ICC (figure 13). Elle a une demi-vie très courte, de l'ordre de quelques secondes.

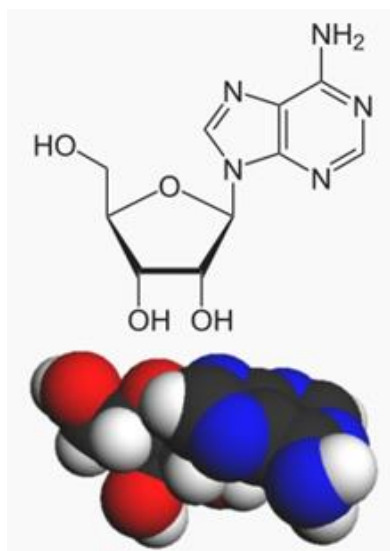


Figure 13: Structure chimique et représentation tridimensionnelle de l'adénosine.

Présente dans tout l'organisme, et plus particulièrement dans le cœur, elle peut être synthétisée par 2 voies: elle est produite à partir de l'hydrolyse de la S-adénylhomocystéine par la SAH hydrolase en conditions physiologiques normales^{165, 166}, mais en conditions ischémiques/inflammatoires, elle est issue de la déphosphorylation de l'AMP (adénosine monophosphate) par la 5' nucléotidase^{167, 168} (figure 14).

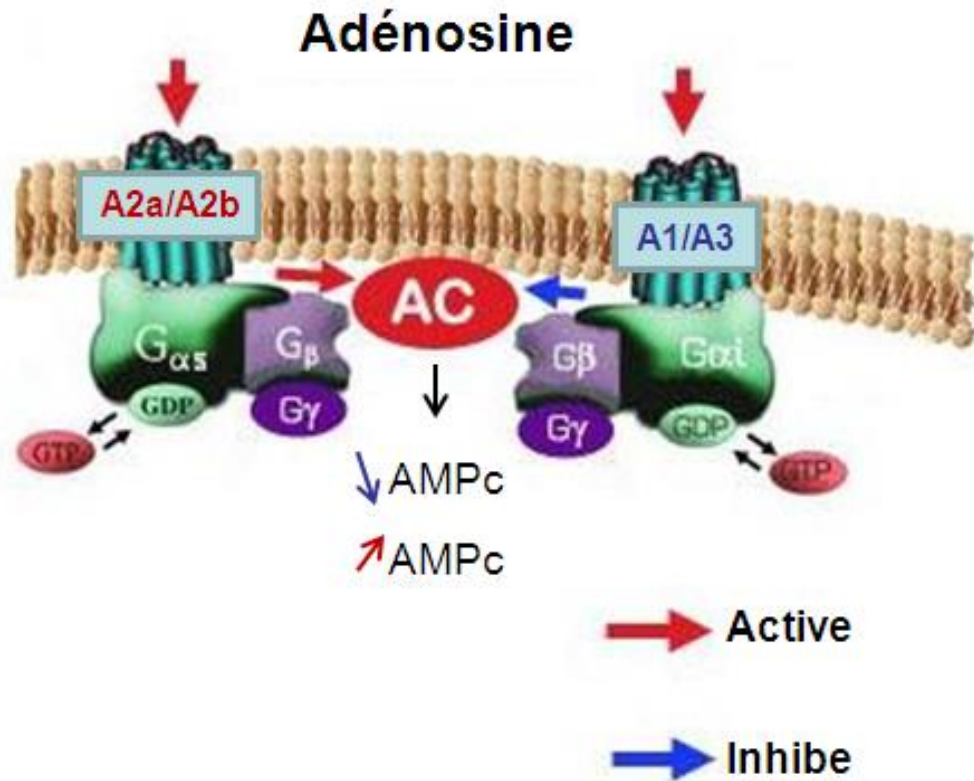


Figure 15: Mécanismes d'action des récepteurs à l'adénosine (figure modifiée à partir de www.palobiofarma.com)

Ces 4 types de récepteurs sont capables de lier l'adénosine, avec des affinités différentes: les récepteurs A1 et A2A sont de haute affinité alors que les récepteurs A2B et A3 sont de basse affinité pour l'adénosine. De plus, leur expression à la surface des cellules dépend du type cellulaire.

Il existe actuellement beaucoup de ligands agonistes et antagonistes spécifiques de ces récepteurs ^{174, 175}.

Dans notre laboratoire, l'adénosine a été étudiée pour ces propriétés cardioprotectrices ¹⁷⁴. Au niveau cellulaire, l'adénosine a présenté des effets cardioprotecteurs notamment par la régulation du renouvellement de la MEC ^{176, 177} et elle est impliquée dans de nombreux processus liés à la réparation cardiaque tels que l'angiogénèse ¹⁷⁸ ou l'inflammation ¹⁷⁹. Concernant le rôle de l'adénosine sur les EPC, il a été démontré que l'adénosine est impliquée dans l'adhésion des EPC aux cellules endothéliales microvasculaires cardiaques ¹⁸⁰, ce qui impliquerait l'adénosine dans l'angiogénèse. De plus, une étude du laboratoire a permis de caractériser des voies potentiellement impliquées dans les effets de l'adénosine sur les EPC par analyses bio-informatiques, comme par exemple celle du CXCR4 ¹⁸¹.

Ces travaux seraient donc en faveur d'un effet bénéfique de l'adénosine sur la biologie des EPC et leurs capacités régénératrices.

3. Les miARN

3.1. Fonction et régulation cardiaque

Les miARN sont impliqués dans de multiples processus biologiques et voies métaboliques comme le développement¹⁸², la croissance cellulaire, la mort cellulaire, l'apoptose, la différenciation ou encore l'inflammation¹⁸³. Tous ces processus régulent la fonction cardiaque. De nombreuses études et revues ont démontré que certains miARN sont modifiés dans le cœur après une MCV et qu'ils sont impliqués dans des processus physiologiques liés à la pathologie en question^{70, 184}. La figure suivante, figure 16, détaille l'implication de certains miARN qui sont modifiés après IM.

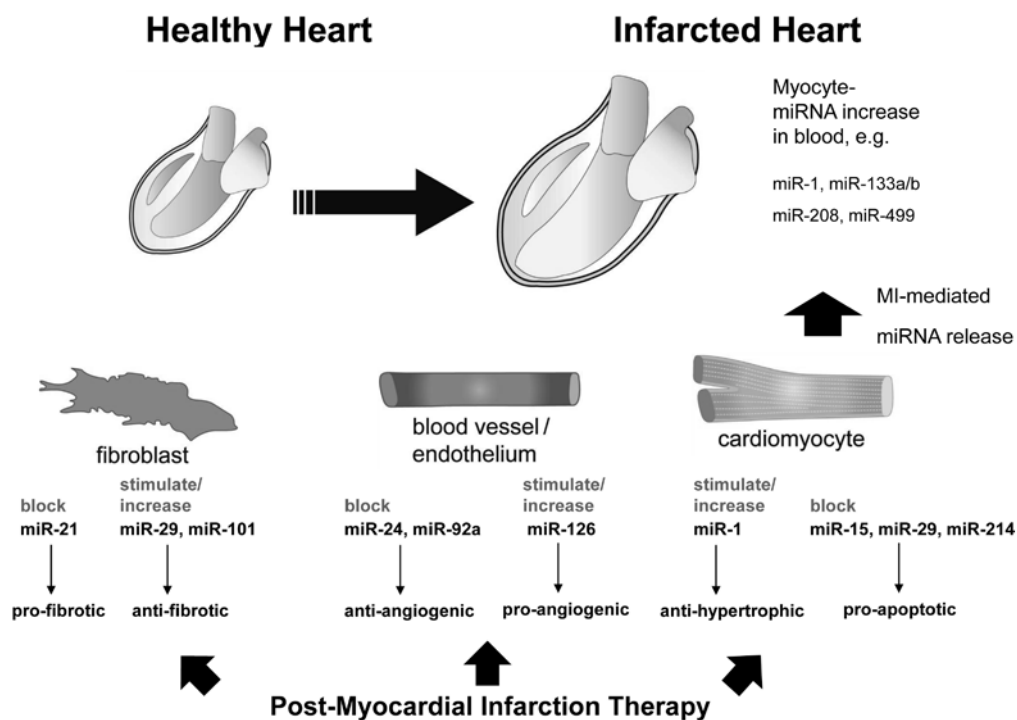


Figure 16: MicroARN modifiés après IM (figure issue de la revue de Fiedler et coll.¹⁸⁴).

Principaux miARN impliqués dans les mécanismes de régulation des différentes cellules impliquées après IM, comme les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cardiomyocytes, sans oublier les principaux miARN modulés dans la circulation sanguine après IM.

En effet, de nombreux miARN dérégulés lors de l'IM¹⁰⁰ sont impliqués dans des mécanismes tels que le remodelage ou la fibrose post-IM. Par exemple, le miR-1 est impliqué dans l'apoptose en ciblant Hsp60¹⁸⁵ et dans l'arythmogénèse en ciblant B56 α ¹⁸⁶. Les miR-23/-24/-195 sont impliqués dans l'hypertrophie des cardiomyocytes¹⁸⁷. Le miR-29 participe à la modification de la MEC durant le remodelage, en ciblant diverses collagènes, fibrillines ou l'élastine¹⁸⁸. Le miR-21 intervient dans la fibrose post-IM en ciblant Spry1¹⁸⁹. Le miR-126 cible Spred-1 ce qui lui permet d'avoir des propriétés pro-angiogéniques¹⁹⁰.

Cependant, toutes ces études ont été effectuées chez l'animal. Une seule étude a été publiée sur l'expression des miARN lors d'un IM chez l'humain, à partir d'échantillons tissulaires post mortem¹⁹¹. Par microarrays et PCR quantitative, 7 miARN ont été identifiés pour leur modulation lors d'un IM: les miR-150/-186/-210/-451 et les miARN spécifiques des muscles, les miR-1 et miR-133a/b.

Au vu de ces résultats il est évident que les miARN sont impliqués dans de nombreux processus clés des MCV. Il ne faut cependant pas oublier que même si une cible spécifique d'un processus a été identifiée, ces miARN ont également de nombreuses autres cibles qui interviennent dans d'autres fonctions cellulaires.

Il serait intéressant de pouvoir modifier leur expression lors d'un IM. Cela permettrait d'agir sur ces processus, par exemple en augmentant l'angiogénèse et diminuant la fibrose délétère. Il faudrait pouvoir augmenter leur expression ou inhiber leur expression, afin de les utiliser dans un but thérapeutique: pour cela ont été créés les antimiRs et les prémiRs.

3.2. Potentiel thérapeutique des miARN

3.2.1. *Caractéristiques et fonction des prémiRs et antimiRs*

Le potentiel thérapeutique des miARN est apparu après la découverte qu'il était possible de moduler l'expression des miARN in vitro et in vivo grâce à de nouveaux outils développés récemment: les antimiRs et les prémiRs. Les antimiRs ou antagomiRs sont utilisés pour diminuer l'expression d'un miARN cible alors que les prémiRs ou miARN mimiques sont utilisés pour amplifier son expression.

Jusqu'à présent, les thérapies utilisant les miARN mimiques sont moins bien mises au point que celles utilisant les antimiRs. Les thérapies utilisant les mimiques se sont montrées plus efficaces quand elles étaient intégrées à des adénovirus ¹⁹², ce qui complique leur potentielle utilisation chez l'homme.

Quant aux antimiRs, il en existe de multiples sortes, toutes provenant de technologies différentes, avec différentes caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques: il existe des antimiRs avec une modification LNA (locked nucleic acid) ¹⁹³, des antimiRs conjugués à du cholestérol par un lien spécifique (antagomiRs) ¹⁹⁴, des antimiRs conjugués à des phosphorothioate avec de multiples ajouts de sucres ¹¹... Toutes ces chimies sont très complexes et ne seront pas détaillées ici. Ces molécules ont été testées, elles sont efficaces et disponibles à l'achat.

Il ne faut cependant pas oublier qu'il existe d'autres stratégies pour moduler l'expression des miARN ¹¹: il est également possible d'inhiber l'expression d'un miARN en créant des animaux Knock Out (KO) pour un miARN particulier, de l'augmenter en créant des animaux Knock In (KI) pour un miARN particulier (bien que cela soit particulièrement complexe, souvent létal ¹⁹⁵ et non adapté à l'humain), ou encore d'empêcher sa liaison avec son ARNm cible en utilisant des miARN « éponges » ou des sortes de « leurres » composé d'un gène rapporteur contenant plusieurs sites de liaison pour un miARN spécifique (méthode efficace pour cibler une famille de miARN, mais très rarement utilisé in vivo) ¹⁹⁶.

3.2.2. Utilisation chez les animaux et chez l'homme

Sachant que les miARN sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques, moduler leur expression in vivo pour traiter les MCV semble être une stratégie très attirante. Toutes les technologies actuelles décrites précédemment sont en faveur d'une utilisation thérapeutique chez l'homme de ces inhibiteurs de miARN ou de mimiques, dans le contexte des MCV.

Plusieurs stratégies sont mises en place comme cibler un seul miARN, une famille de miARN, ou encore plusieurs miARN à la fois. Plusieurs modèles expérimentaux ont été utilisés. Le but étant de déterminer tous les effets entraînés par une diminution d'un miARN spécifique ou son augmentation, des animaux KO/KI ont également été créés afin d'apporter des informations sur la fonction de ce miARN.

3.2.2.1. Etudes effectuées chez le rongeur

De nombreuses études ont déjà été effectuées sur l'utilisation d'antimiRs et prémiRs comme traitement après IM chez des rongeurs, ainsi que la création de rongeurs KO/KI pour des miARN spécifiques.

Certaines modulations de miARN spécifiques ont montré des résultats favorables à un potentiel thérapeutique, comme par exemple:

- Le miR-27b: son inhibition par antagomiR a diminué la dysfonction cardiaque et l'hypertrophie de souris soumises à une constriction transverse aortique, et des souris transgéniques avec surexpression cardiaque-spécifique de ce miARN ont montré une hypertrophie et une dysfonction cardiaque ¹⁹⁷.

- Le miR-133: sa déficience a induit un défaut ventriculaire chez des souris, ce qui était partiellement létal ¹⁹⁸. Les survivants sont morts à la suite de cardiomyopathies et d'IC. Un traitement antimiR-133 a également causé une hypertrophie marquée et maintenue ¹⁹⁹. D'un autre côté, des souris surexprimant le miR-133 spécifiquement dans le cœur ont montré une amélioration de la fonction diastolique et de la fibrose myocardique après constriction transverse aortique, mais aucun effet sur l'hypertrophie du VG n'a été observé ²⁰⁰.

- Le miR-208a: des souris KO pour ce miARN soumises à un cerclage de l'aorte thoracique ont montré une hypertrophie cardiaque et une réduction de la fibrose ²⁰¹. Chez des rats hypertensifs développant de l'IC, un antimiR-208a a permis d'améliorer la fonction cardiaque et la survie ¹⁹³. D'un autre côté, la surexpression du miR-208a a provoqué une hypertrophie majeure du cœur et de l'arythmie ²⁰².

- Le miR-499: un traitement par antagomiR-499 après ischémie/reperfusion (I/R) a permis d'induire une dysfonction cardiaque, et d'aggraver le remodelage du VG, alors que sa surexpression a démontré des effets opposés ²⁰³.

D'autres miARN font l'objet de divergences, en montrant des effets à la fois bénéfiques et délétères ce qui peut limiter leur utilisation en thérapie et ce qui montre la complexité des effets liés à un seul miARN, comme par exemple:

- Le miR-1: augmenter son expression chez des souris transgéniques soumises à une I/R a amplifié la taille de la lésion cardiaque alors que l'inhiber a limité la lésion due à l'I/R, ce qui suggère qu'inhiber le miR-1 à l'aide d'oligonucléotide modifié LNA peut limiter les dégâts de l'I/R ²⁰⁴. Cependant, une autre publication a démontré un rôle cardioprotecteur du

miR-1 par surexpression induite par un adénovirus cardiaque-spécifique, en atténuant l'hypertrophie et le remodelage induit par une surcharge de pression ²⁰⁵.

- Le miR-21: un traitement antimir-21 serait antifibrotique chez des souris soumises à une surcharge de pression ¹⁸⁹, et empêcherait le développement d'une fibrose atriale post-IM ^{206, 207}. D'un autre côté, des souris KO pour le miR-21 ou traitées antimir-21 ont développé un remodelage cardiaque pathologique en réponse à divers stress ²⁰⁸. Cela pourrait s'expliquer par les différentes chimies d'antimirs utilisées ¹⁹⁴. Cependant, sa surexpression durant la phase précoce post-IM a permis de réduire la zone infarctée et d'inhiber le remodelage du VG ²⁰⁹.

D'autres miARN ont montré un début de potentiel thérapeutique mais n'ont pas encore totalement été étudiés comme par exemple:

- Le miR-23a: des souris KO pour ce miARN ont montré une hypertrophie réduite après perfusion d'isoprotérénol ²¹⁰. Ce miARN pourrait être une cible potentielle pour limiter l'hypertrophie du VG et le remodelage post-IM.

- Le miR-34: son inhibition *in vivo* a entraîné une diminution de la mort cellulaire associée à l'âge, induite par l'IM, et une atténuation de la fibrose, tout en augmentant la contractilité du cœur ²¹¹. Ce miARN pourrait être une cible thérapeutique potentielle, bien que sa surexpression n'ait pas encore été évaluée.

- Le miR-92a: son inhibition par antagonomiR dans des souris après IM a provoqué une augmentation de la fonction systolique et diastolique, a réduit la taille de l'IM et a stimulé l'angiogenèse dans la zone infarctée ²¹². Il pourrait donc également être une cible thérapeutique potentielle, même si il faudrait d'abord tester sa surexpression.

- Le miR-101: sa surexpression par adénovirus a permis d'inhiber la fibrose et a protégé le cœur d'une dysfonction du VG après IM chez des rats ¹⁹². Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de son inhibition avant de le considérer comme cible potentielle.

- Le miR-126: sa délétion a causé une létalité partielle caractérisée par une hémorragie, une fuite des vaisseaux et des défauts dans l'intégrité vasculaire ²¹³. Chez les survivants, l'IM a induit une mort prématurée accompagnée de défauts de la néovascularisation. Il serait intéressant de tester si la surexpression du miR-126 a un potentiel à stimuler la réparation du cœur ischémique.

- Le miR-210: dans des souris soumises à IM, un mimique du miR-210 injectée dans le cœur a permis d'améliorer la diminution de la fraction du VG, et d'augmenter la néovascularisation, ce qui suggère un rôle bénéfique de ce miARN ²¹⁴.

- Le miR-503: son inhibition par un adénovirus leurre a amélioré la néovascularisation post ischémique en augmentant le nombre de capillaires et d'artéioles dans le tissu ischémique ⁷⁸.

- Le miR-874: son inhibition par un antagonomiR a réduit le nombre de cellules nécrotiques dans le cœur, a diminué la taille de l'IM et a également amélioré la fonction cardiaque post-IM ²¹⁵.

En sachant que de nombreux miARN sont impliqués dans des phénomènes tels que l'IC, l'idée de cibler plusieurs miARN dans un but thérapeutique s'est révélée très intéressante. Il est en effet possible de cibler une famille de miARN, c'est-à-dire partageant la séquence « seed » à l'aide d'un antimiR ciblant spécifiquement cette séquence. Par exemple, un antimiR spécifique de la famille du miR-15, ciblant 6 miARN (miR-15a/-15b/-16-1/-16-2/-195/-497), injecté à des souris après IM, a permis de diminuer la taille de l'IM, d'améliorer la FE et de diminuer la fibrose ²¹⁶. Un antimiR-15 a également permis d'améliorer la fonction systolique du VG après IM chez des souris adultes ²¹⁷. Ces études révèlent un potentiel thérapeutique à cibler la famille du miR-15 afin d'améliorer la réparation du cœur ischémique. Une autre famille a été ciblée par un antimiR, celle du miR-34 (miR-34a/-34b/-34c) ce qui a permis de réduire le remodelage cardiaque induit par l'IM ou par surcharge de pression du à une constriction de l'aorte induite chez des souris ²¹⁸. Cela a également amélioré la fonction systolique, augmenté l'angiogenèse et réduit la fibrose. La famille miR-212/-132 a également été étudiée: des souris surexprimant cette famille dans le cœur ont développé de l'IC, de l'hypertrophie et ont eu une durée de vie plus courte ²¹⁹. A l'inverse, des souris KO pour cette famille ont été protégées de l'IC et de l'hypertrophie après constriction de l'aorte, tout comme lors d'une inhibition du miR-132 par antagonomiR. Cette famille est donc une potentielle cible thérapeutique anti-hypertrophique.

Une autre stratégie consiste à cibler des clusters de miARN. Un KO du cluster miR-17~92 provoque une certaine létalité alors que sa surexpression améliore la fonction cardiaque après occlusion de l'artère coronaire ¹⁹⁵. Un double KO du cluster miR-143/-145 chez des souris a entraîné un amincissement des couches de muscles lisses, a réduit la pression sanguine, la masse cardiaque et du VG, et a provoqué une mort prématurée après ligature de l'artère carotide ²²⁰.

Le cluster miR-144/-451 a été démontré nécessaire pour un préconditionnement ischémique²²¹. L'injection des miR-1/-21/-24, purifiés du cœur après préconditionnement ischémique, dans le VG de souris soumises à I/R a protégé le cœur et réduit la taille de l'IM²²².

Il est important de préciser que l'application potentielle clinique de ces données n'a pas encore été démontrée. Beaucoup de choses ont été mises en évidence chez les rongeurs, mais également dans des espèces différentes.

3.2.2.2. Etudes effectuées chez d'autres espèces

Plusieurs modèles ont servi à démontrer le potentiel thérapeutiques des miARN, tels que le poisson zèbre et le porc.

Le poisson zèbre, qui est connu pour sa capacité à régénérer son cœur après lésion et par sa transparence au stade précoce du développement, apparaît très attirant pour étudier la régénération cardiaque. Quelques publications se sont intéressées à ce modèle pour étudier les miARN. Un précurseur du miR-24 a été injecté au stade précoce du développement et a provoqué une diminution de la formation de nouveaux vaisseaux, et un œdème péricardial avec accumulation de sang²²³. Cette expérience a servi de base pour l'étude du miR-24 dans un modèle murin d'IM. L'inhibition du miR-126 a induit de nombreuses anomalies dans la morphologie des vaisseaux, et cela a ensuite été confirmé chez les rongeurs¹⁹⁰. L'inhibition du miR-126a ou miR-126b a également induit une hémorragie crânienne²²⁴. Ce modèle sert principalement pour des études de preuves de concept.

Quant au porc, il s'agit d'un modèle de choix pour les études pré-cliniques car sa physiologie est très proche de l'humain. Après avoir démontré l'effet cardioprotecteur de l'inhibition du miR-92a chez des souris soumises à IM, un antimir-92a a été injecté chez des porcs après I/R avec un cathéter ou par intraveineuse²²⁵. Seule l'injection par cathéter a diminué significativement la taille de l'IM, suggérant que le miR-92a est une cible potentielle thérapeutique pour la fonction cardiaque quand son antimir est injecté directement dans le cœur. L'inhibition de la famille du miR-15 a également été testée: des porcs non soumis à un stress cardiaque ont reçu des antimirs de la famille du miR-15 et l'expression du miR-15 a bien été diminuée²¹⁶.

Le développement d'antimirs et pré-miRs est donc l'intérêt principal de nombreuses nouvelles compagnies, comme par exemple miRagen Therapeutics. En effet, après avoir

démontré leur utilité chez des rongeurs et des non-rongeurs, l'étape suivante est l'étude clinique chez l'humain. Plusieurs de ces compagnies se sont donc associées à de grands groupes afin de développer des antimiRs contre des MCV. Actuellement, des antimiRs ciblés contre les miR-208a et miR-499 sont en développement préclinique pour le traitement de l'ICC, et des antimiRs contre la famille du miR-15 sont également testés en développement préclinique, pour traiter le remodelage post IM. Le miR-29 semble également une cible prometteuse pour la fibrose cardiaque. Actuellement, un seul antimiR, antimiR-122, le Miravirsén, est en phase II d'essai clinique pour le traitement de l'hépatite C (Santaris Pharma)²²⁶.

L'idée d'utiliser les miARN pour traiter le cœur pathologique est donc récente et les résultats ci-dessus semblent prometteurs. Il ne faut pas oublier que cibler un miARN peut avoir de nombreux effets secondaires, car un miARN a de nombreuses cibles impliquées dans différentes voies biologiques, ce qui montre la complexité de ce type de traitements. Par exemple, l'inhibition du miR-208 a permis non seulement d'améliorer la fonction cardiaque, mais a également empêché le développement d'obésité et de syndrome métabolique²²⁷. Il faut cependant garder en mémoire que la route entre la découverte d'un miARN candidat à un essai clinique est longue et fastidieuse.

4. Les miARN, les EPC et la réparation cardiaque

Des revues ont été récemment publiées sur la fonction des miARN dans la biologie des cellules souches^{228, 229}. Concernant la biologie des EPC, peu d'études ont analysé et mis en évidence un rôle bénéfique ou néfaste des miARN.

Nous nous sommes aussi intéressés au rôle des miARN présents dans les microvésicules des EPC qui sont sécrétées par ces cellules afin d'agir sur d'autres cellules.

4.1. Effets des miARN sur la biologie des EPC

4.1.1. *MicroARN-15a/-16*

Le miR-15 a et le miR-16, appartenant tous deux à la famille du miR-16, sont surexprimés dans des cellules circulantes angiogéniques (ou EPC précoces) isolées à partir de patients atteints d'ischémie des membres inférieurs, comparés à des contrôles²³⁰. Dans cette étude

récente, publiée au cours de cette thèse, les auteurs ont démontré qu'une augmentation de ces miARN dans des EPC issues de contrôles est à l'origine d'une inhibition de la migration et de la survie des EPC, alors qu'une diminution de ces miARN dans des EPC précoces de patients atteints d'ischémie des membres inférieurs permettait de stimuler la migration. In vivo, des EPC de patients sains, transfectées avec de l'antimiR-15a/-16 et transplantées dans des souris avec ischémie des membres inférieurs a permis de stimuler l'angiogenèse, d'augmenter la densité musculaire d'artériole et aussi d'induire une reprise de la circulation sanguine. Ces résultats suggèrent qu'inhiber le miR-15a/-16 peut être une stratégie intéressante pour stimuler les capacités réparatrices des EPC.

4.1.2. MicroARN-21

Le miR-21 était surexprimé dans des EPC isolées de patients atteints de cardiopathie coronarienne, et cette surexpression était amplifiée après un traitement avec de la diméthylarginine asymétrique (ADMA)²³¹. L'utilisation d'un antimiR-21 a permis d'augmenter les capacités angiogéniques des EPC, ce qui suggère un potentiel thérapeutique à inhiber ce miARN chez des patients atteints de cardiopathie coronarienne.

4.1.3. MicroARN-31

Une étude a caractérisé les différences entre les profils d'expression de miARN obtenus d'EPC issues du sang périphérique ou isolées de sang de cordon ombilical²³². Les auteurs ont mis en évidence que les EPC provenant de sang de cordon exprimaient plus de miARN pro-angiogéniques tel que le miR-31, alors que les EPC issues de sang périphérique exprimaient plus de miARN suppresseurs de tumeur tel que le miR-10a. Inhiber le miR-31 dans ces cellules de sang ombilical empêchait leur migration et la formation de microtubule, alors que la surexpression du miR-31 dans des EPC issues de sang périphérique stimulait leurs capacités angiogéniques. Cette étude suggère que le miR-31 serait une cible thérapeutique potentielle pour augmenter les capacités réparatrices des EPC.

4.1.4. MicroARN-107

Le miR-107 est surexprimé chez des EPC lorsque celles-ci sont en condition hypoxique, comparé à la condition normoxique, ce qui empêcherait ou décalerait dans le temps leur

différentiation induite par l'hypoxie vers un phénotype plus endothéliale²³³. L'inhibition de ce miARN a donc permis de supprimer ce blocage et d'induire une différenciation. Ces données sont applicables dans le contexte de l'ischémie cardiaque, comme par exemple l'IM dans lequel les cellules sont privées d'oxygène.

4.1.5. *MicroARN-126*

L'angiomiR-126, impliqué dans l'angiogenèse, très exprimé par les cellules endothéliales a également été très étudié dans les EPC. En effet, une étude a comparé les miARN exprimés par des EPC issues de patients atteints de cardiopathie coronarienne et de patients contrôles. Le miR-126 a été trouvé sous-exprimé et le miR-92a surexprimé dans les EPC de patients malades. De plus, l'atorvastatine a modulé l'expression de ces miARN ce qui a augmenté la quantité d'EPC circulantes²³⁴.

Une autre étude a associé l'expression des miR-126 et miR-208-5p avec le devenir des patients atteints de cardiomyopathie ischémique et d'ICC²³⁵. Ces miARN ont été suggérés comme potentiels biomarqueurs pronostiques chez des patients atteints d'ICC. Le miR-126 a également été trouvé diminué dans des EPC précoces et des cellules CD34+ ainsi que le miR-130a dans des cellules isolées de patients atteints d'ICC, comparés à des contrôles. Cela pourrait expliquer l'inefficacité sur l'angiogenèse de la transplantation d'EPC précoces de patients atteints d'ICC chez des souris soumises à un IM²³⁶. Inhiber le miR-126 dans des EPC issues de contrôles sains diminuait leurs capacités angiogéniques alors que l'augmenter chez des patients atteints d'ICC avait des effets bénéfiques. Une autre étude a montré que le miR-126 inhibe l'expression du SDF-1 α dans les cellules endothéliales²³⁷. A partir de cela, des expériences de coculture ont démontré qu'inhiber le miR-16 dans des HUVEC (cellules endothéliales humaines de veine ombilicale) augmentait l'expression du SDF-1 α et que cela permettait d'augmenter la migration d'EPC CD34+. Traiter des souris soumises à une ischémie des membres postérieurs avec de l'antimiR-126 a augmenté la migration de cellules progénitrices Sca-1+/Lin2, probablement grâce à une augmentation du SDF-1 α produit par les cellules endothéliales présentes dans les tissus ischémiques. De plus, inhiber le miR-126 dans des cellules CD34+ diminue leurs capacités angiogéniques et augmenter le miR-126 provoque l'effet opposé²³⁸. Ce qui est très intéressant, c'est que le taux de miR-126 était également augmenté dans le surnageant des cellules CD34+, ce qui pourrait s'expliquer par une sécrétion active dans des microvésicules ou des exosomes. Ceci est un point intéressant

qui suggère que le miR-126 serait sécrété par des cellules CD34+ et agirait comme un facteur paracrine pro-angiogénique.

4.1.6. MicroARN-210

Le miR-210 a été trouvé associé à l'expression du VEGF ²³⁹. Des cellules CD34+ issues de sang de cordon (contenant des EPC tardives) mises en culture dans du milieu supplémenté en VEGF formaient un réseau très dense sur matrigel et augmentaient la perfusion tissulaire dans des souris soumises à une ischémie des membres postérieurs. Les auteurs ont démontré que ces effets impliquaient le miR-210 et que le VEGF entraînait une surexpression de ce miARN. Inhiber le miR-210 empêchait les propriétés pro-angiogéniques du VEGF, alors que l'augmenter avec un mimique entraînait les effets opposés. Ces données suggèrent que le miR-210 est impliqué dans les capacités angiogéniques des cellules souches CD34+.

4.1.7. MicroARN-221/-222

Ces 2 miARN ont été trouvés surexprimés dans des EPC précoces isolées de patients atteints de cardiopathie coronarienne et inversement corrélés avec le nombre d'EPC chez ces patients ²⁴⁰. L'expression de ces 2 miARN étaient diminuées après 12 mois de traitement avec de l'atorvastatine, et le nombre d'EPC était augmenté. Ce papier suggère que ces miARN seraient sensibles à des traitements et en particulier à l'atorvastatine. Le miR-221 est également surexprimé par des EPC isolées de patients atteints d'athérosclérose, comparés à des contrôles et sa surexpression a permis de diminuer la prolifération des EPC ²⁴¹.

4.1.8. Les miARN liés à la sénescence

Plusieurs miARN sont impliqués dans la sénescence au sein des EPC, en particulier, le miR-34a, qui est un miARN suppresseur de tumeur dont la surexpression induit la sénescence des EPC et inhibe leurs propriétés angiogéniques ²⁴². D'autres miARN, les miR-10a* et miR-21 (déjà décrit précédemment) ont été trouvés surexprimés par des EPC âgées ²⁴³. Leur inhibition diminue la sénescence, augmente leur auto-renouvellement et leur potentiel angiogénique, alors que leur surexpression chez des EPC jeunes induit la sénescence, diminue l'auto-renouvellement et réduit l'angiogénèse. Ces données suggèrent que ces deux miARN sont néfastes pour la fonction réparatrice des EPC

4.1.9. Les miARN liés au cancer

Les EPC ont été étudiées car elles participent à l'angiogenèse, qui est un élément important dans la progression des tumeurs²⁴⁴. Une délétion génétique de Dicer a entraîné une diminution du nombre d'EPC circulante ainsi que de l'angiogenèse et de la croissance des tumeurs. Deux miARN, les miR-10b et miR-196b sont des cibles potentielles pour inhiber l'angiogenèse tumorale. Ces miARN pourraient avoir un certain potentiel dans le contexte CV, et on pourrait s'attendre à ce que l'augmentation de leur expression permette d'amplifier les capacités angiogéniques des EPC.

4.2. Effets paracrines des miARN sécrétés par les EPC

Il a été démontré dans la littérature que les EPC sécrétaient des microvésicules capables d'augmenter la néoangiogenèse des ilots pancréatiques humains²⁴⁵. Ces microvésicules contiennent les angiomiR-126 et angiomiR-196, et les inhiber empêcherait ces effets pro-angiogéniques. Il a également été démontré que les microvésicules issues des EPC ont également un rôle dans la protection du rein face à une atteinte ischémique, en partie grâce à un mécanisme dépendant des miARN²⁴⁶. Dans une autre étude, l'injection de microvésicules issues d'EPC dans des souris soumises à une ischémie des membres postérieurs a entraîné une augmentation de la perfusion au sein de ce membre et diminuait l'atteinte ischémique²⁴⁷. Des microvésicules issues d'EPC ayant subies une délétion génétique de Dicer ou inactivées par des RNAses ont diminué ces effets, ce qui suggère que ce sont les miARN contenus dans ces microvésicules qui seraient à l'origine des capacités réparatrices des EPC. Ces données suggèrent que les miARN contenus et sécrétés dans les microvésicules participeraient aux capacités pro-angiogéniques des EPC.

Toutes ces données suggèrent clairement que les miARN sont impliqués dans la biologie des EPC et dans leurs capacités réparatrices, tant par leur action directe dans les EPC que par leur sécrétion active en tant qu'acteurs paracrines.

Toutefois, il y a encore beaucoup de choses à découvrir pour expliquer les différences phénotypiques existantes entre les multiples types d'EPC, et leurs différentes propriétés associées. De plus, étudier leur miRnome pourrait également permettre de diminuer les discordances existantes sur les différents types d'EPC.

MATERIEL ET METHODES

Axe 1: Intérêt des miARN comme biomarqueurs des MCV aigües

1. Cohortes de patients

Tous les patients de ces diverses cohortes ont rempli un consentement écrit conforme à la déclaration d'Helsinki, et en accord avec les comités éthiques locaux (pour les cohortes luxembourgeoises, il s'agit des directives du Comité de Bioéthique du Grand-duché du Luxembourg).

1.1. Le registre APACE

Le registre APACE (advantageous predictors of acute coronary syndrome evaluation) est une étude prospective, internationale, multicentrique, créée et coordonnée par l'hôpital universitaire de Bâle. Cette étude est toujours en cours actuellement. Elle a recruté d'avril 2006 à juin 2009 1267 patients s'étant présentés aux urgences avec une douleur thoracique, démarrée dans les douze heures précédant leur arrivée.

Pour ces travaux, 1155 patients ont été recrutés, en excluant les patients en insuffisance rénale terminale sous dialyse et les patients sans diagnostic final évident. Des échantillons plasmatiques ont été prélevés à l'arrivée aux urgences ainsi que 1, 2, 3 et 6 heures plus tard, afin de pouvoir mesurer les cTn à différents temps. Différents paramètres cliniques ont servi au diagnostic final, tel que l'historique du patient, un examen physique, les résultats des mesures de cTn, ECG,... par 2 cardiologistes indépendants, et par 3 en cas de désaccord des 2 premiers.

Au final, 5 groupes de patients ont été définis:

- Les patients avec IM aigu, diagnostiqué par une nécrose myocardique (caractérisée par un taux de cTn > 99^{ième} percentile) associée à des paramètres cliniques d'ischémie myocardique. Ils représentent 19% des patients, dont 20% de STEMI, et 80% de NSTEMI.

- Les patients avec angine de poitrine instable, diagnostiquée par des niveaux de cTn normaux, une angine au repos, une détérioration d'une ancienne angine de poitrine, des tests

cardiaques d'exercices positifs, ou une cathétérisation cardiaque avec des artères coronaires sténosées à 70% ou plus. Ils représentent 12% des patients.

- Les patients à maladies cardiaques mais non-coronaires, comprenant les myocardites, péricardites, l'IC, les dysrythmies cardiaques, et les urgences hypertensives. Ils représentent 14% des patients.

- Les patients avec des douleurs à la poitrine non cardiaques, comme les douleurs musculo-squelettiques ou les désordres gastro-œsophagiens, soit 48% des patients.

- Les patients à symptômes d'origine inconnue, soit 6% des patients de l'étude.

Les patients ont été suivis à 3, 12 et 24 mois après sortie de l'hôpital, par téléphone ou par écrit. Les caractéristiques complètes des patients se trouvent dans le tableau 1.

Tableau 1: Caractéristiques des 1155 patients APACE.

	Tous les patients (n=1155)	Infarctus du myocarde aigu		Valeur de p (IM aigu/pas d'IM)
		Avec (n=224)	Sans (n=931)	
Caractéristiques				
Age, année	63 (50-76)	72 (61-80)	61 (49-74)	< 0,001
Sexe masculin, n (%)	768 (67%)	158 (71%)	610 (66%)	0,153
Indice de masse corporelle	26 (24-30)	25,9 (23,8-29)	27 (24-30)	0,215
Taux de filtration glomérulaire estimée (ml/min/1.73m ²)	85 (68-101)	73,6 (59-95)	87 (70-102)	< 0,001
STEMI		45 (20%)		
NSTEMI		179 (80%)		
Facteurs de risque, n (%)				
Hypertension	762 (66%)	179 (80%)	583 (63%)	<0,001
Hypercholestérolémie	515 (45%)	117 (52%)	398 (43%)	0,01
Diabète	208 (18%)	57 (26%)	151 (16%)	0,001
Tabac	281 (24%)	56 (25%)	225 (24%)	0,794
Antécédents de tabac	402 (35%)	79 (35%)	323 (35%)	0,871
Antécédents, n (%)				
Maladies coronaires	436 (37%)	106 (48%)	309 (33%)	<0,001
IM	281 (24%)	72 (32%)	209 (22%)	0,002
Pontage aorto-coronarien	110 (10%)	33 (15%)	77 (8%)	0,003
Angioplastie coronarienne	276 (24%)	55 (25%)	221 (24%)	0,797
Maladies artérielles périphériques	78 (7%)	30 (13%)	48 (5%)	<0,001
Accident vasculaire cérébral	63 (6%)	24 (11%)	39 (4%)	<0,001
Statut vital (médiane, rang interquartile)				
Pression artérielle systolique, mmHg	142 (127-160)	142 (126-163)	143 (127-160)	0,994
Pression artérielle diastolique, mmHg	84 (75-93)	83 (73-93)	84 (75-93)	0,261
Rythme cardiaque, battements par minutes	76 (66-89)	79 (68-90)	75 (65-89)	0,055
Symptômes				
Début avant x heures	5 (3-12)	6 (3-14)	5 (3-12)	0,082
Maximum avant x heures	4 (2-7)	4 (2-8)	4 (2-7)	0,123
Modifications à l'ECG				
Bloc de branche	42 (4%)	18 (8 %)	24 (3%)	<0,001
Élévation du segment ST	60 (5%)	41 (18 %)	19 (2%)	<0,001
Dépression du segment ST	130 (11%)	72 (32 %)	58 (6%)	<0,001
Inversion des ondes T	149 (13%)	53 (24%)	96 (10%)	<0,001
Pas de modifications	774 (67%)	40 (18%)	734 (79%)	<0,001

1.2. Le registre LUCKY

Le registre national LUCKY a été créé en 2006 par l'Institut National de Chirurgie Cardiaque et de Cardiologie Interventionnelle Luxembourgeois (INCCI). Il est composé de patients diagnostiqués avec IM aigu et ayant subi une angioplastie coronaire. Ce registre contient de nombreuses informations relatives à l'état de santé des patients ainsi que leur suivi jusqu'à 1 an après IM.

Un total de 510 patients a été enregistré dans ce registre lors de ces travaux. Ils ont tous été diagnostiqués moins de 12 heures après leur arrivée aux urgences par une modification significative du segment ST à l'ECG et une augmentation des enzymes cardiaques.

Lors de cette étude, deux groupes ont été déterminés:

- Les patients STEMI ou patients avec sus-décalage du segment ST, qui sont caractérisés par une élévation significative du segment ST, une artère coronaire majeure complètement occluse (artère coronaire gauche descendante, circonflexe, ou droite) ainsi qu'une activité de la CPK supérieure à 600U/L.

- Les patients NSTEMI, ou patients sans sus-décalage du segment ST, caractérisés par une dépression significative du segment ST, des lésions partielles importantes voir une obstruction d'une artère coronaire majeure nécessitant une angioplastie coronaire, ainsi qu'un taux de cTnT positif (supérieur à 0,03µg/L) après 24 heures.

Les échantillons plasmatiques ont été obtenus lors de la reperfusion, mais également 2 fois par jour par la suite, afin de mesurer les taux des marqueurs cardiaques CPK, cTnT et la CRP. Ces prélèvements sont effectués par le laboratoire de Biologie Médicale du Centre Hospitalier de Luxembourg et ont été conservés à -80°C dans des tubes citratés.

Un suivi est effectué 4 mois après IM afin d'effectuer un ECG. Chez 362 de ses patients, la FE a été mesurée par échocardiographie (278 patients STEMI et 84 NSTEMI). Un total de 87 volontaires sains a été recruté lors d'une étude observationnelle nationale des risques CV. Les caractéristiques complètes des patients se trouvent dans le tableau 2.

Tableau 2: Caractéristiques des patients de la cohorte LUCKY.

	NSTEMI (n=113)	STEMI (n=397)	Valeur de P (STEMI vs NSTEMI)	Contrôles (n=87)
Age, année (médiane-rang)	62 (30-89)	62 (32-91)	0,36	53 (40-60)
Sexe (masculin, n, %)	78 (69)	303 (76)	0,60	87 (100)
IMC (médiane, rang)	26 (18-47)	27 (18-46)	0,54	28 (22-40)
Marqueurs plasmatiques, valeurs maximales (médiane-rang)				
CPK (unité/litre)	319 (34-598)	1847 (602-11395)	<0,001	91 (32-565)
TnT (µg/litre)	0,8 (0,02-9,4)	4,9 (0,01-34,12)	<0,001	<0,03
hsCRP (mg/litre)	5 (0,34-383)	9 (0,3-301)	0,13	1.48 (0,3-26)
hsTnT à l'arrivée aux urgences (médiane, rang)	0,09 (0,003-5,96)	0,17 (0,003-10)	<0,001	
FE à 4 mois, % (médiane, rang)	55 (20-78)	50 (15-83)	0,001	
Antécédents cardiovasculaires, n (%)				
IM	19 (17)	35 (9)	0,05	0 (0)
Pontage aorto-coronarien	3 (3)	33 (8)	0,08	0 (0)
Angioplastie coronarienne	21 (19)	34 (8)	0,01	0 (0)
Diabetes	25 (22)	91 (23)	0,99	0 (0)
Hypertension	56 (50)	179 (45)	0,68	17 (20)
Hypercholestérolémie	53 (47)	164 (41)	0,57	12 (14)
Tabac	45 (40)	162 (41)	0,98	20 (23)
Médicaments, n (%)				
B-bloquants	92 (81)	323 (81)	0,94	0 (0)
Antagonistes du calcium	5 (4)	3 (1)	0,02	0 (0)
Nitrates	30 (27)	82 (21)	0,35	0 (0)
IEC	44 (39)	152 (38)	0,99	0 (0)
Statines	90 (80)	317 (80)	0,95	0 (0)
Inhibiteurs de l'angiotensine	7 (6)	24 (6)	0,87	0 (0)

Tous les patients ont été traités avec de l'aspirine, du clopidogrel, de l'héparine et de l'abciximab. hsCRP: protéine C réactive haute sensibilité ; IEC: inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine.

1.3. Le registre LARIBOISIERE

Le registre que nous appelons ici LARIBOISIERE a été créé entre février 2008 et juin 2011 à l'hôpital Lariboisière à Paris. Il est composé de patients admis aux urgences ou aux soins intensifs, ayant une dyspnée aiguë, liée ou non à une ICA. Ce registre contient les données démographiques et les paramètres biologiques de ces patients, lors de l'admission.

En tout, 294 patients ont été enregistrés lors de ces travaux, 236 ayant une dyspnée liée à de l'ICA, et 58 non reliée à une ICA. Les patients avec dyspnée reliée à une ICA ont été divisés en 2: les patients avec ICA de novo et les patients avec ICA décompensée (figure 17).

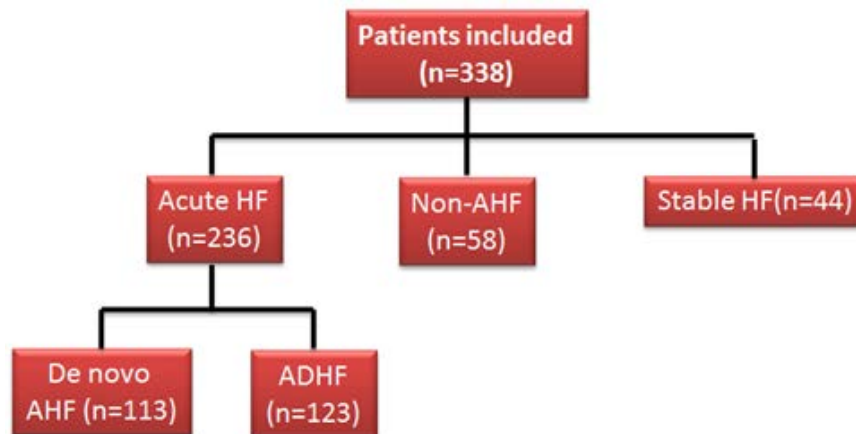


Figure 17: Organigramme de la population de l'étude LARIBOISIERE.

Tous ces patients ont été diagnostiqués par 2 médecins séniors, experts en IC, grâce à des paramètres cliniques et biologiques classiques, incluant la mesure du taux de BNP.

Les échantillons sanguins et plasmatiques ont été récupérés dans des tubes EDTA dans les 4 heures suivant l'admission, et stockés immédiatement à -80°C. Le taux de BNP a été mesuré à l'aide d'un system Abbott Architect (Abbott laboratories, Abbott Park, USA).

Un suivi est effectué à 5 jours après admission dans un sous-groupe de 64 patients où des échantillons sanguins et plasmatiques ont été prélevés. Un suivi a également été effectué 1 an après admission, afin d'obtenir les informations sur la mortalité et la réadmission à l'hôpital de ces patients avec ICA.

De plus, du plasma de 44 patients avec ICC en condition stable a été également prélevé lors de visite routinière.

Cette étude est enregistrée sous l'identifiant NCT01374880 (www.clinicaltrials.gov). Les caractéristiques complètes des patients se trouvent dans le tableau 3.

Tableau 3: Caractéristiques des patients de la cohorte LARIBOISIÈRE.

	Dyspnée aiguë (n=294)		ICC stable (n=44)
	ICA (n=236)	Non-ICA (n=58)	
Age (année)	76 (65,5-84,5)	72.5 (62-79,75)	64 (52-71)
Sexe masculin (n)	93 (39)	27 (47)	37 (86)
Antécédents cardiovasculaires, n(%)			
Précédente IC	123 (52)	0 (0)	44 (100)
Fibrillation atriale	97 (41)	8 (14)	0 (0)
COPD/asthme	30 (13)	38 (66)	5 (11)
Maladies coronaires	67 (28)	9 (16)	20 (45)
Diabète	65 (27)	7 (12)	9 (20)
Maladie rénale chronique	34 (14)	1 (2)	6 (14)
Statut vital (médiane, rang interquartile)			
Rythme cardiaque, battements par minutes	88 (71-107)	97 (84-110)	74 (63-90)
Pression artérielle systolique, mmHg	135 (118-155)	134 (123-156)	109 (94,75-126)
Pression artérielle diastolique, mmHg	78 (70-89)	76 (69,5-88)	70 (63-78)
ECG			
FE (%)*	35 (25-56)	-	20 (20-30)
Dosage à l'admission			
BNP (pg/mL)	1242 (722-2394)	112 (38-157)	770 (430-1542)
Creatinine (µmol/L)	100 (75-139)	69 (60-80)	114 (92-150)
Diagnostic à l'admission (%)			
ICA décompensée	123 (52)	0 (0)	-
ICA de novo	113 (48)	0 (0)	-
COPD/asthme	0 (0)	48 (83)	-
Embolie pulmonaire	0 (0)	3 (5)	-
Pneumonie	0 (0)	13 (22)	-
Autre	0 (0)	13 (22)	-
Traitement à l'admission			
B-bloquants	110 (37)	1 (2)	32 (73)
Statines	94 (32)	5 (9)	23 (52)
Anti-plaquettaires	125 (42)	3 (5)	29 (66)
Antagonistes du calcium	69 (23)	3 (5)	0 (0)
Diurétiques	150 (51)	6 (10)	27 (62)
Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine	156 (53)	11 (19)	32 (73)

COPD: chronic obstructive pulmonary disease.

** La FE a été mesurée par ECG durant l'index d'hospitalisation chez 80 patients.*

1.4. Le registre NORTH POLE

Le registre NORTH POLE est composé de patients ressuscités après AC et admis aux soins intensifs du Centre Hospitalier de Luxembourg. Cette étude est toujours en cours actuellement.

Tous les patients ont été traités par hypothermie à 33°C pendant 24h. Le maintien de la température ainsi que son augmentation progressive (0.5°C/heure) sont effectués par le système Coolgard (Zoll Circulation, Sunnyvale, USA). Les échantillons plasmatiques ont été prélevés 48 heures après AC, en condition thermique classique, dans des tubes citratés et stockés à -80°C. La détermination des lésions cardiaques s'est faite par mesure des marqueurs CPK et cTnT. Deux autres marqueurs ont également été mesurés à 48h, la NSE aidant au pronostic cérébral après AC et la PCT pour les infections.

Chaque patient a subi une évaluation neurologique à la fin du séjour en soins intensifs et également lors d'un suivi, 6 mois après.

Ces 28 patients ont été classés selon le score CPC:

- Les patients à bon pronostic neurologique: CPC 1-2, contenant des patients avec pas (CPC-1) ou peu (CPC-2) de séquelles neurologiques.
- Les patients à mauvais pronostic neurologique: CPC 3-5, contenant des patients avec de sévères séquelles neurologiques (CPC-3), dans le coma (CPC-4) ou morts (CPC-5).

Les caractéristiques complètes des patients se trouvent dans le tableau 4.

Tableau 4: Caractéristiques des 28 patients NORTH POLE.

	CPC 1-2 (n=14)	CPC 3-5 (n=14)	Valeur de P
Age, année (moyenne-rang)	64 (45-82)	63 (47-78)	0,724
Sexe (masculin, n, %)	9 (64,3)	9 (64,3)	1,000
SAPS II (moyenne-rang)	62 (47-83)	74 (56-98)	0,009
Durée entre l'arrêt cardiaque et le retour à la circulation spontanée (min, médiane-rang)	20 (5-35)	30 (22-76)	<0,001
Rythme initial (n, %)			0,038
Asystolie	0 (0)	6 (42,9)	
Activité électrique sans pouls	1 (7,7)	0 (0)	
Fibrillation ventriculaire/Tachycardie ventriculaire	11 (84,6)	8 (57,1)	
Facteurs associés (n, %)			
Choc cardiogénique	3 (21,4)	8 (57,1)	0,120
IM	9 (64,3)	10 (71,4)	1,000
Electroencéphalogramme de l'état de mal épileptique	0 (0)	5 (35,7)	0,041
Convulsion	0 (0)	6 (42,9)	0,016
Antécédents (n, %)			
Tabac	6 (42,9)	2 (14,3)	0,209
Alcoolisme	0 (0)	1 (7,1)	1,000
Maladies hépatiques	0 (0)	2 (14,3)	0,481
Insuffisance rénale	2 (14,3)	2 (14,3)	1,000
Hypertension	8 (57,1)	7 (50)	1,000
Insuffisance cardiaque	5 (35,7)	7 (50)	0,704
Maladies coronaire	5 (35,7)	5 (35,7)	1,000
Diabetes			
Insulino-dépendant	3 (21,4)	0 (0)	0,222
Non insulino-dépendant	2 (14,3)	2 (14)	1,000
CPC à la fin du séjour en soins intensifs (n, %)			<0,001
CPC 1	10 (71)	0 (0)	
CPC 2	4 (29)	0 (0)	
CPC 3	0 (0)	3 (21)	
CPC 4	0 (0)	3 (21)	
CPC 5	0 (0)	8 (58)	
CPC à 6 mois (n, %)			<0,001
CPC 1	13 (93)	0 (0)	
CPC 2	1 (7)	0 (0)	
CPC 3	0 (0)	1 (7)	
CPC 4	0 (0)	1 (7)	
CPC 5	0 (0)	12 (86)	

SPAS II: Simplified Acute Physiology score II.

1.5. Le registre MINOS

Le registre MINOS est composé de 41 patients en insuffisance rénale terminale traités par hémodialyse.

Ces patients ont été diagnostiqués par un ECG à la fin de l'hémodialyse pour exclure l'existence d'une ischémie sous-jacente pouvant influencer les mesures de hs-cTnT.

Deux prélèvements sanguins ont été effectués sur chaque patient dans des tubes citratés et stockés à -80°C: un prélèvement avant hémodialyse et un après. De plus, les dialysats de 4 patients ont également été récupérés et stockés à -80°C.

Un total de 41 volontaires sains a été recruté à partir d'une étude observationnelle nationale des risques CV.

Les caractéristiques complètes des patients se trouvent dans le tableau 5.

Tableau 5: Caractéristiques des 41 patients MINOS.

	ESRD (n=41)	Contrôles (n=41)
Sexe (masculin, n, %)	26 (63)	41 (100)
IMC, kg/m ² (médiane, rang)	26 (17-42)	29 (22-40)
Age, année (médiane-rang)	67 (30-82)	57 (54-60)
Antécédents cardiovasculaires (n, %)		
IM	5 (12)	0 (0)
Pontage aorto-coronarien	6 (15)	0 (0)
Angioplastie coronarienne	2 (5)	0 (0)
Pacemaker	0 (0)	0 (0)
Defibrillateur	1 (2)	0 (0)
Hypertension	20 (49)	10 (24)
Diabètes	7 (17)	0 (0)
Hypercholesterolemie	13 (32)	9 (22)
Tabac	9 (22)	5 (12)
Antécédents familiaux de maladie coronarienne aiguë	13 (32)	
Insuffisance rénale (n, %)	41 (100)	0 (0)
Hémodialyse (n, %)	41 (100)	0 (0)
Durée de l'hémodialyse, année (médiane, rang)	5 (0,5-24)	
Medicaments, n (%)		
Aspirine	19 (46)	0 (0)
Clopidogrel	5 (12)	0 (0)
B-bloquants	21 (51)	0 (0)
Antagonistes du calcium	7 (17)	0 (0)
Nitrates	2 (5)	0 (0)
IEC	3 (7)	0 (0)
ARBs	1 (2)	0 (0)
Statines	18 (44)	0 (0)
Fibrates	1 (2)	0 (0)
Warfarine	7 (17)	0 (0)
Furosemide	6 (15)	0 (0)
Amiodarone	3 (7)	0 (0)

IEC: inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ; ARBs: Antagonistes du récepteur de l'angiotensine ; ESRD: end-stage renal disease (insuffisance rénale terminale)

2. Mesure des miARN circulants

2.1. Extraction d'ARN total

L'ARN total (contenant les petits ARN) a été extrait des échantillons plasmatiques à l'aide du kit mirVANA PARIS (Ambion, Life Technologies, Austin, USA) sans enrichissement en petits ARN, selon les instructions du fournisseur. Un volume initial de 400µl de plasma a été

utilisé, auquel a été ajouté un mélange de 3 miARN synthétiques dont les séquences sont des copies de miARN de *C.elegans* (sans aucune homologie de séquence avec l'humain): cel-miR-39, cel-miR-54 et cel-miR-238 (Qiagen, Hilden, Allemagne). Ces 3 miARN synthétiques vont servir comme contrôle d'efficacité d'extraction. Sur chaque échantillon a été effectué un traitement DNase I (Qiagen) afin de supprimer toute contamination potentielle en ADN génomique. Les ARN totaux ont été élués dans un volume final de 50µl. Il est impossible de doser la quantité d'ARN présent dans ces éluas, et encore moins la quantité de miARN, car il y a peu/pas d'ARN messagers circulants, et même si il y a des miARN circulants, leur quantité est trop faible dans le plasma pour être quantifiée.

2.2. Rétrotranscription (RT) et PCR quantitative en temps réel des miARN

Sachant qu'il est impossible de quantifier la quantité d'ARN totale extraite de ces échantillons plasmatiques, 15µl de ces ARN totaux ont été utilisés et rétro-transcrit à l'aide du kit miScript reverse transcription (Qiagen), ce kit permettant de rétro-transcrire les grands et les petits ARN. La PCR quantitative en temps réel a été réalisée à partir des ADN complémentaires (ADNc) obtenus, dilués 10 fois, dans un appareil CFX96 (Biorad, Nazareth Eke, Belgique), en utilisant le kit miScript SYBR-green PCR (Qiagen), ainsi que les amorces miRNA-specific miScript primer (Qiagen), spécifiques aux miARN étudiés mais également aux miARN synthétiques ou cel-miARN ajoutés lors de l'extraction. Les conditions de PCR sont: 15 minutes à 95°C, puis 15 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 30 secondes à 70°C, ces 3 dernières étapes étant répétées 40 fois. Le point de fusion a été déterminé grâce à 80 cycles de 5 secondes avec une augmentation de 0,5°C de 55°C à 95°C. Les résultats d'expression ont donc été calculés grâce aux miARN synthétiques, utilisés comme normalisateur, à partir de leur CT (cycle threshold) par la formule: $2^{[(\text{moyenne des CT de cel-miR39} + \text{cel-miR-54} + \text{cel-miR-238}) - \text{CT du miARN cible}]}$. Les valeurs obtenues peuvent être transformées en logarithme si nécessaire. Il est important de préciser que pour les miARN mesurés dans les plasmas dont les CT sont très tardifs, un seuil de détection a été déterminé: les miARN ayant une déviation standard de leur CT inférieur à 0,3, une moyenne de leur CT inférieure à 35 et un pic spécifique dans la courbe de fusion, ont été considérés comme détectables. La plus petite valeur obtenue divisée par 10 a été donnée aux miARN non détectables.

3. Analyses statistiques

Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative dans tous ces travaux.

Différents tests ont été appliqués en fonction des études:

- Dans l'étude n°1 sur la cohorte APACE, les variables continues sont exprimées par la médiane et les variables catégorielles en pourcentage. Les logiciels statistiques SPSS 19.0 (SPSS Inc, Chicago, USA) et MedCalc 9.6.4.0 (MedCalc software, Mariakerke, Belgique) ont été utilisés. Tous les tests statistiques sont à 2 voies. Les comparaisons entre groupes sont effectuées soit par un test chi-2 (variables catégorielles), soit par un test de Mann-Whitney (variables continues) ou de Kruskal-Wallis (pour comparer plusieurs groupes). Les performances diagnostiques et pronostiques (sensibilité et spécificité) des miARN circulants ont été évaluées en utilisant les courbes ROC (receiver operating characteristic) et la mesure de l'aire sous la courbe (AUC). Les AUC ont été comparées par la méthode de DeLong²⁴⁸. Nous avons utilisé une analyse de régression de cox univariée ou multivariée afin d'évaluer la capacité des miARN circulants à prédire la mortalité ou la survenue d'un nouvel IM. Les courbes Kaplan-Meier ont été utilisées pour les analyses de survie et le test du log rank a servi pour la significativité. Un calcul de l'IDI (integrated discrimination improvement) a permis de déterminer si les miARN circulants sont capables d'améliorer le diagnostic de l'IM²⁴⁹.

- Dans l'étude n°2 portant sur la cohorte LUCKY, la normalité de la distribution des variables a d'abord été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk. Le logiciel Sigma Plot, version 11.0 et le logiciel Weka v3.6.2 ont été utilisés pour effectuer les tests statistiques à 2 voies. La comparaison de deux groupes à variables continues a été effectuée soit par un test t de Student pour les données gaussiennes, soit par un test Mann-Whitney pour les données non gaussiennes. Un test chi 2 a permis la comparaison de deux groupes à variables catégorielles. Les courbes ROC et la mesure de l'AUC ont servi à évaluer les performances diagnostiques des miARN circulants (les AUC ont été comparées par la méthode de DeLong). Des analyses de reclassification ont été utilisées pour évaluer les valeurs additives des différents miARN à un modèle clinique multiparamétrique ou à la hs-cTnT. Le but est de déterminer si les miARN circulants sont capables de reclasser les patients mal classés ou mal diagnostiqués par le marqueur classiquement utilisé. L'indice de reclassification (NRI) a été déterminé et a permis de quantifier ces reclassifications par rapport au biomarqueur classique utilisé^{249, 250}.

Pour évaluer les associations entre les taux des miARN circulants et les marqueurs classiques, un modèle de régression multiple linéaire a été créé. Des corrélations ont été également effectuées à l'aide du test de Spearman et du test de Pearson pour les données gaussiennes et non-gaussiennes, respectivement.

Les analyses de survie ont été effectuées par les courbes Kaplan-Meier et le test du log rank a servi pour la significativité.

- Dans l'étude n°3 sur la cohorte LARIBOISIERE, les données ont toutes été transformées en données logarithmiques. Les variables continues sont exprimées par la médiane et les variables catégorielles en pourcentage. Le logiciel R a été utilisé (www.r-project.org) pour les analyses statistiques à 2 voies. La comparaison de plusieurs groupes a été effectuée par un test de Kruskal-Wallis et les comparaisons par paires par le test de Wilcoxon, en utilisant une valeur de p ajustée selon la méthode de Holm. La capacité des miARN à discriminer les patients à dyspnée d'origine cardiaque, des patients à dyspnée non cardiaque, a été évaluée en utilisant les courbes ROC et la mesure de l'AUC. Le test chi-2 est utilisé pour mettre en évidence de potentielles associations entre les taux de miARN circulants et le devenir à 1 an.

- Dans l'étude n°4 sur la cohorte NORTHPOLE, nous avons utilisé le logiciel Sigma Plot, version 11.0. Le test de rang de Mann-Whitney a servi à la comparaison de 2 groupes à variables continues. La comparaison de 2 groupes à variables catégorielles a été effectuée soit par un test de Fischer ou par un chi 2. Une analyse des variances Kruskal-Wallis à 1 voie a permis de comparer plusieurs groupes. Des corrélations ont également été effectuées à l'aide du test de Spearman. Les performances pronostiques ont été évaluées en utilisant les courbes ROC et la mesure de l'AUC. Les analyses de survie ont été faites par les courbes Kaplan-Meier et le test de log rank a été utilisé pour la significativité.

- Dans l'étude n°5 sur la cohorte MINOS, les analyses statistiques à 2 voies ont été effectuées à l'aide du logiciel Sigma Plot, version 11.0. Le test de Wilcoxon a permis la comparaison de deux groupes à variables continues pour les données appariées et le test de Mann-Whitney pour les données non-appariées. Des corrélations ont également été faites à l'aide du test de Spearman sur rang.

Axe 2: Intérêt des miARN pour la réparation cardiaque post infarctus

1. Culture cellulaire

Les conditions classiques de culture étaient une atmosphère humide avec 5% de CO₂ et 95% d'O₂, à 37°C, avec une quantité de sérum de veau fœtal (SVF) adéquate pour chaque type cellulaire. Selon les études, des conditions ischémiques ont pu être utilisées: il s'agit d'une atmosphère humide avec 5% de CO₂ et 1% d'O₂, à 37°C, avec 0,1% d'albumine de sérum bovin (BSA) dans le milieu de culture.

1.1. Cellules endothéliales progénitrices humaines (EPC)

Les EPC humaines précoces et tardives ont été obtenues à partir de sang veineux obtenues de volontaires sains. Les cellules mononucléaires du sang périphériques (PBMC) ont été isolées par un gradient de Ficoll (Lymphoprep, MP Biomedicals, France) dans des tubes Leucoseps (Greiner, Bio-One, Wommel, Belgique). Les cellules sont ensuite comptées et traitées en fonction du type d'EPC voulu.

1.1.1. EPC précoces

La méthode d'obtention des EPC précoces a déjà été décrite précédemment¹⁴¹. Brièvement, les PBMCs sont mises en culture en plaques 6 puits à raison de 8.10⁶ cellules par puits, coatées préalablement avec 2,5µg/cm² de fibronectine humaine (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique). Leur milieu de culture est un milieu spécifique pour les cellules endothéliales, milieu EBM (Endothelial cell Basal Medium, Lonza, Verviers, Belgique) supplémenté avec de l'extrait de cerveau bovin, du facteur de croissance endothélial humain (hEGF), de l'hydrocortisone, de la gentamicine et de l'amphotéricine B, et du SVF à 20% final. Après 3 jours, les cellules non adhérentes sont éliminées par lavage et les cellules adhérentes sont conservées encore 24h en culture. Après 24h, ces cellules sont considérées comme des EPC précoces et peuvent être traitées.

Les EPC précoces étaient double-positives pour la lectine endothéliale-spécifique (Ulex, Europaeus) et pour la lipoprotéine acétylée de faible densité marquée à la 1,1'-dioctadecyl-3,3,3'3-tétraméthyllindocarbocyanine perchlorate (DilAcLDL, provenant d'Invitrogen, Life Technologies, Merelbeke, Belgique).

1.1.2. EPC tardives

Les EPC tardives sont obtenues à partir de cellules CD34+ isolées des PBMCs par sélection magnétique positive à l'aide du kit CD34+ MicroBeads Kit (Miltenyi, Utrecht, Hollande). Les cellules CD34+ sont mises en culture en plaques 48 puits recouverts au préalable de 2,5 µg/cm² de fibronectine humaine (Sigma), à raison de 9.10⁵ cellules/cm². Leur milieu de culture est composé d'un milieu spécifique pour cellules endothéliales EBM-2 (Endothelial cell Basal Medium 2, Lonza) supplémenté avec du hEGF, du FGF humain, du facteur de croissance insulino-dépendant-1 (R3-IGF), de l'hydrocortisone, du VEGF, de l'acide ascorbique, de l'héparine, de la gentamicine et de l'amphotéricine B, et du SVF 15% final. Ce milieu est renouvelé régulièrement jusqu'à apparition après 2-3 semaines d'un tapis cellulaire adhérent, de type pavimenteux. Les cellules sont alors amplifiées sur plastique nu, et sont utilisées de passage 5 à 11.

1.1.3. Caractérisation des cellules par cytométrie de flux

Les cellules sont décollées de leur support avec du Cell Dissociation Solution (Sigma), et lavées deux fois dans du PBS (phosphate buffer saline) avec 1% de BSA. Ensuite, 200 000 cellules sont incubées avec la quantité nécessaire de FC blocking reagent (Miltenyi) 30 minutes à 4°C, afin de bloquer tous les sites de fixation aspécifique. Ensuite, différentes combinaisons d'anticorps sont utilisées selon une grille de marquage spécifique: CD133/2-APC (Miltenyi), CD34-PE-Cy7 (Becton Dickinson, Erembodegem, Belgique), CD14-PE, CD45-FITC, CD105-FITC (Immunotools, Friesoythe, Allemagne), CD144-PE (eBioscience, Frankfurt, Allemagne), von Willebrand Factor (vWF)-FITC (ABD Serotec, Düsseldorf, Allemagne) et VEGF-R2-APC (R&D, Oxon Abingdon, UK). Les cellules sont finalement fixées dans du BD FACS Lysing solution (BD) contenant du paraformaldéhyde durant 30 minutes à température ambiante, puis elles sont lavées, resuspendues dans du PBS 1% BSA et conservées à 4°C jusqu'à acquisition au cytomètre de flux (FACS Canto, Becton Dickinson). Les résultats sont analysés à l'aide des logiciels FACS Diva (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) et FlowJo 7.2.4. Des contrôles isotypiques sont inclus dans chaque expérience.

1.1.4. Analyses du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Les cellules sont décollées de leur support avec du Cell Dissociation Solution (Sigma), puis les cellules mortes sont marquées à l'aide du kit LIVE/DEAD fixable near IR (Life Technologies, Gent, Belgique), selon les recommandations du fournisseur. Elles sont ensuite fixées durant la nuit dans de l'éthanol 70%. Le lendemain, les cellules sont incubées 40 minutes dans une solution contenant 50µg/ml d'iodure de propidium, 0,1% de triton, et 50µg/ml de RNase A. Les résultats sont ensuite analysés grâce à un cytomètre FACS Canto (BD, Belgique), en utilisant le logiciel FACS Diva (BD Biosciences) après exclusion des cellules mortes.

1.1.5. Test de formation de microtubules

Le test de formation de microtubules est utilisé pour déterminer la capacité angiogénique des cellules. Brièvement, 25 000 cellules sont ensemencées sur une couche épaisse et solidifiée de MatrigelTM réduit en facteur de croissance (BD Biosciences) et mises en culture en présence de milieu EBM ou EBM-2 pour les EPC précoces et tardives respectivement. La formation de microtubules est observée entre 6 et 24 heures après ensemencement.

1.1.6. Test de prolifération

La prolifération cellulaire est évaluée grâce au kit CyQUANT cell proliferation assay (Invitrogen), selon les instructions du fournisseur. Brièvement, les milieux conditionnés de culture ont été remplacés dans les puits par une solution contenant un tampon de lyse cellulaire mais également un marqueur fluorescent CyQUANT GR (il s'agit d'un marqueur qui libère une forte fluorescence quand il est lié à des acides nucléiques cellulaire). L'intensité de fluorescence est mesurée après 10 minutes par un lecteur de microplaques.

1.1.7. Test de migration

Les expériences de chimioattraction ont été réalisées à l'aide de plaques Costar® TranswellTM Permeable Supports (VWR, Leuven, Belgique), contenant des membranes perméables (pores de 5µm). Durant toutes ces expériences, les EPC précoces étaient maintenues dans du milieu de culture sans antibiotiques et avec 5% de SVF. Les EPC

précoces ont tout d'abord été traitées 6 heures avec 10 μ M d'Adénosine et 10 μ M d'EHNA (erythro-9-(2-Hydroxy-3-nonyl) adenosine hydrochloride, un inhibiteur de l'adénosine déaminase, de chez Sigma, Belgique), ou le control correspondant, avant récolte avec du Cell Dissociation Solution (Sigma). Les cellules sont ensuite incubées 1 heure à 37°C avec 10 μ g/ml d'un anticorps anti-CXCR4 (R&D System, Oxon, UK) ou son isotype control, puis 175 000 cellules sontensemencées dans les chambres supérieures des Transwell™. Les Transwell™ sont ensuite placés dans des plaques 24 puits, contenant un gradient de SDF-1 α (0 à 100ng/ml, de chez Peprotech, Londres, UK) ou du milieu conditionné de fibroblastes. La migration cellulaire à travers la membrane a été mesurée par un marquage de l'ADN suite à une lyse cellulaire, à l'aide de CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit (Life Technologies). La fluorescence est mesurée grâce au lecteur de fluorescence POLARstar OPTIMA (BMG Labtech, Paris, France), avec une excitation à 492nm et une émission à 520 nm.

1.2. Cellules endothéliales de veine de cordon ombilical humaines (HUVEC)

Les HUVEC (ATCC, Molsheim, France) ont été décongelées, puis mises en culture dans du milieu EBM-2 (Lonza) supplémenté avec hEGF, du FGF humain, du R3-IGF, de l'hydrocortisone, du VEGF, de l'acide ascorbique, de la gentamicine et de l'amphotéricine B, ainsi que du SVF 5% final. Le milieu de culture était changé tous les 2 jours, et les cellules étaient trypsinées et remises en culture lorsqu'elles atteignaient 70-80% de confluence. Les cellules sont alors être traitées ou utilisées le lendemain de la trypsination.

1.2.1. Test d'angiogenèse

Des EPC précoces sont tout d'abord transfectées durant 24 heures puis les milieux de culture sont récupérés et les cellules marquées avec une sonde fluorescente (CellTracker Green 5-chloromethylfluorescein diacetate, Life Technologies). A partir de là, 30 000 HUVECs et 5 000 EPC précoces sontensemencées sur une couche épaisse et solidifiée de Matrigel™, réduit en facteur de croissance (BD Biosciences) en plaque 48 puits. Les cellules sont cultivées dans 75% de milieux conditionnés d'EPC précoces (récupérés avant marquage fluorescent) et 25% de milieu de culture EBM-2, supplémenté avec 2% de SVF. La formation de microtubules et l'insertion des EPC précoces dans le réseau sont observés après 24 heures par lumière blanche ou fluorescence.

1.3. Cellules rénales embryonnaires humaines (HEK293)

Les cellules rénales embryonnaires humaines (HEK293, provenant de l'ATCC) ont été décongelées, puis mises en culture dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté de 10% de SVF, 1% de L-glutamine, et 1% de pénicilline/streptomycine (Lonza). Le milieu de culture est changé tous les 2 jours, et lorsque les cellules atteignent 70-80% de confluence, elles sont alors trypsinées et remises en culture. Les cellules peuvent alors être traitées ou utilisées le lendemain de la trypsination.

1.3.1. Test de fixation du miARN sur son gène cible (test luciférase)

Ces cellules ont été ensemencées en plaques 96 puits et co-transfectées par de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen), avec 30nM de miARN mimique spécifique (pre-miR miRNA precursor, provenant d'Ambion) ou son contrôle négatif (pre-miR negative control), et un plasmide reporter contenant le 3'UTR d'un gène (que ce miARN est censé cibler) inséré en aval d'un gène reporter sécrétant la luciférase gaussia et d'un gène traqueur sécrétant de la phosphatase alcaline (pEZX-MT05, GeneCopoeia, Labomics, Nivells, Belgium). Les activités de la luciférase gaussia et de la phosphatase alcaline sont mesurées par luminescence dans les milieux conditionnés 48 heures après transfection, à l'aide du kit secreted-pair dual luminescence (GeneCopoeia). L'activité phosphatase alcaline permet de normaliser l'activité luciférase gaussia.

1.4. Cellules neuroblastiques humaines (SH-SY5Y)

La lignée de cellules neuroblastiques humaines (SH-SY5Y, provenant de l'ATCC) ont été mises en culture dans du milieu DMEM, avec 10% de sérum de veau fœtal (Lonza), supplémenté avec 2mM de L-glutamine, 1% d'acides aminés non essentiels, 1% de pyruvate de sodium et 1% de pénicilline/streptomycine. Ces cellules doivent ensuite être différenciées en neurones. Pour cela, elles sont ensemencées dans des plaques coatées au collagène (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Allemagne), puis traitées le lendemain durant 5 jours avec 10 μ M d'acide rétinolique all trans (Sigma). Elles sont ensuite lavées puis traitées durant 7 jours avec 50ng/ml de BDNF humain (human Brain Derived Neurotrophic Factor, Sigma) dans du milieu privé de sérum. Les cellules sont à nouveau lavées et peuvent être traitées ou utilisées dans des conditions classiques de culture.

2. Transfection d'inhibiteurs ou de mimiques de miARN

Les transfections d'inhibiteurs ou de mimiques de miARN ont été réalisées directement dans les plaques 6 puits, à l'aide d'INTERFERin reagent (Polyplus Transfection, Illkirch, France), sans privation de sérum, selon les recommandations du fournisseur. Les inhibiteurs de miARN, anti-miR miRNA inhibitors, et les mimiques, pre-miR miRNA precursors proviennent d'Ambion. L'efficacité de transfection a été vérifiée à l'aide d'antimiRs et de prémiRs couplé à un marqueur fluorescent, FAM dye-coupled anti-miR negative controls et FAM dye-coupled pre-miR negative controls (Ambion). Des contrôles négatifs, anti-miR negative controls et pre-miR negative controls ont été utilisés comme contrôles de transfection (Ambion).

3. Mesures d'expression des miARN

3.1. Extraction d'ARN total contenant les miARN

3.1.1. *A partir de surnageants de culture*

L'ARN total a été extrait des milieux conditionnés à l'aide du kit mirVANA PARIS (Ambion) sans enrichissement en petits ARN, selon les instructions du fournisseur. Un volume initial de 400µl a été utilisé, auquel a été ajouté un miARN synthétique (Qiagen) le cel-miR-39, afin de servir comme contrôle d'efficacité d'extraction. Sur chaque échantillon a été effectué un traitement DNase I (Qiagen) afin de supprimer toute contamination potentielle en ADN génomique. Les ARN totaux ont été élués dans un volume final de 50µl. Il est impossible de doser les miARN ou l'ARN total présent dans ces éluats (quantité trop faible dans les surnageants de culture).

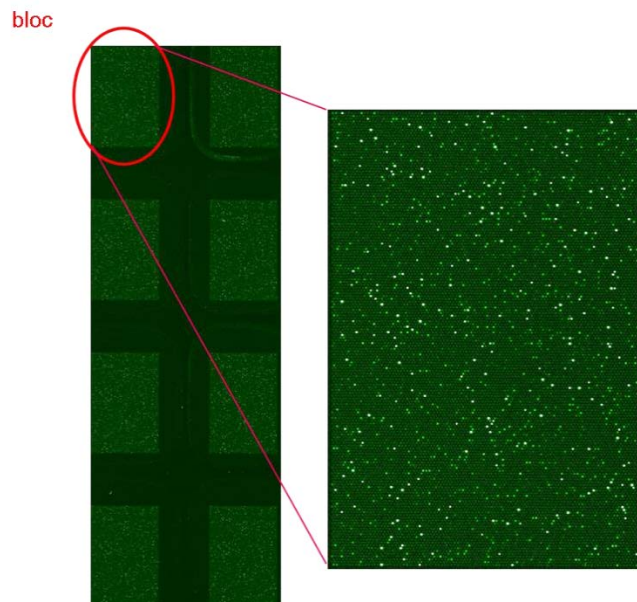
3.1.2. *A partir d'échantillons cellulaires*

L'ARN total a été extrait des cellules à l'aide du kit miRVana isolation kit (Ambion) sans enrichissement en petits ARN, selon les instructions du fournisseur. Sur chaque échantillon a été effectué un traitement DNase I (Qiagen) afin de supprimer toute contamination

potentielle en ADN génomique. Les ARN totaux ont été élués dans un volume final de 50 μ l. Les ARN totaux ont ensuite été quantifiés avec un Nanodrop (Nanodrop products), et leur qualité a été vérifiée à l'aide du Bio Analyser (Agilent Technologies, Santa-Clara, USA).

3.2. Puces à miARN

L'ARN total (100 ng) est d'abord déphosphorylé et marqué à l'extrémité 3' avec un résidu cytosine couplé à la cyanine 3, à l'aide du kit miRNA Complete Labeling and hybridization (Agilent Technologies). L'ARN marqué est ensuite hybridé sur une biopuce miRNA Human Microarray Release 12.0 (Agilent Technologies) contenant 695 miARN connus, 20 heures à 55°C, selon les recommandations du fournisseur. Une biopuce contenant 8 blocs, 4 répliqués ont été hybridés pour chaque échantillon (figure 18).



*Figure 18: Scan d'une puce à miARN
(chaque spot correspond à une sonde sur laquelle un miARN s'est fixé).*

La lame est ensuite scannée à l'aide du scanner Genepix 4000B (Molecular Devices, Sunnyvale, USA), voir figure 18 et les données brutes sont acquises par le logiciel Genepix pro 6.0 (Molecular Devices). Les spots ayant un rapport signal/bruit (rapport de fluorescence du miARN sur le bruit de fond) inférieur à trois sont supprimés. Le bruit de fond a été supprimé de la moyenne des répliqués d'un même spot, et ces résultats ont été normalisés selon la méthode des quantiles (fonction « normalizeQuantiles » du pack Bioconductor *limma* R). Seuls les miARN présents parmi au moins 3 des 4 répliqués ont été retenus pour les analyses. Les données ont été transformées en échelle logarithmique, et centrées sur la

moyenne, pour chaque image en utilisant le logiciel Cluster 3.0. Un regroupement hiérarchique a été effectué avec le logiciel TreeView. Les miARN différentiellement exprimés entre types cellulaires ont été identifiés en utilisant le programme SAM (significance analyses of microarrays). Toutes ces données sont disponibles dans la base de données publiques Gene Expression Omnibus sous le numéro d'accès GSE27874. Trois bases de données accessibles librement sur internet ont été utilisées pour identifier les potentielles cibles de la famille du miR-16: microRNA.org, TargetScanHuman 5.1 et Pictar. Seules les cibles communes à ces trois bases de données ont été conservées.

3.3. RT et PCR quantitative en temps réel de miARN

3.3.1. SYBR Green

- A partir d'échantillons cellulaires

Entre 500ng et 1µg d'ARN total ont été rétrotranscrits à l'aide du kit miScript reverse transcription (Qiagen), contenant des amorces à séquences aléatoires (pour les ARN messagers), des amorces oligo-dT portant une séquence universelle en 5' (pour les miARN et autres ARN non codants), et la transcriptase inverse. La PCR quantitative en temps réel a été réalisée à partir des ADNc obtenus des milieux de culture, dilués 10 fois, dans un appareil CFX96 (Biorad), en utilisant le kit miScript SYBR-green PCR (Qiagen), ainsi que les amorces miRNA-specific miScript primer (Qiagen). Les conditions de PCR étaient les suivantes: 15 minutes à 95°C, puis 15 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 30 secondes à 70°C, ces trois dernières étapes étant répétées 40 fois. Le point de fusion a été déterminé grâce à 80 cycles de 5 secondes avec une augmentation de 0,5°C de 55°C à 95°C. Le snARN U6 (small nucleolar) a été utilisé pour normaliser les miARN dans ces échantillons. Les valeurs d'expression ont été calculées par la méthode du delta delta CT avec le logiciel Biorad CFX Manager.

- A partir de surnageants de culture

Il est impossible de quantifier la quantité d'ARN totale extraite de ces surnageants de culture. Donc 15µl de ces ARN totaux ont été utilisés et rétro-transcrit à l'aide du kit miScript reverse

transcription (Qiagen). La PCR quantitative en temps réel a été réalisée à partir des ADNc obtenus, dilués 10 fois, dans un appareil CFX96 (Biorad), en utilisant le kit miScript SYBR-green PCR (Qiagen), ainsi que les amorces miRNA-specific miScript (Qiagen). Les conditions de PCR sont similaires aux PCR de miARN à partir d'échantillons cellulaires, à l'exception d'un primer spécifique pour chaque miARN synthétiques. Les résultats d'expression ont donc été calculé grâce à eux, utilisés comme normalisateur, par la formule: $2^{-(Ct \text{ du cel-miR39}) - Ct \text{ du miARN cible}}$. Les valeurs obtenues ont été transformées en logarithme.

3.3.2. *Taqman*

Seuls des échantillons cellulaires ont été utilisés pour des PCR quantitatives en temps réel utilisant la technologie Taqman. Entre 500 ng et 1 µg d'ARN total ont été rétrotranscrits à l'aide du kit Taqman® MicroRNA RT (Applied Biosystems, Life Technologies, Lennik, Belgique), contenant une amorce tige/boucle spécifique à un miARN mature et qui se fixe à l'extrémité 3' de ce dernier pour augmenter sa taille, un inhibiteur de RNase, une rétro Transcriptase Multiscribe™, des dNTPs et un tampon de RT.

Le miARN rétrotranscrit est ensuite amplifié par PCR quantitative en utilisant la méthode Taqman dans un appareil CFX96 (Biorad) à l'aide du kit Taqman® MicroRNA Assays (Applied Biosystems), contenant du Taqman® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG (Applied Biosystem) ainsi qu'une sonde Taqman spécifique du miARN étudié. Les conditions de PCR étaient les suivantes: 10 minutes à 95°C, puis 15 secondes à 95°C et 60 secondes à 60°C, ces deux dernières étapes étant répétées 40 fois. Le snARN U24 a été utilisé pour normaliser les miARN. Les valeurs d'expression ont été calculées par la méthode du delta delta CT avec le logiciel Biorad CFX Manager. Cette technique n'a été utilisée que dans l'étude n°1 de l'axe 2.

4. Mesures d'expression des gènes

4.1. Extraction d'ARN total

L'ARN total des cellules a été extrait à l'aide du TriReagent® et du RNeasy mini kit (Qiagen) selon les instructions du fournisseur. Une éventuelle contamination avec de l'ADN génomique est écartée par un traitement à la DNase I (Qiagen). L'ARNm a ensuite été

quantifié avec un Nanodrop (Nanodrop products), et sa qualité a été vérifiée à l'aide du Bio Analyser (Agilent Technologies).

4.2. Puces à ARNm

L'ARNm est amplifié avec le kit Amino Allyl Message Amp® (Ambion). A partir de là, l'ADNc obtenu est marqué avec de la cyanine (Cy3 ou Cy5, Amersham, Buckinghamshire, UK) et hybridé sur des lames de microarrays contenant 25 000 gènes humains. Les lames de microarrays sont ensuite scannées avec un scanner Axon 3000B (Molecular Devices), et les données brutes sont acquises grâce au logiciel Genepix pro 6.0 (Molecular Devices). Les données brutes sont ensuite analysées puis les différences d'expression ont été comparées à l'aide du logiciel SAM (significance analyses of microarrays). Des cartes d'expression ont été créées à l'aide des logiciels TreeView et Cluster 3.0. Toutes ces données sont disponibles dans la base de données publiques Gene Expression Omnibus sous le numéro d'accès GSE26744.

La bases de données DAVID (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery) a été utilisée pour identifier les termes GO (gene ontology) enrichi par les cibles potentielles de la famille du miR-16.

4.3. RT et PCR quantitative en temps réel d'ARN messagers

La rétrotranscription a été réalisée à partir de 500ng d'ARN total, en utilisant de la transcriptase inverse Superscript II (Invitrogen), ainsi que du tampon de RT, des dNTPs, des hexamères aléatoires et du dithiothreitol (Invitrogen).

Une PCR quantitative en temps réel a été réalisée à partir des ADNc originaires des cellules, dilués 10 fois, dans un appareil CFX96 (Biorad) en utilisant le IQ™ SYBR® Green Supermix (Biorad). Les amorces ont été créées en utilisant le logiciel Beacon Designer (Premier Biosoft, Palo Alto, USA). Les conditions de PCR étaient les suivantes: 3 minutes à 95°C, puis 30 secondes à 95°C et 1 minute d'hybridation/élongation, ces deux dernières étapes étant répétées 40 fois. Une courbe de fusion a été également été réalisée afin de déterminer le point de fusion grâce à 80 cycles de 5 secondes avec une augmentation de 0,5°C de 55°C à 95°C. Une température optimale d'hybridation/élongation ainsi qu'une efficacité de PCR ont été caractérisés pour chaque paire d'amorces (tableau 6). Les résultats

ont été normalisés par la β -actine, et les valeurs d'expression ont été calculées par la méthode du delta delta CT (Cycle threshold) avec le logiciel Biorad CFX Manager.

Tableau 6: Caractéristiques des amorces utilisées en RT-qPCR.

Gène	Séquence sens (5'→3')	Séquence anti sens (5'→3')	Température d'hybridation/élongation
A1	GACCTACTTCCACACCTG	TCACCACCATCTTGTACC	58°C
A2A	TCTTCAGTCTCCTGGCCATC	GGGACCACATCCTCAAAGAG	64°C
A2B	TCCATCTTCAGCCTTCTG	GCACTGTCTTTACTGTTC	55°C
A3	TCATCTGCGTGGTCAAGC	CTGTAGAAGTGGATTGTGATGC	62°C
CCND1	GCAGAGGATGTTTATAAGG	AAAGGCAGAAGGTTTGTG	54°C
CCNE1	GTGTGGGAGCCAGCCTTG	ATCATCTTCTTTGTCAGGTGTGG	54°C
CDK6	AATTGAGAAGTTTGTAAACAGATAT	TTTGGCTGGGTAAATGT	54°C
CNR1	GAGTTAAGTCTATCTGGTA	TAATCAACAGGACAGTAA	54°C
CXCR4	TATCCTGCCTGGTATTGTC	GGAAATCATCAAGCAAGGG	50°C
GABBR1	AAGAAGATTGGCTACTATG	GAAGTGAAGACGGAGATAA	58°C
SERBP1	AAGGAATAAGACGAGTTG	TCAATAATCGGTCTATCAA	58°C
SNRK	CTGTATTATAGCCTTATTAGTT	GCACAATCATTCACTTAT	54°C
SYT-5	AGCTTCCTCTGACGGTGA	TGGAAAGTTGTCGTGATTG	58°C
UBE2V1	GCATGAAGATACTTGTAAGC	TTGTTCCAGTTGTCAGATT	58°C
USP 25	GCTGTAGAAGATATGAGA	TGGAATATGAAGGTAAGT	58°C
B-actine	AGAAAATCTGGCACCACACC	GGGGTGTGAAGGTCTCAAA	60°C

CCND1: cycline D1 ; CCNE1: cycline E1 ; CDK6: kinase dépendante des cyclines 6 ;

CNR1: Cannabinoid Receptor 1; GABBR1: gamma-aminobutyric acid type B receptor 1 ;

SERBP1: serpine1 mRNA binding protein 1 ; SNRK: SNF related kinase ; SYT-5:

Synaptogamin-5 ; UBE2V1: ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 ; USP25: ubiquitin specific peptidase 25.

5. Mesures d'expression des protéines

5.1. Western Blot

Les protéines ont été extraites sur glace à l'aide de cell lysis buffer (Cell Signaling, Lieden, Hollande), supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Roche, Mannheim, Allemagne) et 1mmol/L de PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride, Sigma). Un total de 20 μ g de protéines/échantillon a été déposé sur des gels polyacrylamide 4-8% et transféré sur des membranes Immobilon-P (Millipore, Brussels, Belgique). L'anticorps primaire a été ajouté sur les membranes, et a été révélé grâce à des immunoglobulines G de singe, anti souris, couplés à de l'HRP (Peroxydase de raifort, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) et ECL (SuperSignal West Dura extension duration substrate ; ThermoFischer Scientific,

Erembodegem, Belgique). Les anticorps primaires ont été obtenus chez Cell Signaling: anticorps monoclonal de souris anti-humain CCND1 (clone DSC6), CCNE1 (clone HE12), CDK6 (clone DCS83). Un anticorps monoclonal de souris anti-humain GAPDH (clone 9484; Abcam, Cambridge, UK) a été utilisé comme control.

5.2. ELISA

Toutes les protéines étudiées ont été dosées dans des milieux conditionnés lors de ces travaux à l'aide de kits ELISA provenant de chez R&D System. Ils sont ainsi répertoriés dans le tableau 7 ci-dessous.

Tableau 7: Kits ELISA utilisés pour mesurer les concentrations de certaines protéines dans les milieux conditionnés.

Protéine mesurée	Nom du kit	Limite de détection
SDF1- α	Human SDF1- α Quantikine® DSA00 ELISA	18 pg/ml
VEGF	Human VEGF Quantikine® DVE00 ELISA	5pg/ml
TSP-1	Human TSP-1 Quantikine® DTSP100 ELISA	0,355ng/ml
IL-8	Human CXCL8/IL-8 DuoSet® DY208 ELISA	3,5pg/ml

6. Analyses statistiques

Les variables quantitatives sont exprimées en moyenne +/- déviation standard. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Sigma Plot, version 11.0. Une valeur de $p < 0.05$ était considérée comme statistiquement significative. La normalité de la distribution des variables (distribution gaussienne) a d'abord été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk.

La comparaison de deux groupes non appariés à variables continues a été effectuée soit par un test t de Student pour les données gaussiennes, soit par un test Mann-Whitney pour les données non gaussiennes.

La comparaison de deux groupes appariés à variables continues a été effectuée soit par un test t de Student apparié pour les données gaussiennes, soit par le test de Wilcoxon rank sum pour les données non gaussiennes.

La comparaison de plusieurs groupes a été effectuée soit par un test ANOVA, pour les données gaussiennes, ou par un test de Kruskal-Wallis pour les données non gaussiennes. En

cas de significativité, des tests post-hoc tels que Dunn ou Holm-Sidak ont été effectués pour isoler les groupes différents des autres.

Les comparaisons entre plusieurs groupes à deux paramètres ont été effectuées par un test ANOVA bilatéral.

RESULTATS

Axe 1: Intérêt des miARN comme biomarqueurs des MCV aigües

Les études cliniques décrites ci-après comprennent toutes des mesures d'expression des miARN chez des patients ainsi que des analyses statistiques afin de déterminer leur capacité diagnostique et/ou pronostique après IM.

Etude n°1: Détermination de la capacité diagnostique des miARN circulants chez des patients arrivés aux urgences avec une douleur thoracique (cohorte APACE)

Les miARN circulants ont montré de nombreuses fois leur capacité diagnostique potentielle pour l'IM^{10, 74} ainsi que pour d'autres MCV aigües¹¹⁶. Cependant ces études étaient souvent faites sur des cohortes de petite taille, provenant d'un seul centre, non prospectives, et contenant des patients avec un type de maladie bien défini et des contrôles sélectionnés aléatoirement. Il serait intéressant de tester la capacité diagnostique des miARN circulants sur une cohorte de grande taille, qui serait multinationale, prospective et composée de patients s'étant présentés aux urgences pour une douleur à la poitrine. Ainsi, cette cohorte contiendrait à la fois des patients diagnostiqués pour une MCV particulière mais également les contrôles correspondants.

Dans cette 1^{ère} étude, nous avons évalué la capacité diagnostique de plusieurs miARN chez des patients arrivés aux urgences pour une douleur thoracique:

- Les miARN enrichis dans les cardiomyocytes: miR-133a/-208b/-499.
- Le miR-223 enrichi dans les plaquettes, et le miR-320a enrichi dans les plaquettes activées.
- Le miR-451 enrichi dans les globules rouges.

Pour se faire, nous avons utilisé une étude multicentrique, prospective et internationale comprenant 1155 patients arrivés aux urgences avec une douleur à la poitrine. Nous avons mesuré l'expression des miARN circulants cités précédemment. Les patients ont été divisés en 5 groupes selon leur diagnostic final: 19% des patients avaient un IM aigu (dont 20% de STEMI et 80% de NSTEMI), 12% des patients souffraient d'angine de poitrine instable, 14%

des patients d'une maladie cardiaque mais non-coronaire, 48% de douleurs à la poitrine non cardiaques, et 6% de symptômes d'origine inconnue. Les patients ont été suivis durant 2 ans.

Nous avons obtenu comme résultats:

- Les miR-208b/-499/-320 sont surexprimés dans le plasma des patients avec IM aigu comparés aux patients avec les autres diagnostics finaux. Le miR-451 est stable entre ces 2 groupes. Chez les patients avec IM aigu, les taux de miR-133a/-208b/-499/-451 sont supérieurs chez les STEMI comparés aux NSTEMI. En général, les miR-223/-320a/-451 sont plus exprimés que les miARN enrichis dans le cœur (miR-133a/-208b/-499).

- Le miR-208b a la plus grande capacité diagnostique pour l'IM avec une AUC de 0,76, suivi du miR-499 avec une AUC de 0,65. Cette AUC était de 0,70 pour le miR-208b chez les patients arrivant aux urgences dans les 3 heures suivant le début de douleur thoracique (seul miARN statistiquement significatif pour ces patients). Cependant il ne surpasse pas la cTnT ni la hs-cTnT, avec des AUC de 0,84 et 0,94 respectivement. Aucun des miARN mesurés n'a de valeur additive diagnostique, quand il est combiné à la cTnT ou la hs-cTnT.

- Durant les 2 ans de suivi des patients, 9% des patients sont décédés. Le taux de miR-208b est supérieur chez les patients décédés comparés aux survivants. Aucun autre miARN n'est statistiquement significatif entre les décédés et les survivants. Seul le miR-208b a une capacité pronostique significative pour la mortalité à court terme (30 jours suivant leur arrivée aux urgences) avec une AUC de 0,67. La survie des patients avec douleur à la poitrine est meilleure chez les patients ayant peu de miR-208b circulants. Aucun des autres miARN testés n'est capable de prédire la mortalité à long terme (730 jours après arrivée aux urgences) et aucun des miARN ne peut prédire la survenue d'un futur IM à court ou long terme.

Aucun des miARN mesurés et testés dans cette étude n'a de valeur diagnostique ou pronostique supérieure aux marqueurs utilisés en clinique dans une grande cohorte de patients arrivant aux urgences avec suspicion d'IM.

Diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs in patients with acute chest pain

Y. Devaux^{1,*}, M. Mueller^{2,*}, P. Haaf^{2,*}, E. Goretti¹, R. Twerenbold², J. Zangrando¹, M. Vausort¹, T. Reichlin², K. Wildi², B. Moehring², D. R. Wagner^{1,3} & C. Mueller²

From the¹Laboratory of Cardiovascular Research, Centre de Recherche Public de la Santé, Luxembourg, Luxembourg; ²Department of Cardiology, University Hospital Basel, Basel, Switzerland; and ³Department of Cardiology, Centre Hospitalier, Luxembourg, Luxembourg; for The GREAT network

Abstract. Devaux Y, Mueller M, Haaf P, Goretti E, Twerenbold R, Zangrando J, Vausort M, Reichlin T, Wildi K, Moehring B, Wagner DR, Mueller C (Centre de Recherche Public de la Santé, Luxembourg; University Hospital Basel, Basel; Centre Hospitalier, Luxembourg). Diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs in patients with acute chest pain. *J Intern Med* 2013; doi: 10.1111/joim.12183.

Objectives. To address the diagnostic value of circulating microRNAs (miRNAs) in patients presenting with acute chest pain.

Design. In a prospective, international, multicentre study, six miRNAs (miR-133a, miR-208b, miR-223, miR-320a, miR-451 and miR-499) were simultaneously measured in a blinded fashion in 1155 unselected patients presenting with acute chest pain to the emergency department. The final diagnosis was adjudicated by two independent cardiologists. The clinical follow-up period was 2 years.

Results. Acute myocardial infarction (AMI) was the adjudicated final diagnosis in 224 patients (19%). Levels of miR-208b, miR-499 and miR-320a were

significantly higher in patients with AMI compared to those with other final diagnoses. MiR-208b provided the highest diagnostic accuracy for AMI (area under the receiver operating characteristic curve 0.76, 95% confidence interval 0.72–0.80). This diagnostic value was lower than that of the fourth-generation cardiac troponin T (cTnT; 0.84) or the high-sensitivity cTnT (hs-cTnT; 0.94; both $P < 0.001$ for comparison). None of the six miRNAs provided added diagnostic value when combined with cTnT or hs-cTnT (ns for the comparison of combinations vs. cTnT or hs-cTnT alone). During follow-up, 102 (9%) patients died. Levels of MiR-208b were higher in patients who died within 30 days, but the prognostic accuracy was low to moderate. None of the miRNAs predicted long-term mortality.

Conclusion. The miRNAs investigated in this study do not seem to provide incremental diagnostic or prognostic value in patients presenting with suspected AMI.

Keywords: acute myocardial infarction, biomarker, chest pain, diagnosis, microRNAs, prognosis.

Introduction

Acute myocardial infarction (AMI) is a major cause of death and disability worldwide. Its rapid and accurate diagnosis has been improved markedly by the recently introduced more sensitive cardiac troponin (cTn) assays [1, 2]. Nevertheless, even these sensitive cTn assays lack adequate sensitivity during the immediate phase after the onset of AMI. Serial testing of cTn is still indispensable in the majority of patients with acute chest pain [3] not least because of the increase in 'troponin-

positive' results observed in patients with noncardiac causes of chest pain (NCCP) [4].

Recently, based on the presence of stable cardiomyocyte-enriched micro-RNAs (miRNAs) circulating in human peripheral blood, it has been suggested that certain miRNAs may serve as novel diagnostic markers of AMI [5–10]. Since the discovery of miRNAs in *Caenorhabditis elegans* in 1993 [11], more than 2000 human miRNAs have been cloned and sequenced. miRNAs are evolutionarily conserved, short, noncoding (approximately 22 nucleotides) RNA molecules involved in post-transcriptional gene regulation [5]. It is currently estimated that they control the expression of

*These authors contributed equally to this work and should both be considered first authors.

up to 50% of protein-coding genes [12, 13]. Although the complex biological functions of miRNAs with regard to their regulation of messenger RNA are incompletely understood [14, 15], they are known to be present in a tissue- and cell-specific manner [16] and are considered to regulate gene expression [14] mostly via messenger RNA destabilization resulting in endogenous gene silencing [15, 17]. miRNAs in plasma or serum are resistant to RNase digestion and remain stable in the RNase-rich environment of blood [18] as well as under extreme conditions such as during freeze–thaw cycles [19]. They are crucial for myriad cellular processes and are a prerequisite for normal cardiac function [20]. The release of miRNAs is thought to be not only a consequence of cell death and plasma membrane disruption but also an active response to ischaemia [21, 22]; miRNAs have been suggested as possible biomarkers of clinical value in the early diagnosis of AMI.

The present aim was to evaluate the diagnostic and prognostic value of cardiomyocyte-enriched miR-133a, miR-208b and miR-499, platelet-enriched miR-223, activated platelet-enriched miR-320a and red blood cell-enriched miR-451 in patients presenting with acute chest pain and suspected AMI in a large, prospective, observational, international, multicentre study. The rationale behind the choice of these miRNAs is as follows. Clinical studies have demonstrated markedly higher levels of miRNAs in patients with AMI, compared with healthy subjects, and in particular miR-133a [6, 9], miR-208b [7, 23, 24] and miR-499 [7–9]. Furthermore, platelet aggregation and activation are early events preceding thrombus formation resulting in AMI, and miR-223 and miR-320a may provide useful insights into these processes. Finally, we studied miR-451 which is abundant in red blood cells and reflects haemolysis.

Methods

Study design and population

Advantageous Predictors of Acute Coronary Sndrome Evaluation (APACE) is an ongoing prospective, international, multicentre study coordinated and designed by the University Hospital Basel (ClinicalTrials.gov number, NCT00470587). From April 2006 to June 2009, 1267 unselected patients presenting to the emergency department (ED) with symptoms suggestive of AMI with an onset or peak within the previous 12 h were recruited [1]. To attain a high rate of comparability of the results,

patients were included in the analysis if simultaneous measurements of all six miRNAs, as described below, were performed at presentation. Due to interindividual difficulties in collecting blood samples and varying degrees of willingness amongst patients to undergo repetitive blood sampling, measurements of all six miRNAs were achieved simultaneously in 1155 patients; this group constitutes the study population. Patients with terminal kidney failure requiring dialysis were excluded. Also patients were excluded if the final diagnosis remained unclear after adjudication in combination with at least one measurement for which high-sensitivity cardiac troponin T (hs-cTnT) was $\geq 14 \text{ ng L}^{-1}$ during serial sampling ($n = 38$). The study was carried out according to the principles of the Declaration of Helsinki and approved by the local ethics committees at each institution. Written informed consent was obtained from all patients. The authors designed the study, collected and analysed the data, wrote the paper and are responsible for the integrity of the data and analyses and the decision to publish. The sponsors had no role in conducting the study or analysing the data.

Routine clinical assessment

The initial clinical assessment included clinical history, physical examination, 12-lead electrocardiography (ECG), continuous ECG monitoring, pulse oximetry, standard blood tests and chest radiography.

Measurements of cTn levels were performed at presentation and 6–9 h later or as long as clinically indicated [3]. Timing of measurements and treatment of patients were left to the discretion of the attending physician who was unaware of the centrally measured miRNA and hs-cTnT values and only aware of the locally available conventional cTn levels.

Adjudication of final diagnosis

Adjudication of the final diagnosis was performed centrally in the core laboratory (University Hospital Basel) for all patients twice: once according to conventional cTn levels used onsite (this method was used in the initial analyses to examine the performance of hs-cTn assays [25–27]) and once including levels of Roche hs-cTnT (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) to also take advantage of the higher sensitivity and higher overall diagnostic accuracy offered by hs-cTn assays [4] (this allows

the additional detection of small AMIs that were missed by the adjudication based on conventional cTn assays). Two independent cardiologists reviewed all available medical records – patient history, physical examination, results of laboratory tests (including hs-cTnT levels), radiology, ECG, echocardiography, cardiac exercise test, lesion severity and morphology in coronary angiography – for each patient from the time of ED presentation to 90 days of follow-up. In cases of disagreement about the diagnosis, cases were reviewed and adjudicated in conjunction with a third cardiologist.

AMI was defined and cTn levels interpreted as recommended in current guidelines [28, 29]. In brief, AMI was diagnosed if there was evidence of myocardial necrosis in association with a clinical setting consistent with myocardial ischaemia. Myocardial necrosis was diagnosed by at least one cTn value above the 99th percentile (or for the conventional cTn assays above the 10% imprecision value if not fulfilled at the 99th percentile) together with a significant rise and/or fall [25, 29]. The criteria used to define rise and/or fall in conventional cTn and hs-cTnT are described in detail in the online Supplementary Material. Unstable angina was diagnosed in patients with normal cTn levels and typical angina at rest, those with a deterioration of a previously stable angina, and in cases of positive cardiac exercise testing or cardiac catheterization with coronary arteries with $\geq 70\%$ stenosis. As we adjudicated the cause of the presentation to the ED (i.e. acute chest pain) and not the cause of increases in hs-cTnT, ‘stable coronary artery disease (CAD)’ was not considered a potential diagnosis; a patient with ‘stable CAD’ who deteriorated (acute chest pain) would therefore be classified as having ‘unstable angina’ or another suitable final diagnosis as a result of the adjudication process. The category of cardiac but noncoronary causes (CNCD) included myocarditis, pericarditis, heart failure, cardiac dysrhythmia and hypertensive emergency. A further category, noncardiac chest pain (NCCP), included musculoskeletal pain and gastro-oesophageal disorders. If all diagnostic procedures and tests were inconclusive then symptoms were classified as ‘of unknown origin’.

Follow-up and clinical end-points

Patients were contacted 3, 12 and 24 months after hospital discharge by telephone or by post/by email. All patients received long-term follow-up irrespective of AMI versus non-AMI status at initial

presentation. Information regarding death was also obtained from the national registry on mortality. The primary end-point was all-cause mortality and AMI rate during follow-up.

Determination of plasma miRNAs

Circulating levels of six miRNAs (miR-133a, miR-208b, miR-223, miR-320a, miR-451 and miR-499) were measured at presentation. Total RNA was extracted from plasma samples using the mirVana PARIS kit (Ambion, Applied Biosystem, Lennik, Belgium) without enrichment for small RNAs. A mixture of three supplemented synthetic *C. elegans* miRNAs (Qiagen, Venlo, the Netherlands), which lacked sequence homology to human miRNAs, was added to plasma samples for correction of extraction efficiency. Potential genomic DNA contamination was eliminated by use of DNase (Qiagen). Reverse transcription of RNA was performed with the miScript reverse transcription kit (Qiagen). The resulting cDNA was diluted 10-fold before quantitative polymerase chain reaction (PCR) was performed with the miScript SYBR-green PCR kit (Qiagen). miRNA-specific miScript primer sets were obtained from Qiagen. Expression values were normalized using the mean threshold cycle (Ct) obtained from the spiked-in controls [calculation formula: $2^{\text{exp}(\text{mean Ct spiked-in controls} - \text{Ct target miRNA})}$] and log-transformed. The detection limit of the PCR assay was defined as log transformation of the lowest detected miRNA level, divided by 10 (see Devaux *et al.* [7] for further details).

Biochemical analysis

Blood samples for determination of cardiac troponin T (cTnT, fourth-generation assay Roche), and hs-cTnT were collected at presentation to the ED and serially thereafter at 1, 2, 3 and 6 h. Serial sampling was discontinued when the diagnosis of AMI was certain and the patient needed to be transferred to the catheter laboratory for treatment. After centrifugation, samples were frozen at -80°C until assayed in a blinded fashion in a dedicated core laboratory. hs-cTnT was assayed in serum in a blinded fashion using the Modular[®] Analytics E170 analyser (Roche Diagnostics). It has been determined that the limit of blank and limit of detection of hs-cTnT are 3 and 5 ng L^{-1} , respectively, with an imprecision corresponding to the 10% coefficient of variation at 13 ng L^{-1} and the 99th percentile of a healthy reference population at

14 ng L⁻¹ [26]. cTnT was measured using the Elecsys 2010 analyser with a limit of detection of 0.01 µg L⁻¹, a 99th percentile cut-off value of <0.01 µg L⁻¹ and a coefficient of variation of <10% at 0.035 µg L⁻¹.

Statistical analysis

Categorical variables are presented as number and percentage, and continuous variables as median and interquartile range (IQR). Comparisons between groups were made using the chi-squared method, Mann–Whitney *U*-test or Kruskal–Wallis test. Receiver operating characteristic (ROC) curves were constructed to assess the sensitivity and specificity of miRNAs, hs-cTnT and cTnT for both diagnostic and prognostic purposes, and compared as recommended by DeLong *et al.* [30]. Likelihood ratios were used for comparisons of nested models [31], and a stepwise forward approach was used for the calculation of multivariate Cox proportional hazard regression analysis. Kaplan–Meier survival analysis was performed with log-rank values to assess statistical significance. We used integrated discrimination improvement (IDI) analysis, which is not dependent on certain risk groups because probability differences are used instead of categories. The IDI can be calculated as the difference between improvement in average sensitivity and changes in the average of ‘one minus specificity’ [32]. All hypothesis testing was two-tailed, and a *P*-value of <0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using SPSS for WINDOWS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and MEDCALC 9.6.4.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

Results

Characteristics of patients

Baseline characteristics of the 1155 patients are shown in Table 1. The adjudicated final diagnosis was AMI in 19% of patients [*n* = 224; 20% with ST-segment elevation MI (STEMI), 80% non-ST-segment elevation MI (NSTEMI)], unstable angina in 12%, CNCD in 14%, NCCP in 48% and symptoms of unknown origin in 6%.

Levels of miRNAs according to final diagnosis

Of the six miRNAs studied, miR-208b (*P* < 0.001), miR-499 (*P* < 0.001) and miR-320a (*P* = 0.031) levels were significantly higher in patients with AMI than in those without AMI (Fig. 1a). Levels of

miR-451 were comparable between groups, suggesting that haemolysis of plasma samples did not represent a bias in the study. In patients with AMI, levels of miR-133a, miR-208b, miR-499 and miR-451 were significantly higher in those with STEMI compared to NSTEMI (Fig. 1b). In general, the levels of miR-223, miR-320a and miR-451 were higher than the levels of cardiomyocyte-enriched miR-133a, miR-208b and miR-499. Also, there were large overlaps of miRNAs both between patients with and without AMI, and between the various subgroups studied (Fig. 1a+b; Figure S1a+b).

miRNAs for the early diagnosis of AMI

The diagnostic accuracy of miRNA levels at presentation for the diagnosis of AMI was highest for miR-208b [area under the ROC curve (AUC) 0.76, 95% confidence interval (CI) of 0.72–0.80] and miR-499 (AUC 0.65, 95% CI 0.61–0.70) (Fig. 2a). ROC curves yielded an optimal cut-off value of –11.1 for miR-208b with a sensitivity of 64.7% and a specificity of 80.2%, and an optimal cut-off value of –10.9 for miR-499 with a sensitivity of 35.7% and a specificity of 90.3%. In very ‘early presenters’ (presentation to the ED within 3 h of the onset of chest pain; *n* = 409), the AUC of miR-208b was 0.70 (95% CI 0.62–0.78); AUC values did not reach statistical significance for the other miRNAs studied in this analysis (Fig. 2d).

The diagnostic accuracy of cTnT4 and hs-cTnT for AMI at presentation was superior to all miRNAs, with AUC values of 0.84 and 0.94, respectively (both *P* < 0.001). Also, neither miR-208b nor miR-499 (the two miRNAs with highest AUC values for the detection of AMI) added incremental diagnostic benefit on top of cTnT4 or hs-cTnT (Fig. 2b,c). Similar results were obtained in a multivariate binary regression analysis: none of the miRNAs that were significant in univariate analysis (miR-133a, miR-208b and miR-499) remained significant in multivariate analysis with hs-cTnT or cTnT4 (Table 2).

Furthermore, the IDI calculated for miR-208b (–0.00001, *P* = 0.964) and miR-499 (0.00015, *P* = 0.486) in addition to hs-cTnT did not lead to an improvement in prediction of AMI diagnosis.

miRNAs for the prediction of death and future AMI

During a median follow-up of 27 months (IQR 25–31 months), there were 102 (9%) deaths with

Table 1 Baseline characteristics

Characteristics	All patients (<i>n</i> = 1155)	Acute myocardial infarction		<i>P</i> -value (AMI/non AMI)
		Yes (<i>n</i> = 224)	No (<i>n</i> = 931)	
Characteristics				
Age, years	63 (50–76)	72 (61–80)	61 (49–74)	<0.001
Male sex – <i>n</i> (%)	768 (67%)	158 (71%)	610 (66%)	0.153
BMI	26 (24–30)	25.9 (23.8–29)	27 (24–30)	0.215
eGFR (mL min ⁻¹ 1.73 m ⁻²) ^a	85 (68–101)	73.6 (59–95)	87 (70–102)	<0.001
STEMI		45 (20%)		
NSTEMI		179 (80%)		
Risk factors – <i>n</i> (%)				
Hypertension	762 (66%)	179 (80%)	583 (63%)	<0.001
Hypercholesterolemia	515 (45%)	117 (52%)	398 (43%)	0.01
Diabetes	208 (18%)	57 (26%)	151 (16%)	0.001
Current smoking	281 (24%)	56 (25%)	225 (24%)	0.794
History of smoking	402 (35%)	79 (35%)	323 (35%)	0.871
History – <i>n</i> (%)				
Coronary artery disease	436 (38%)	106 (47%)	309 (33%)	<0.001
Previous myocardial infarction	281 (24%)	72 (32%)	209 (23%)	0.002
Previous ACB ^b	110 (10%)	33 (15%)	77 (8%)	0.003
Previous PTCA ^c	276 (24%)	55 (25%)	221 (24%)	0.797
Peripheral artery disease	78 (7%)	30 (13%)	48 (5%)	<0.001
Previous stroke	63 (6%)	24 (11%)	39 (4%)	<0.001
Vital status (median, interquartile range)				
Systolic blood pressure, mmHg	142 (127–160)	142 (126–163)	143 (127–160)	0.994
Diastolic blood pressure, mmHg	84 (75–93)	83 (73–93)	84 (75–93)	0.261
Heart rate – beats per minute	76 (66–89)	79 (68–90)	75 (65–89)	0.055
Symptoms				
Beginning before <i>x</i> h	5 (3–12)	6 (3–14)	5 (3–12)	0.082
Maximum before <i>x</i> h	4 (2–7)	4 (2–8)	4 (2–7)	0.123
Electrocardiographic findings – <i>n</i> (%)				
Left bundle branch block	42 (4%)	18 (8%)	24 (3%)	<0.001
ST-segment elevation	60 (5%)	41 (18%)	19 (2%)	<0.001
ST-segment depression	130 (11%)	72 (32%)	58 (6%)	<0.001
T-wave inversion	149 (13%)	53 (24%)	96 (10%)	<0.001
No significant changes	774 (67%)	40 (18%)	734 (79%)	<0.001

All values are reported as median (interquartile range) or numbers (%).

^aeGFR, estimated glomerular filtration rate. ^bACB, aortocoronary bypass. ^cPTCA, percutaneous transluminal coronary angioplasty.

a median time to death of 293 days (IQR 55–618). Only median miR-208b levels were significantly higher in patients who died (–11.8, IQR –16.9 to –10.2) than in survivors (–12.5, IQR –16.9 to –11, *P* = 0.018). All other miRNAs did not differ significantly between survivors and deceased patients.

The prognostic accuracy for the prediction of short-term (30 days) and long-term mortality (730 days) by ROC curve analysis is shown in Figure S2a for all miRNAs analysed and (hs-)cTnT. Only in the case of miR-208b was there a borderline significant AUC for short-term mortality (0.67; 95% CI

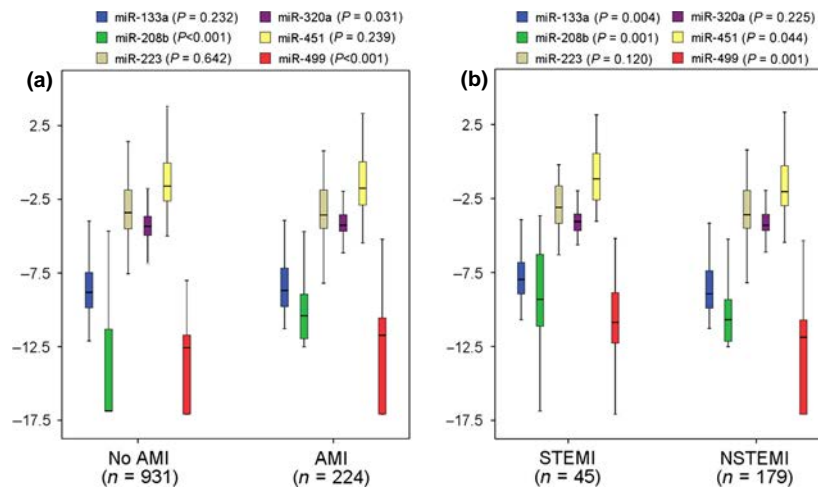


Fig. 1 Levels of six miRNAs at presentation in patients with ($n = 224$) and without ($n = 931$) AMI (a) and in patients with STEMI ($n = 45$) and NSTEMI ($n = 179$) (b). Log-transformed miRNA values were used for analyses. P-values describe the significance level of differences for each miRNA between patients with and without AMI. AMI, acute myocardial infarction; STEMI, ST-segment elevation myocardial infarction; and NSTEMI, non-ST-segment elevation myocardial infarction.

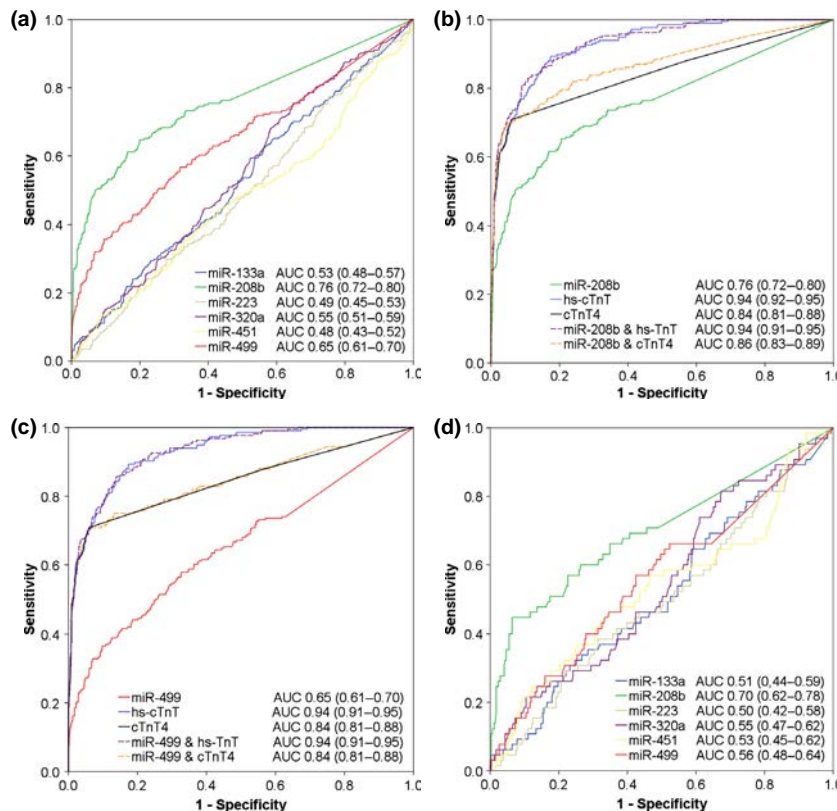


Fig. 2 Receiver operating characteristic curves showing diagnostic accuracy for the six miRNAs (a), miR-208b and miR-499 in comparison and combination with a conventional (cTnT4, Roche Diagnostics) and high-sensitivity cardiac troponin assay (hs-cTnT, Roche Diagnostics) (b and c) and the six miRNAs in early presenters (presenting within 3 h from symptom onset) (d).

Table 2 Univariate and multivariate binary regression analysis for the diagnosis of acute myocardial infarction using miRNAs and troponins

	Univariate analysis		Multivariate analysis (hs-cTnT)		Multivariate analysis (cTnT)	
	Hazard ratio (95% CI)	P-value	Hazard ratio (95% CI)	P-value	Hazard ratio (95% CI)	P-value
miR-133a	1.116 (1.035–1.204)	0.005	0.960 (0.801–1.150)	0.655	0.946 (0.794–1.126)	0.532
miR-208b	6.073 (2.506–14.717)	<0.001	0.907 (0.335–2.457)	0.848	1.009 (0.541–1.881)	0.977
miR-223	1.000 (0.999–1.001)	0.691				
miR-320a	1.000 (0.999–1.001)	0.779				
miR-451	1.000 (1.000–1.000)	0.712				
miR-499	1.022 (1.013–1.030)	<0.001	0.999 (0.996–1.002)	0.435	0.999 (0.994–1.004)	0.748
hs-cTnT	1.042 (1.034–1.049)	<0.001	1.042 (1.034–1.049)	<0.001	–	
cTnT4	1.040 (1.031–1.048)	<0.001	–		1.040 (1.031–1.049)	<0.001

Calculated with all miRNA values and cTnT4 $\times 10^3$, except miR499 calculated with 10^6 . hs-cTnT per increase of 1 ng L⁻¹ and cTnT4 per increase of 1 mg L⁻¹. miRNA, microRNA; CI, confidence interval; cTnT4, fourth-generation cardiac troponin T; and hs-cTnT, high-sensitivity cTnT.

0.52–0.81) whereas all other miRNAs were not significant predictors of short-term mortality. In the long-term, none of the miRNAs significantly predicted mortality (Figure S2b). Equally, univariate Cox proportional hazard analysis showed that none of the miRNAs analysed predicted mortality (Table 3A). According to Kaplan–Meier analysis (only shown for miR-208b, which displayed the best performance in ROC curve analysis), the outcome of patients with chest pain in terms of survival was significantly better for those with lower miR-208 concentrations (≤ -10.38), as shown in Fig. 3a,b.

With regard to the prediction of both short-term (30 days) and long-term (730 days) future AMI, AUC values were not statistically significant for any of the miRNAs investigated (Figure S3a,b). Similarly, Cox proportional hazard analysis demonstrated that none of the miRNAs analysed predicted future AMI (Table 3B).

Discussion

In this prospective, multicentre, international study of 1155 patients, we assessed the diagnostic and prognostic value of circulating levels of six miRNAs (miR-133a, miR-208b, miR-223, miR-320a, miR-451 and miR-499) in patients with acute chest pain. In particular, their incremental diagnostic value in combination with both conventional and hs-cTnT assays was investigated. To our knowledge, this is the largest analysis of miRNAs in patients presenting with suspected AMI reported so

far. We report five major findings of this study. First, circulating levels of miR-208b, miR-320a and miR-499 were significantly higher in patients with AMI than in those with other diagnoses. Secondly, the diagnostic accuracy for AMI was moderate for miR-208b (AUC 0.76) and miR-499 (AUC 0.65), whereas the other miRNAs provided no diagnostic value. Thirdly, the diagnostic accuracy of all miRNAs examined was significantly lower than that of cTnT or hs-cTnT. Fourthly, there was no incremental benefit of combining any of the miRNAs with cTnT or hs-cTnT with respect to diagnostic accuracy for AMI. Finally, the six miRNAs studied have no or very low predictive value for the occurrence of future AMI or death during long-term follow-up (730 days).

Although perhaps disappointing to some extent, these results have important clinical implications and extend previous findings on the possible clinical use of miRNAs [6–9, 23, 24]. Current hs-cTn assays [1, 2] detect troponins at concentrations approximately 10-fold lower than conventional troponin assays and have recently been introduced in AMI diagnosis guidelines [3]. Yet, the markedly increased number of patients with positive hs-cTn values due to noncoronary cardiac disease [4], various other diseases [33] or age [27] and the remaining insensitivity of hs-cTn in the initial hour(s) after AMI cause considerable problems for physicians in terms of diagnosis. miRNAs have been shown to be early biomarkers of cardiac necrosis. Recently, several studies comparing circulating miRNA levels in healthy control subjects

Table 3 Cox proportional hazard analysis for prediction of all-cause death (A) and future acute myocardial infarction (AMI; B) during follow-up (730 days)

	(A)		(B)	
	All-cause death (univariate analysis)		Future AMI (univariate analysis)	
	Hazard ratio (95% CI)	P-value	Hazard ratio (95% CI)	P-value
miR-133a	1.020 (0.954–1.089)	0.565	0.998 (0.845–1.179)	0.982
miR-208b	1.084 (1.001–1.174)	0.047	1.077 (0.925–1.254)	0.336
miR-223	1.000 (0.998–1.001)	0.444	0.999 (0.997–1.001)	0.318
miR-320a	1.000 (0.999–1.001)	0.871	0.996 (0.989–1.004)	0.347
miR-451	1.000 (1.000–1.000)	0.968	1.000 (1.000–1.000)	0.711
miR-499	1.000 (1.000–1.001)	0.305	1.001 (0.999–1.003)	0.383
hs-cTnT	1.001 (1.000–1.001)	<0.001	1.001 (1.000–1.001)	0.058
cTnT4	1.001 (1.000–1.001)	<0.001	1.001 (1.000–1.001)	0.075

Calculated with all miRNA values and cTnT4 $\times 10^3$, except miR499 calculated with 10^6 . hs-cTnT per increase of 1 ng L^{-1} and cTnT4 per increase of 1 mg L^{-1} . cTnT4, fourth-generation cardiac troponin T; hs-cTnT, high-sensitivity cTnT.

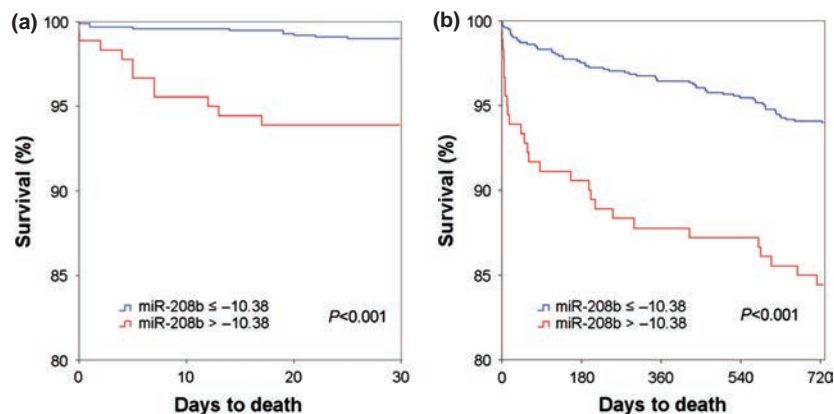


Fig. 3 Kaplan–Meier survival curves for all patients with acute chest pain showing cumulative survival during short-term (30 days) and long-term follow-up (730 days). Patients were subdivided into two groups according to optimal cut-off value (-10.38) calculated using the Youden index (sensitivity 31.8%, specificity 86.2%). Log-rank values were employed to assess statistical significance. miRNA values are log-transformed.

and AMI patients [6, 7] and a small study of miRNA levels in 66 patients with acute chest pain [9] have shown very promising results, especially for cardiomyocyte-enriched miRNAs, with regard to the diagnosis of AMI, demonstrating the potential utility of miRNAs as markers of cardiac damage [8]. Similarly, we have been able to confirm that levels of cardiomyocyte-enriched miR-208b and miR-499 are increased in patients with AMI compared to those with other types of acute chest pain. Yet, their diagnostic accuracy for AMI in the heterogeneous (and clinically highly relevant) group of patients with acute chest pain is only

moderate and is clearly outperformed by both conventional and hs-cTn. Furthermore, in comparison with reference biomarkers, the miRNAs studied in this analysis do not seem to add incremental benefit when used in a dual-marker approach with either conventional or hs-cTn. In agreement with our findings, Widera *et al.* [10] analysed six circulating miRNAs in acute coronary syndrome (including miR-133a, miR-208b and miR-499) and showed a high degree of overlap between patients with AMI and unstable angina. The large overlap of miRNA levels observed in our study between patients with and without AMI, and between

patients with STEMI and NSTEMI, rules out the robust diagnostic value of these miRNAs.

Amongst the miRNAs that were significantly increased in AMI patients (miR-133a, miR-208b and miR-499), only miR-208b has been shown to be exclusively released by myocardial injury (and not by muscle injury, as is the case for miR-133a and miR-499) [34]. Therefore, it is not surprising that, of all miRNAs studied in this analysis, miR-208b demonstrated the highest diagnostic accuracy for AMI.

Comparison of the various miRNA studies that have been conducted is complicated by several issues. First, in addition to the limited sample size of most existing miRNA studies [6, 8, 9], most have mainly performed analyses between AMI patients and healthy control subjects [6, 7]. Secondly, due to the relative immaturity of the field of miRNAs in cardiovascular medicine, varying RNA extraction protocols [21] methods of nucleic acid detection and normalization procedures [21] are used, further complicating a direct comparison of the various miRNA studies [35]. The protocol used for miRNA measurements in the present study has been widely used, and its reliability has been previously demonstrated [7]. However, the exact time course of miRNA release into the bloodstream is still poorly defined. From a clinical perspective, a rapid and accurate diagnosis of AMI remains crucial for patients with acute chest pain. Current methods for measuring miRNAs quantitatively are still relatively time-consuming (taking several hours), and the low levels of most circulating miRNAs make accurate quantification challenging with existing technology [35]. By contrast, the protein troponin can be reliably and accurately quantified within 60 min in most circumstances. Thus, novel biomarkers such as miRNAs have to compete with the current reference biomarker troponin not only with regard to diagnostic accuracy but also in terms of the time it takes for reliable and accurate measurement. Nevertheless, in contrast to the classic antibody-based assays used for measurement of the myocardial protein troponin, which are subject to assay interference, miRNAs have the advantage that they can be quantified using PCR, enabling highly specific and simultaneous measurement of various miRNAs.

Even though miRNAs appear to be very early markers of cardiac damage (peaking within hours)

[5, 7, 9, 23], including in the group of very early presenters (i.e. presentation to the ED within 3 h of onset of acute chest pain), there seemed to be no further benefit of the six miRNAs studied. It is interesting that neither the diagnostic accuracy of hs-cTnT nor that of conventional cTnT, before 3–6 h after onset of symptoms, could be improved by adding miR-208b or miR-499, as also shown by IDI analysis. The limited benefit of miRNAs even in early presenting patients and the fact that miRNA levels did not differ between patients with STEMI and NSTEMI might be supported in part by the findings of De Rosa *et al.* [36]. In their analysis, the authors compared circulating levels of miR-499 and miR-133 with hs-cTn levels in the coronary sinus blood of patients with acute coronary syndrome and revealed that there appears to be a threshold for hs-cTn below which circulating miRNAs are no longer measurable despite small increases in the level of hs-cTn [36].

The possibility remains that other miRNAs add benefit in addition to the high diagnostic accuracy of existing conventional and hs-cTn assays. Novel self-learning pattern recognition algorithms as described by Meder *et al.* [37], who proposed a signature of 20 miRNAs to predict AMI, might detect other promising miRNAs for single or combined use in the early evaluation of patients with acute chest pain.

The prognostic benefit of miRNAs in cardiovascular medicine has been considerably less well studied than the potential diagnostic benefit. Matsumoto *et al.* [38] performed a microarray analysis in patients who survived AMI and identified 11 miRNAs differentially expressed in the serum of patients at high risk of cardiac death and eventually only two miRNAs (miR-155 and miR-380) with significantly higher levels in patients who subsequently died due to cardiac causes. Widera *et al.* [10] found that miR-133a and miR-208b were significantly associated with the risk of death in patients with acute coronary syndromes. In a large-scale prospective study, Zampetaki *et al.* [39] identified a group of three miRNAs, including miR-223, consistently associated with the risk of MI. The miRNAs investigated in the present study, including miR-223, were not robustly associated with mortality. However, using a systems-based approach, we recently identified miR-150 as a significant biomarker of left ventricular remodeling in two independent cohorts of AMI patients [40]. Therefore, circulating miRNAs still hold some

potential to aid in prognostication of patients with cardiac diseases.

Several limitations of the current study should be considered. First, we cannot draw any conclusions about patients with terminal kidney failure requiring dialysis because these patients were excluded from our study. Of note, we observed that patients with terminal kidney failure have increased levels in miR-499 and cTnT without any sign of myocardial injury [41]. Secondly, we cannot exclude the possibility that miRNAs other than those tested in this study might be clinically useful. As such, the present study is limited by the selection of miRNAs for investigation. Thirdly, the adjudication of AMI was performed by applying the criteria defined in the universal definition of MI (3, 28, 29). As cardiac troponins have an important role in the universal definition of MI, any state-of-the-art analysis following current ESC/ACC/AHA/IFCC/WHF guidelines to apply this definition puts cardiac troponins as a comparator in a very strong position. Therefore, it is very difficult for new biomarkers to demonstrate significant added value on top of cardiac troponins. Fourthly, *P*-values are not usually adjusted in observational studies comparing several biomarkers against an independent diagnostic or prognostic gold standard (1, 2, 4, 41). Therefore, we have chosen not to do so in this analysis of the potential value of six miRNAs. We wish to acknowledge, however, that with a higher number of potential analytes for evaluation, the chances of finding a positive association between an analyte and the end-point increases. Finally, because circulating levels of miRNAs fluctuate very rapidly after MI, it is possible that admission levels of miRNAs may not correspond to peak values. However, this represents the clinical scenario of patients presenting to the ED several hours after symptom onset.

Conclusion

The findings of the present study temper speculation about the potential clinical usefulness of circulating miRNAs in patients with acute chest pain. There does not appear to be an increase in diagnostic or prognostic value provided by the miRNAs investigated in this study.

Conflict of interest statement

Professor Mueller has received research grants from the Swiss National Science Foundation

(PP00B-102853) and the Swiss Heart Foundation, the Cardiovascular Research Foundation Basel, 8sense, Abbott, ALERE, Brahms, Critical Diagnostics, Nanosphere, Roche, Siemens and the University Hospital Basel, as well as speaker honoraria from Abbott, ALERE, Brahms, Novartis, Roche and Siemens. TR has received research grants from the Swiss National Science Foundation (PASMP3-136995), the Swiss Heart Foundation, the University of Basel, the Professor Max Cloetta Foundation and the Department of Internal Medicine, University Hospital Basel as well as speaker honoraria from Brahms and Roche. None of the other authors has any conflict of interests relevant to this study to declare. The sponsors had no role in the design of the study, the analysis of the data, the preparation of the manuscript or the decision to submit the manuscript for publication.

Acknowledgments

The authors thank Christelle Nicolas, Laurent Quennery, Bernadette Leners and Justine Gofinet for expert technical assistance. We also thank the patients who participated in the study, the staff of the emergency department, the research coordinators and the laboratory technicians (particularly Michael Freese, Claudia Stelzig, Esther Garrido, Irina Klimmeck, Melanie Wieland, Janine Voegele, Beate Hartmann and Fausta Chiaverio) for their most valuable contributions. This work was supported by the Ministry of Culture, Higher Education and Research of Luxembourg, and the National Research Fund of Luxembourg. EG and JZ received fellowships from the National Research Fund of Luxembourg.

References

- 1 Reichlin T, Hochholzer W, Bassetti S, *et al.* Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. *N Engl J Med* 2009; **361**: 858–867.
- 2 Keller T, Zeller T, Peetz D, *et al.* Sensitive troponin I assay in early diagnosis of acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2009; **361**: 868–877.
- 3 Thygesen K, Mair J, Katus H, *et al.* Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. *Eur Heart J* 2010; **31**: 2197–2204.
- 4 Haaf P, Drexler B, Reichlin T, *et al.* High-sensitivity cardiac troponin in the distinction of acute myocardial infarction from acute cardiac noncoronary artery disease. *Circulation* 2012; **126**: 31–40.
- 5 Salic K, De Windt LJ. MicroRNAs as biomarkers for myocardial infarction. *Curr Atheroscler Rep* 2012; **14**: 193–200.

- 6 D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, *et al.* Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2010; **31**: 2765–2773.
- 7 Devaux Y, Vausort M, Goretti E, *et al.* Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction. *Clin Chem* 2012; **58**: 559–567.
- 8 Corsten MF, Dennert R, Jochems S, *et al.* Circulating microRNA-208b and microRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2010; **3**: 499–506.
- 9 Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, *et al.* Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J* 2010; **31**: 659–666.
- 10 Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM, *et al.* Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 2011; **51**: 872–875.
- 11 Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; **75**: 843–854.
- 12 Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 2008; **455**: 64–71.
- 13 Selbach M, Schwanhaussner B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 2008; **455**: 58–63.
- 14 D'Alessandra Y, Pompilio G, Capogrossi MC. MicroRNAs and myocardial infarction. *Curr Opin Cardiol* 2012; **27**: 228–235.
- 15 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; **116**: 281–297.
- 16 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 2002; **12**: 735–739.
- 17 Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 2010; **466**: 835–840.
- 18 Li C, Pei F, Zhu X, Duan DD, Zeng C. Circulating microRNAs as novel and sensitive biomarkers of acute myocardial infarction. *Clin Biochem* 2012; **45**: 727–732.
- 19 Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 2011; **39**: 7223–7233.
- 20 Chien KR. Molecular medicine: microRNAs and the tell-tale heart. *Nature* 2007; **447**: 389–390.
- 21 Olivieri F, Antonicelli R, Capogrossi MC, Procopio AD. Circulating microRNAs (miRs) for diagnosing acute myocardial infarction: an exciting challenge. *Int J Cardiol* 2013; **167**: 3028–3029.
- 22 Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res* 2012; **110**: 483–495.
- 23 Gidlöf O, Andersson P, van der Pals J, Gotberg M, Erlinge D. Cardiospecific microRNA plasma levels correlate with troponin and cardiac function in patients with ST elevation myocardial infarction, are selectively dependent on renal elimination, and can be detected in urine samples. *Cardiology* 2011; **118**: 217–226.
- 24 Ji X, Takahashi R, Hiura Y, Hirokawa G, Fukushima Y, Iwai N. Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem* 2009; **55**: 1944–1949.
- 25 Apple FS, Jesse RL, Newby LK, Wu AH, Christenson RH, National Academy of Clinical B, Damage ICFSoMoC. National academy of clinical biochemistry and IFCC committee for standardization of markers of cardiac damage laboratory medicine practice guidelines: analytical issues for biochemical markers of acute coronary syndromes. *Circulation* 2007; **115**: e352–e355.
- 26 Giannitsis E, Kurz K, Hallermayer K, Jarausch J, Jaffe AS, Katus HA. Analytical validation of a high-sensitivity cardiac troponin T assay. *Clin Chem* 2010; **56**: 254–261.
- 27 Reiter M, Twerenbold R, Reichlin T, *et al.* Early diagnosis of acute myocardial infarction in the elderly using more sensitive cardiac troponin assays. *Eur Heart J* 2011; **32**: 1379–1389.
- 28 Thygesen K, Alpert JS, White HD, *et al.* Universal definition of myocardial infarction. *Circulation* 2007; **116**: 2634–2653.
- 29 Thygesen K, Mair J, Giannitsis E, *et al.* How to use high-sensitivity cardiac troponins in acute cardiac care. *Eur Heart J* 2012; **33**: 2252–2257.
- 30 DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988; **44**: 837–845.
- 31 Vickers AJ, Cronin AM, Begg CB. One statistical test is sufficient for assessing new predictive markers. *BMC Med Res Methodol* 2011; **11**: 13.
- 32 Pencina MJ, D'Agostino RB Sr, D'Agostino RB Jr, Vasan RS. Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Stat Med* 2008; **27**: 157–172; discussion 207–12.
- 33 Twerenbold R, Jaffe A, Reichlin T, Reiter M, Mueller C. High-sensitive troponin T measurements: what do we gain and what are the challenges? *Eur Heart J* 2012; **33**: 579–586.
- 34 Fichtlscherer S, Zeiher AM, Dimmeler S. Circulating microRNAs: biomarkers or mediators of cardiovascular diseases? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; **31**: 2383–2390.
- 35 Engelhardt S. Small RNA, biomarkers come of age. *J Am Coll Cardiol* 2012; **60**: 300–303.
- 36 De Rosa S, Fichtlscherer S, Lehmann R, Assmus B, Dimmeler S, Zeiher AM. Transcoronary concentration gradients of circulating microRNAs. *Circulation* 2011; **124**: 1936–1944.
- 37 Meder B, Keller A, Vogel B, *et al.* MicroRNA signatures in total peripheral blood as novel biomarkers for acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2011; **106**: 13–23.
- 38 Matsumoto S, Sakata Y, Nakatani D, *et al.* A subset of circulating microRNAs are predictive for cardiac death after discharge for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; **427**: 280–284.
- 39 Zampetaki A, Willeit P, Tilling L, *et al.* Prospective study on circulating microRNAs and risk of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2012; **60**: 290–299.
- 40 Devaux Y, Vausort M, McCann GP, *et al.* MicroRNA-150: a novel marker of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Genet* 2013; **6**: 290–298.
- 41 Emilian C, Goretti E, Prospert F, *et al.* MicroRNAs in patients on chronic hemodialysis (MINOS study). *Clin J Am Soc Nephrol* 2012; **7**: 619–623.

Correspondence: Yvan Devaux, Laboratory of Cardiovascular Research, CRP-Santé, 84 Val Fleuri, L-1526 Luxembourg,

Luxembourg.
(fax: +352 26970396; e-mail: Yvan.Devaux@crp-sante.lu).

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1 Presentation values of 6 miRNAs in (a) patients with AMI (n= 224) and without AMI (n=931); (b) patients with STEMI (n= 45) and NSTEMI (n=179).

Figure S2 ROC curves displaying diagnostic accuracy for (a) 6 miRNAs, (b–c) miR-208b and miR-499 in comparison and combination with a

conventional (cTnT4, Roche Diagnostic) and high-sensitivity cardiac Troponin assay (hs-cTnT, Roche Diagnostics), (d) 6 miRNAs in early presenters (presenting within 3 hours from symptom onset).

Figure S3 Kaplan Meier curves for survival in all acute chest pain patients displaying cumulative survival during short-term follow-up (30 days) and long-term follow-up (730 days), subdivided into 2 groups according to optimal cut-off (-10.38) by Youden index (sensitivity of 31.8%, specificity of 86.2%). Log-rank values were employed to assess statistical significance. miRNA values are log-transformed. ■

Etude n°2: Détermination de la capacité diagnostique et pronostique des miARN circulants chez des patients après IM (cohorte LUCKY) et association potentielle avec les facteurs de risque CV.

- Détermination de la capacité diagnostique de certains miARN circulants lors d'un IM

Diagnostiquer rapidement un IM est important dans la prise en charge du patient, pour le traitement et le pronostic après IM⁹. Les caractéristiques cliniques et les ECG sont souvent peu spécifiques de l'IM chez des patients ayant une douleur à la poitrine, nécessitant la mesure de marqueurs cardiaques. Actuellement, le diagnostic a été amélioré grâce à des tests de mesure hypersensibles des cTnT^{19,20}, dont la hs-cTnT détectable très tôt après ischémie. Cependant plusieurs mesures sont nécessaires parfois et elle est également positive chez des patients ayant une maladie coronaire chronique stable et chez certains contrôles sains²⁵¹. Les miARN circulants ont déjà montré leur potentiel comme biomarqueurs diagnostiques et pronostiques chez des patients cancéreux⁹. Plusieurs publications ont également identifié les miARN enrichis dans le cœur miR-208b et miR-499 comme potentiel biomarqueurs diagnostiques de l'IM^{101,252}.

Cette étude a eu pour but d'évaluer la capacité diagnostique des miARN circulants miR-208b et miR-499 chez 510 patients ayant eu un IM et de la comparer avec celle de la hs-cTnT.

Pour cela, des échantillons sanguins ont été prélevés lors de la reperfusion chez ces 510 patients avec IM ainsi que chez 87 contrôles sains. Deux groupes de patients ont été ainsi déterminés: les STEMI (n=397) et les NSTEMI (n=113). Les miARN circulants ont été extraits du plasma et les miARN candidats miR-208b et miR-499 ont été mesurés par PCR quantitative.

Nous avons obtenu les résultats suivant:

- Les taux de miR-208b et miR-499 circulants sont très supérieurs chez les patients avec IM (5.10^5 fois et 3.10^5 fois respectivement) et presque indétectables chez les contrôles sains (à peine détectable chez 5% et 14% des contrôles respectivement). Ces miARN sont encore plus augmentés dans le plasma des patients STEMI comparés aux patients NSTEMI (8 fois pour le miR-208b et 2 fois pour le miR-499).

- Ces taux de miARN circulants sont corrélés avec les pics de concentration de CPK et de cTnT ($p < 10^{-9}$).

- La hs-cTnT comme ces miARN est déjà détectée dans le plasma 1 heure après le début de douleur thoracique. Plus de patients sont positifs pour le miR-499 que pour le miR-208b. Chez des patients arrivés moins de 3h après le début de douleur à la poitrine, le miR-499 est positif chez 93% des patients alors que la hs-cTnT ne l'est que chez 88% des patients. Plus de 90% des patients arrivés plus de 3 heures après le début de la douleur sont positifs pour le miR-499 et l'hs-cTnT.

- Pour discriminer les patients des contrôles, ces miARN ont démontré un pouvoir diagnostique comparable à celui de la hsTnT, avec des AUC de 0,9 pour le miR-208b et 0,97 pour le miR-499, proche de la hsTnT à 0,97. Pour discriminer les patients NSTEMI des contrôles sains, le miR-499 dépasse la hs-cTnT (AUC de 0,95 comparé à 0,9 pour la hs-cTnT). Par contre, combiner le miR-499 à la hs-cTnT n'a pas significativement amélioré la valeur diagnostique de chaque marqueur seul.

- Une analyse de reclassification est effectuée afin de déterminer si le miR-499 est capable de reclasser les patients mal classés par la hs-cTnT dans un modèle incluant de multiples facteurs de risque et la hs-cTnT. Nous n'avons pas observé de valeur additive du miR-499 pour le diagnostic.

- Les miR-208b et miR-499 sont inversement corrélés à la FE mesurée chez 362 patients (278 patients STEMI et 84 NSTEMI) lors du suivi. La corrélation n'est pas significative chez les patients NSTEMI. Ces 2 miARN sont de modestes biomarqueurs pronostiques du remodelage du VG, avec des AUC de 0,69 pour le miR-208b et 0,64 pour le miR-499.

Cette étude montre que les miARN circulants miR-208b et miR-499 ont un potentiel diagnostique pour l'IM, mais qu'aucun de ces miARN ne surpassent la hsTnT pour le diagnostic de l'IM aigu (le miR-499 circulant peut cependant aider à discriminer les NSTEMI des contrôles). Ces miARN n'ont pas de potentiel pronostique après IM dans cette étude.

Use of Circulating MicroRNAs to Diagnose Acute Myocardial Infarction

Yvan Devaux,¹ Mélanie Vausort,¹ Emeline Goretti,¹ Petr V. Nazarov,² Francisco Azuaje,¹ Georges Gilson,³ Maarten F. Corsten,⁴ Blanche Schroen,⁴ Marie-Lise Lair,⁵ Stephane Heymans,⁴ and Daniel R. Wagner^{1,6*}

BACKGROUND: Rapid and correct diagnosis of acute myocardial infarction (MI) has an important impact on patient treatment and prognosis. We compared the diagnostic performance of high-sensitivity cardiac troponin T (hs-cTnT) and cardiac enriched microRNAs (miRNAs) in patients with MI.

METHODS: Circulating concentrations of cardiac-enriched miR-208b and miR-499 were measured by quantitative PCR in a case-control study of 510 MI patients referred for primary mechanical reperfusion and 87 healthy controls.

RESULTS: miRNA-208b and miR-499 were highly increased in MI patients ($>10^5$ -fold, $P < 0.001$) and nearly undetectable in healthy controls. Patients with ST-elevation MI ($n = 397$) had higher miRNA concentrations than patients with non-ST-elevation MI ($n = 113$) ($P < 0.001$). Both miRNAs correlated with peak concentrations of creatine kinase and cTnT ($P < 10^{-9}$). miRNAs and hs-cTnT were already detectable in the plasma 1 h after onset of chest pain. In patients who presented <3 h after onset of pain, miR-499 was positive in 93% of patients and hs-cTnT in 88% of patients ($P = 0.78$). Overall, miR-499 and hs-cTnT provided comparable diagnostic value with areas under the ROC curves of 0.97. The reclassification index of miR-499 to a clinical model including several risk factors and hs-cTnT was not significant ($P = 0.15$).

CONCLUSIONS: Circulating miRNAs are powerful markers of acute MI. Their usefulness in the establishment of a rapid and accurate diagnosis of acute MI remains to be determined in unselected populations of patients with acute chest pain.

© 2011 American Association for Clinical Chemistry

A rapid diagnosis of acute myocardial infarction (MI)⁷ is critical for appropriate management of patients with chest pain. Clinical presentation and echocardiography findings are often nonspecific in patients with chest pain, and the measurement of cardiac markers is required. The diagnostic performance of cardiac markers has recently been improved by the introduction of high-sensitivity assays for troponins (1, 2). The assay for high-sensitivity cardiac troponin T (hs-cTnT) is positive early after ischemia, but serial testing is required because hs-cTnT is also largely positive in patients with chronic stable coronary artery disease and can be positive in apparently healthy controls (3). Therefore, the ideal biomarker for rapid and reliable diagnosis of acute MI is still lacking.

MicroRNAs (miRNAs) are small, single-stranded RNA molecules that regulate gene expression mostly by messenger RNA destabilization (4). Since their discovery in *Caenorhabditis elegans* in 1993, miRNAs have been described in many species and almost 1000 human miRNAs have been identified so far (5). Each miRNA can regulate hundreds of messenger RNA targets and this underscores the regulatory role of miRNAs in all biological processes, including cancer, metabolism, stem cell regulation, and immune function. Because miRNAs have been shown to regulate genes in numerous oncogenic pathways, the expression of miRNAs in cancerous tissue has been used to characterize patients with various types of malignancies (6). Moreover, it was recently shown that miRNAs circulating in the blood of cancer patients can also be useful for diagnosis and prognosis (7).

A recent report indicates that cardiac-enriched miR-208b and miR-499 are released in the peripheral circulation of rats as early as 1 h after occlusion of the artery (8). The same study showed that cardiac-enriched miRNAs are increased in patients with acute

¹ Laboratory of Cardiovascular Research and ² Microarray Center, Centre de Recherche Public, Santé, Luxembourg; ³ Laboratory of Biochemistry, Centre Hospitalier, Luxembourg; ⁴ Centre for Heart Failure Research, Cardiovascular Research Institute Maastricht, the Netherlands; ⁵ Centre of Studies for Public Health, Centre de Recherche Public, Santé, Luxembourg; ⁶ Division of Cardiology, Centre Hospitalier, Luxembourg.

* Address correspondence to this author at: Division of Cardiology, Centre Hospitalier Luxembourg, 4 rue Barblé, L1210 Luxembourg. Fax +352-26970396;

e-mail wagner.daniel@chl.lu.

Received August 9, 2011; accepted December 23, 2011.

Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2011.173823

⁷ Nonstandard abbreviations: MI, myocardial infarction; hs-cTnT, high-sensitive cardiac troponin T; miRNA, microRNA; AUC, area under the ROC curve; PCI, percutaneous coronary intervention; STEMI, ST-segment-elevation MI; CK, creatine kinase; NSTEMI, non-STEMI; Ct, threshold cycle.

MI within 4 h of symptom onset. The findings in humans with acute MI have been confirmed by several other reports, including one from our group (8–17). These studies, although small and preliminary, have indicated that miRNAs hold potential as new cardiac biomarkers (18). Therefore, the aim of the present study was to compare the diagnostic performances of hs-cTnT and miRNAs in a large group of patients with acute MI. We focused our investigations on miR-208b and miR-499 because these 2 miRNAs are very robustly increased in the circulation after acute MI (17).

Materials and Methods

STUDY POPULATION

A total of 510 consecutive patients with an MI referred to the Luxembourg Heart Institute for emergent percutaneous coronary intervention (PCI) with acute and ongoing chest pain for <12 h and clinically significant ST-T changes were included in the study.

Acute ST-segment–elevation MI (STEMI) was defined by the following: (a) clinically significant ST elevation (>1 mm); (b) completely occluded major coronary artery: TIMI (thrombolysis in MI), 0 flow in the left anterior descending, circumflex, or right coronary artery; (c) peak creatine kinase (CK) activity >600 U/L (3 times higher than the upper limit of the reference interval).

Non-STEMI (NSTEMI) was defined by the following: (a) no significant ST-elevation but clinically significant ST depression (>1 mm); (b) clinically significant lesion in a major coronary artery requiring PCI; (c) positive troponin concentrations after 24 h (>0.03 $\mu\text{g/L}$). Most patients with NSTEMI presented with a severe or subocclusive lesion in the left anterior descending, circumflex, or right coronary artery. Patients with a completely occluded artery were excluded from this group.

Blood samples were obtained at presentation and twice daily thereafter for determination of peak values of cardiac markers. Plasma samples were extracted from citrated tubes and stored at -80°C . Patients had echocardiography at 4 months. The protocol was approved by the local ethics committee and all study participants signed an informed consent form. Controls were 87 healthy male volunteers recruited from a national observational study of cardiovascular risks. Blood samples used to measure cardiac markers were collected during a medical visit at the hospital. Clinical characteristics are shown in Table 1.

PLASMA miRNA DETERMINATION

We extracted total RNA from plasma samples using the mirVana PARIS kit (Ambion, Applied Biosystem) without enrichment for small RNAs. A mix of 3 sup-

plemented synthetic *C. elegans* miRNAs (Qiagen), which lacked sequence homology to human miRNAs, was added to plasma samples for correction of extraction efficiency. Potential genomic DNA contamination was eliminated by use of DNase (Qiagen). Reverse transcription of RNA was performed with the miScript reverse transcription kit (Qiagen). The resulting cDNA was diluted 10-fold before quantitative PCR performed by using the miScript SYBR-green PCR kit (Qiagen). miRNA-specific miScript primer sets were obtained from Qiagen. Expression values were normalized by using the mean threshold cycle (Ct) obtained from the spiked-in controls [calculation formula: $2^{\text{exp}(\text{mean Ct spiked-in controls} - \text{Ct target miRNA})}$] and log transformed. The detection limit of the PCR assay was -7.2 , which was the log transformation of the minimum expression detected divided by 10. An expression value of -7.2 therefore indicated that the miRNA expression level was below the detection threshold of the assay.

The TaqMan[®] MicroRNA Assay (Applied Biosystems) was used in a subcohort of patients. This quantitative miRNA stem loop reverse-transcription PCR technology uses gene-specific stem loop reverse-transcription primers and TaqMan[®] probes to detect mature miRNA transcripts. The TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase[®] UNG (Applied Biosystems) was used for PCR. A pool of RNA was used as interrun calibrator, and expression values were calculated with the δ threshold method (Bio-Rad CFX Manager, Bio-Rad).

Information regarding technical considerations about miRNA determination by PCR can be found in the Data Supplement that accompanies the online version of this article at <http://www.clinchem.org/content/vol58/issue3>.

BIOCHEMICAL ANALYSES

We measured hs-cTnT by using the Roche high-sensitivity assay performed on the Cobas e601 system with a detection limit of 0.003 $\mu\text{g/L}$, a 99th-percentile cutoff point of 0.014 $\mu\text{g/L}$, and a CV of <10% at 0.013 $\mu\text{g/L}$. hs-cTnT concentrations below 0.003 $\mu\text{g/L}$ were given a value of -3.5 ($\log 0.003/10$). The cTnT assay used to establish the diagnosis of MI was a fourth-generation assay from Roche that was also performed on Cobas e601 equipment, with 0.01 $\mu\text{g/L}$ being the lower detection limit and 0.03 $\mu\text{g/L}$ being the troponin T concentration reproducibly measured with a CV below 10%. CK activity was measured with a Roche IFCC-recommended method on a Cobas c501 instrument.

STATISTICAL ANALYSES

Before analysis, all data were subjected to a normality test (Shapiro-Wilk). Mann-Whitney and *t*-tests were used to compare 2 groups of continuous variables. A χ^2

Table 1. Clinical characteristics of the study population.^a

	NSTEMI (n = 113)	STEMI (n = 397)	P value (STEMI vs NSTEMI)	Controls (n = 87)
Age, median (range), y	62 (30–89)	62 (0.32–91)	0.36	53 (40–60)
Sex, male, n (%)	78 (69)	303 (0.76)	0.60	87 (100)
Body mass index, median (range)	26 (18–47)	27 (18–46)	0.54	28 (22–40)
Serum markers, peak values, median (range)				
CK, U/L	319 (34–598)	1847 (602–11 395)	<0.001	91 (32–565)
cTnT, $\mu\text{g/L}$	0.8 (0.02–9.4)	4.9 (0.01–34.12)	<0.001	<0.03
High-sensitivity C-reactive protein, mg/L	5 (0.34–383)	9 (0.3–301)	0.13	1.48 (0.3–26)
hs-cTnT at presentation, median (range), $\mu\text{g/L}$	0.09 (0.003–5.96)	0.17 (0.003–10)	<0.001	
4-Month ejection fraction, median (range), %	55 (20–78)	50 (15–83)	0.001	
Cardiovascular history, n (%)				
Prior MI	19 (17)	35 (9)	0.05	0 (0)
Coronary artery bypass graft	3 (3)	33 (8)	0.08	0 (0)
Percutaneous transluminal coronary angioplasty	21 (19)	34 (8)	0.01	0 (0)
Diabetes	25 (22)	91 (23)	0.99	0 (0)
Hypertension	56 (50)	179 (45)	0.68	17 (20)
Hypercholesterolemia	53 (47)	164 (41)	0.57	12 (14)
Tobacco	45 (40)	162 (41)	0.98	20 (23)
Medications, n (%)				
β -Blockers	92 (81)	323 (81)	0.94	0 (0)
Calcium antagonists	5 (4)	3 (1)	0.02	0 (0)
Nitrates	30 (27)	82 (21)	0.35	0 (0)
Angiotensin-converting-enzyme inhibitors	44 (39)	152 (38)	0.99	0 (0)
Statins	90 (80)	317 (80)	0.95	0 (0)
Angiotensin inhibitors	7 (6)	24 (6)	0.87	0 (0)

^a All myocardial infarction patients had successful mechanical reperfusion and stenting of the infarct artery within 12 h of chest pain onset. All patients with a large thrombus burden received aspirin, clopidogrel, heparin, and abciximab.

test was used for categorical variables. ROC curves and their corresponding areas under the curve (AUCs) were used for evaluation of diagnostic accuracy. AUCs were compared by the method of DeLong.

Reclassification analyses were performed to test the additive value of miR-499 to a multiparameter clinical model or hs-cTnT. If expression of either marker was higher than its corresponding threshold, the sample was assigned to “test positive” class. If expression was lower than the threshold, the sample was assigned to “test negative” class. For each classification, a confusion table was calculated and used for benchmarking the performances of biomarkers. The net reclassification index (19) was used to validate the classification performance changes for biomarkers with respect to classical hs-cTnT. Statistical significance was evaluated as described elsewhere (20).

To evaluate the association between miRNA concentrations and cardiac markers, a multiple linear re-

gression model starting with all parameters and proceeding by backward stepwise elimination was implemented. Correlations between 2 variables were determined by the Pearson and Spearman tests for gaussian and nongaussian data, respectively.

Statistical tests were 2-sided. The SigmaPlot v11.0 and the Weka v3.6.2 data-mining platforms were used for statistical analyses. A *P* value <0.05 was considered significant.

Results

INCREASED CIRCULATING CONCENTRATIONS OF miR-208B AND miR-499 AFTER MI

Concentrations of miR-208b and miR-499 were measured in the plasma of 87 healthy controls and 113 NSTEMI and 397 STEMI patients (Fig. 1). In controls, 5% had detectable concentrations of miR-208b and 14% had detectable concentrations of miR-499. How-

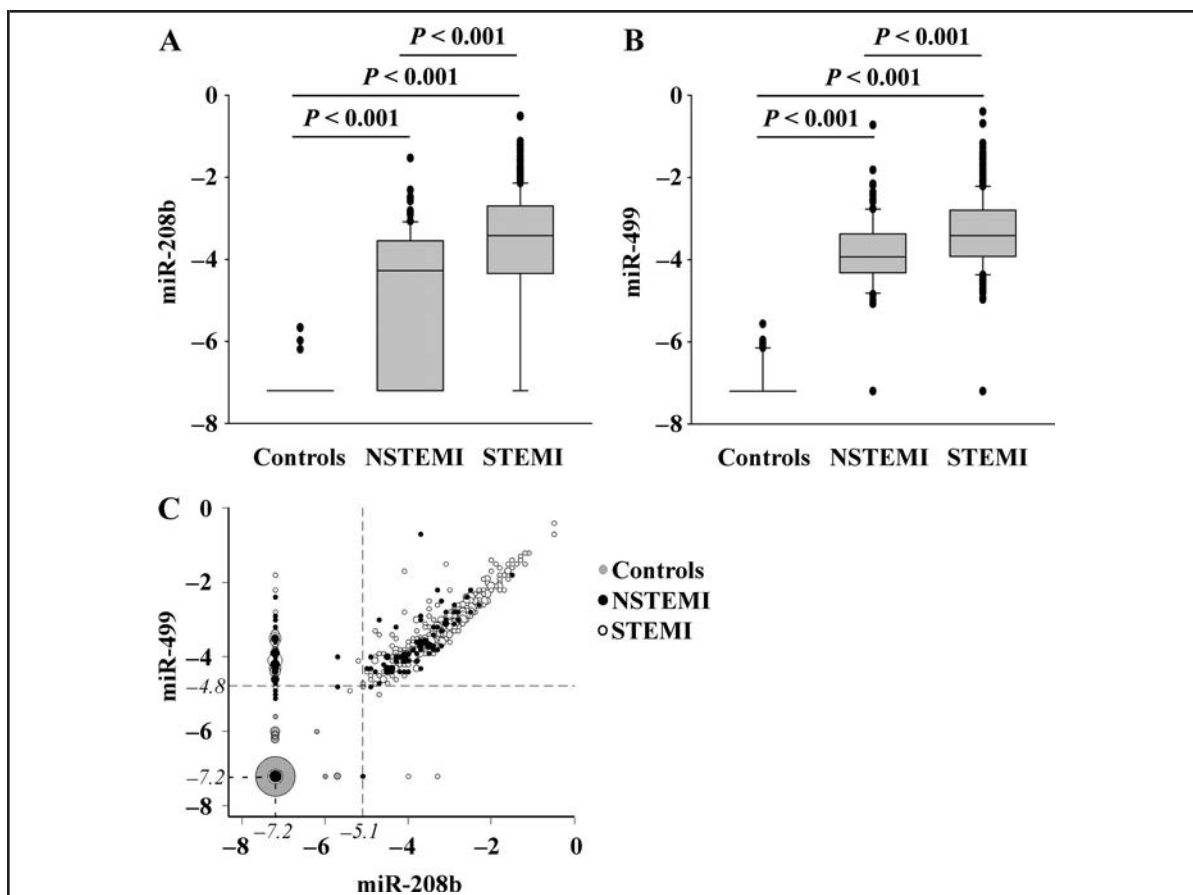


Fig. 1. Expression of (A) miR-208b and (B) miR-499 in the plasma of controls (n = 87) and patients with NSTEMI (n = 113) and STEMI (n = 397).

Blood samples for MI patients were obtained at presentation. Log-transformed values of miRNA expression are represented. (C), an expression value of -7.2 indicates that miRNA expression was undetectable. Cutoff values of -5.1 and -4.8 for miR-208b and miR-499 are indicated as dotted lines.

ever, miRNA expression in these controls was weak and very close to the limit of detection of the assay. Concentrations of miR-208b were detectable in 80% of MI patients and concentrations of miR-499 were detectable in 96%. In 3% of the patients concentrations of both miR-208b and miR-499 were undetectable. The mean miR-208b expression was 5×10^5 -fold higher in MI patients than in controls and miR-499 was 3×10^5 -fold higher than in controls (both $P < 0.001$). miR-208b and miR-499 had 8-fold and 2-fold higher expression in STEMI than in NSTEMI patients, respectively ($P < 0.001$). There was a clear discrimination between MI patients and controls (Fig. 1).

From these data, we determined the cutoff values of miRNAs corresponding to the 99th percentiles. Cutoff values of -5.1 and -4.8 were obtained for miR-208b and miR-499, respectively (Fig. 1).

miRNA CONCENTRATIONS CORRELATE WITH CONCENTRATIONS OF TRADITIONAL CARDIAC MARKERS

We next determined whether plasma miRNA concentrations measured at presentation in MI patients correlated with infarct size as determined by peak concentrations of CK and cTnT. We must acknowledge that CK may not be an optimal marker of infarct size after primary PCI. By multiple linear regression miR-208b and miR-499 were associated with peak concentrations of CK and cTnT (approximately 24 h). Correlations between miRNAs and peak concentrations of CK and cTnT were highly significant ($P < 10^{-9}$; Table 2). In addition, we observed significant correlations between miRNAs and initial concentration of hs-cTnT ($r > 0.4$, $P < 10^{-20}$; Table 2). These correlations were independent of the duration of chest pain (see online Supplemental Fig. 1).

Table 2. Correlation between miRNAs and cardiac markers in MI patients.^a

	CK	cTnT	hs-cTnT	miR-208b	miR-499
CK	1	0.78 ($<1 \times 10^{-20}$)	0.25 (1×10^{-7})	0.37 (1×10^{-17})	0.31 (1×10^{-12})
cTnT		1	0.36 (3×10^{-15})	0.36 (7×10^{-16})	0.29 (4×10^{-10})
hs-cTnT			1	0.49 ($<1 \times 10^{-20}$)	0.41 ($<1 \times 10^{-20}$)
miR-208b				1	0.88 ($<1 \times 10^{-20}$)
miR-499					1

^a Correlation coefficients with *P* values are indicated. CK: creatine kinase. Peak values of CK and cTnT, and miRNAs and hs-cTnT values at presentation, are considered in these analyses.

miRNAs ARE DETECTABLE AS EARLY AS 1 h AFTER THE ONSET OF CHEST PAIN

Overall, all 3 markers of myocardial injury, hs-cTnT, miR-208b, and miR-499 were detectable as soon as 1 h after the onset of chest pain. However, this was not the case for all patients. After 1 h of chest pain, 91% of patients had detectable miR-499 and a concentration of hs-cTnT above the 0.014 $\mu\text{g/L}$ cutoff (corresponding to the 99th percentile as recommended by the manufacturer of the hs-cTnT assay and by other investigators (2)). There were only 11 patients who presented that early after onset of chest pain.

Percentages of patients positive for the 3 markers (i.e., greater than the cutoff points) were determined according to the delay between the onset of chest pain and blood sampling (see online Supplemental Fig. 2). Overall, fewer patients were positive for miR-208b or cTnT than for miR-499 or hs-cTnT. We therefore focused our analyses on the comparison between miR-499 and hs-cTnT. In patients who presented early [<3 h after onset of pain ($n = 187$)], miR-499 was positive in 93% of patients and hs-cTnT in 88% of patients ($P = 0.78$). In patients who presented early and who turned out to have substantial infarcts ($\text{CK} > 1000$) ($n = 113$), 96% of patients were positive for miR-499 and 94% were positive for hs-cTnT ($P = 0.99$). In patients who presented >3 h after onset of pain ($n = 323$), the percentage of patients positive for miR-499 and hs-cTnT was also above 90%, independent of the presence of ST-elevation (see online Supplemental Data Fig. 2).

DIAGNOSTIC ACCURACY OF miRNAs AND hs-cTnT

We compared the diagnostic accuracy of miRNAs and hs-cTnT. Overall, miR-208b provided a lower diagnostic accuracy than miR-499 and hs-cTnT (Fig. 2). miR-499 and hs-cTnT were both able to accurately discriminate MI from controls (AUC 0.97) with comparable diagnostic sensitivity and specificity (see online Supplemental Data Table 1). Combined determination of miR-499 and hs-cTnT did not significantly improve the diagnostic value of single markers.

RECLASSIFICATION PERFORMANCE OF miR-499

We evaluated the capacity of miR-499 to reclassify patients misclassified by a model that included several risk factors—age, sex, hypertension, hypercholesterolemia, smoking habit, and hs-cTnT (Table 3). The addition of miR-499 to the clinical model did not significantly improve the diagnosis.

We next evaluated the ability of miR-499 to reclassify patients misclassified by a single measurement of hs-cTnT (see online Supplemental Table 2). Adding miR-499 to hs-cTnT did not result in an improvement of diagnosis.

miRNAs ARE MODERATE PREDICTORS OF LEFT VENTRICULAR DYSFUNCTION

In our cohort of MI patients, the ejection fraction measured by echocardiography at follow-up was available in 362 subjects (278 patients with STEMI and 84 patients without STEMI). miR-208b and miR-499 were inversely correlated to the ejection fraction, with correlation coefficients of -0.18 ($P = 0.0008$) and -0.17 ($P = 0.001$), respectively (see online Supplemental Fig. 3). The correlation was not significant in NSTEMI patients. A linear regression model attested that miR-208b was the best predictor of the ejection fraction ($P < 0.001$). Analysis of ROC curves revealed AUCs of 0.69 for miR-208b and 0.64 for miR-499 ($P = 0.02$) for prediction of left ventricular dysfunction defined as ejection fraction $<40\%$ (see online Supplemental Data Fig. 3). These data show that miR-208b and miR-499 are modest prognostic biomarkers of left ventricular dysfunction after MI.

Discussion

Our results show that circulating miRNAs are increased in patients with acute MI and barely detectable in healthy controls. miRNAs are present in the plasma as early as 1 h after the onset of chest pain and their diagnostic accuracy is robust.

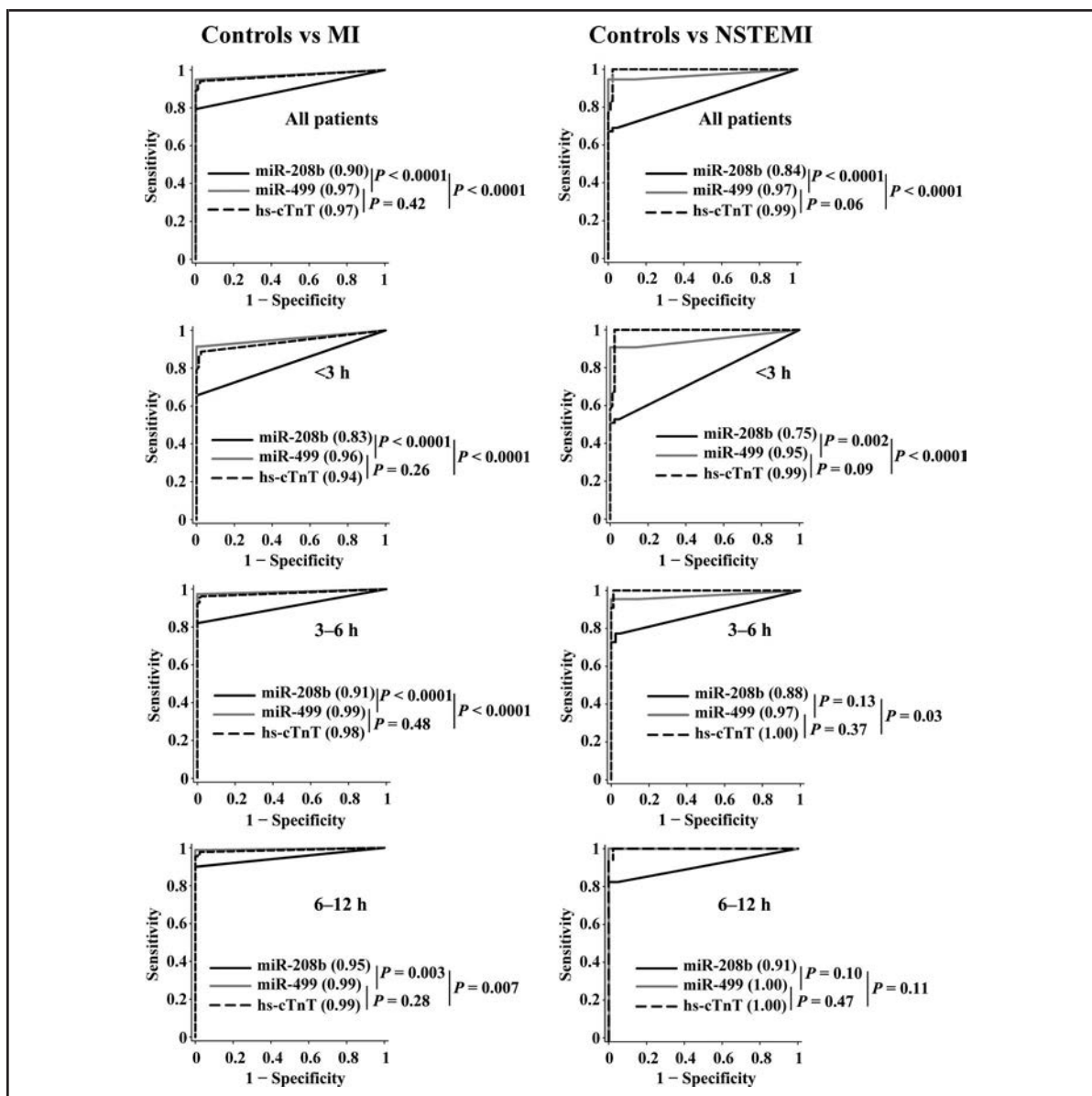


Fig. 2. ROC curves, which take the time of chest pain onset into account, of miRNAs and hs-cTnT.

miRNAs and hs-cTnT concentrations for 87 controls and 510 MI patients determined at presentation (113 NSTEMI and 397 STEMI). Left panels, ability of markers to discriminate MI from controls. Right panels, ability of markers to discriminate NSTEMI from controls. AUCs and *P* values are indicated.

In the present study, cardiac-enriched miRNAs, particularly miR-499, provided an accurate diagnosis of MI, comparable to hs-cTnT. These observations may become clinically important. Indeed, in the absence of ST elevation, the diagnosis of MI requires prolonged monitoring because serial testing is usually necessary to establish the diagnosis of myocardial injury with both standard and high-sensitivity assays. This is attributable to the fact that the troponin assays are ei-

ther not sensitive or not specific enough for the diagnosis of cardiac damage. A single measurement of circulating miRNAs may overcome this limitation and shorten the triage of patients with chest pain.

In patients presenting within 3 h of chest pain onset, there was positive expression of miR-499 in 93% of patients at presentation and positive expression of hs-cTnT in 88% of patients. Of note, all these patients had acute MI documented by typical serial electrocardio-

Table 3. Reclassification performance of miR-499 over a multiparameter clinical model.^a

Class	Clinical model			Clinical model + miR-499			NRI, % (95% CI)
	Test negative	Test positive	Correctly classified, %	Test negative	Test positive	Correctly classified, %	
Whole cohort							
Control (n = 87)	85 ^b	2 ^c	97.7	86 ^b	1 ^c	98.9	
Case (n = 510)	8 ^c	502 ^b	98.4	5 ^c	505 ^b	99.0	1.74 (−0.56 to 4.04) (P = 0.15)
STEMI							
Control (n = 87)	84 ^b	3 ^c	96.6	85 ^b	2 ^c	97.7	
Case (n = 397)	5 ^c	392 ^b	98.7	2 ^c	395 ^b	99.5	1.90 (−0.5 to 4.3) (P = 0.12)
NSTEMI							
Control (n = 87)	85 ^b	2 ^c	97.7	86 ^b	1 ^c	98.9	
Case (n = 113)	5 ^c	108 ^b	95.6	2 ^c	111 ^b	98.2	2.9 (−1.6 to 7.4) (P = 0.20)

^a Parameters included in the clinical model were: age, sex, hypertension, hypercholesterolemia, smoking habit, and hs-cTnT. Net reclassification indexes (NRI) (95% CI) and P values are indicated.

^b No. of correct classifications.

^c No. of false classifications.

gram changes and clinically significant release of cardiac markers, and all underwent mechanical reperfusion. In studies by Reichlin et al. (1) and Keller et al. (2), high-sensitivity troponin assays performed within 3 h of chest pain onset provided maximal diagnostic accuracies, with AUCs between 0.92 and 0.95, and AUCs remained stable for patients presenting later. Our data confirm that the diagnosis of MI with hs-cTnT is very accurate within the 3 h following onset of chest pain and extend this observation to miR-499. In addition, we found that miRNAs are detectable in human plasma as soon as 1 h after chest pain onset, supporting the evidence that miRNAs can be very early biomarkers of MI. However, this observation was limited by the low number of patients who presented that early after chest pain onset.

In our cohort of healthy volunteers, expression of miR-499 was hardly detectable, very close to the detection limit of the assay. In the same cohort, increased concentrations of hs-cTnT (above the 0.014 $\mu\text{g/L}$ cutoff point) were observed in 2%, which is lower than has been reported for patients with stable coronary artery disease (11%) (3). The difference may be explained by the fact that our volunteers had no evidence of left ventricular hypertrophy or reduced renal clearance, which are associated with increases of troponins.

In the present study, miR-499 appeared clearly superior to miR-208b for detecting cardiac damage. Both miRNAs are expressed by myosin heavy chains in cardiac or skeletal muscle (21, 22). The importance of miR-499 in the heart is supported by the observation that miR-499 belongs to a group of 28 miRNAs that are

upregulated in the failing heart and normalized after implantation of a left ventricular assist device (23). Although peripheral concentrations of miR-208b are increased in patients with coronary artery disease, this is not the case for miR-499 (22). miR-499 and miR-208b, which share many targets, are associated with cardiac differentiation (24, 25). Therefore, several lines of evidence indicate that miRNAs are not simple bystanders of cardiac damage.

The observation that miRNAs correlate with the ejection fraction at follow-up indicates that miRNAs may also provide information about prognosis. This is consistent with the findings that miRNAs are functionally implicated in the course of cardiac remodeling and heart failure (26). However, in our study, miR-208b and miR-499 provided only a modest prognosis of left ventricular dysfunction, with AUCs below 0.70. These findings do not exclude the possibility that other miRNAs can be good prognostic biomarkers of heart failure, as recently reported for miR-423-5p (27). Interestingly, miRNAs were correlated only with the ejection fraction in STEMI patients.

The current study had some limitations. First, the study cohort may not adequately reflect the population of patients presenting to the emergency department for acute chest pain. All patients had clinically significant electrocardiogram changes and significant myocardial injury, which can explain the increased AUC of hs-cTnT (0.97). However, a similar AUC (0.96) was reported by Reichlin et al. (2). Our study also did not include patients with small MI, unstable angina pectoris, heart failure, arrhythmias, or chronic cardiac disorders. Second, the group of patients with NSTEMI was

rather small. This was attributable to the fact that emergent PCI (at <12 h of chest pain) is mainly performed in patients with ST-elevation. This may change in the near future if the use of early biomarkers such as hs-cTnT and miRNAs makes earlier diagnosis possible in patients without ST-elevation. Third, the control group consisted of volunteers who were relatively young, healthy males (median age 53 years), whereas 25% of MI patients were females. However, circulating concentrations of miRNAs were not influenced by age and sex in this cohort, nor in our previous study cohort (17). Fourth, kidney function plays a role in the clearance of many biomarkers. However, we have observed that kidney function does not affect circulating miRNAs, at least not for patients who do not require hemodialysis, and we have shown that urine concentrations of miRNAs are very low (17). In our cohort, only 3 patients were on chronic hemodialysis. Whether miRNAs are chronically increased in this patient population to the same extent as cTnT remains to be determined. Fifth, although the concentration of hs-cTnT can be measured in 9 min, determination of circulating miRNAs by PCR requires at least 2 h. Nevertheless, it can be expected that substantial progress will be made in this area, and current research is focusing on rapid detection of miRNAs.

Author Contributions: All authors confirmed they have contributed to the intellectual content of this paper and have met the following 3 requirements: (a) significant contributions to the conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; (b) drafting or revising the article for intellectual content; and (c) final approval of the published article.

Authors' Disclosures or Potential Conflicts of Interest: Upon manuscript submission, all authors completed the Disclosures of Potential Conflict of Interest form. Potential conflicts of interest:

Employment or Leadership: None declared.

Consultant or Advisory Role: None declared.

Stock Ownership: None declared.

Honoraria: None declared.

Research Funding: Society for Research on Cardiovascular Diseases, the Ministry of Culture, Higher Education and Research of Luxembourg, and the National Fund of Research of Luxembourg; Y. Devaux, National Funds for Research, Luxembourg; E. Goretti, National Funds for Research, Luxembourg.

Expert Testimony: None declared.

Role of Sponsor: The funding organizations played no role in the design of study, choice of enrolled patients, review and interpretation of data, or preparation or approval of manuscript.

Acknowledgments: We thank Malou Glesener, Loredana Jacobs, Céline Jeanty, Laurent Quennery, and Nicolas Sauvageot for expert technical assistance.

References

- Keller T, Zeller T, Peetz D, Tzikas S, Roth A, Czyz E, et al. Sensitive troponin I assay in early diagnosis of acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2009;361:868–77.
- Reichlin T, Hochholzer W, Bassetti S, Steuer S, Stelzig C, Hartwiger S, et al. Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. *N Engl J Med* 2009;361:858–67.
- Omland T, de Lemos JA, Sabatine MS, Christophi CA, Rice MM, Jablonski KA, et al. A sensitive cardiac troponin T assay in stable coronary artery disease. *N Engl J Med* 2009;361:2538–47.
- Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 2010;466:835–40.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843–54.
- Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol* 2008;26:462–9.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:10513–8.
- Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J* 2010;31:659–66.
- Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391:73–7.
- D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2010;31:2765–73.
- Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, Nishimura K, Hirokawa G, Goto Y, et al. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 2010;56:1183–5.
- Bostjancic E, Zidar N, Stajer D, Glavac D. MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction. *Cardiology* 2010;115:163–9.
- Ji X, Takahashi R, Hiura Y, Hirokawa G, Fukushima Y, Iwai N. Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem* 2009;55:1944–9.
- Cheng Y, Tan N, Yang J, Liu X, Cao X, He P, et al. A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. *Clin Sci* 2010;119:87–95.
- Shi B, Guo Y, Wang J, Gao W. Altered expression of microRNAs in the myocardium of rats with acute myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord* 2010;10:11.
- Meder B, Keller A, Vogel B, Haas J, Sedaghat-Hamedani F, Kayvanpour E, et al. MicroRNA signatures in total peripheral blood as novel biomarkers for acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2011;106:13–23.
- Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, et al. Circulating microRNA-208b and microRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2010;3:499–506.
- Gupta SK, Bang C, Thum T. Circulating microRNAs as biomarkers and potential paracrine mediators of cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2010;3:484–8.
- Pencina MJ, D'Agostino RB Sr, Steyerberg EW. Extensions of net reclassification improvement calculations to measure usefulness of new biomarkers. *Stat Med* 2010;30:11–21.
- Pencina MJ, D'Agostino RB Sr, D'Agostino RB Jr, Vasan RS. Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Stat Med* 2008;27:157–72.
- van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell* 2009;17:662–73.
- Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res* 2010;107:677–84.
- Matkovich SJ, Van Booven DJ, Youker KA, Torre-Amione G, Diwan A, Eschenbacher WH, et al. Reciprocal regulation of myocardial microRNAs

- and messenger RNA in human cardiomyopathy and reversal of the microRNA signature by biomechanical support. *Circulation* 2009;119:1263–71.
24. Epstein JA, Franklin H. Epstein Lecture. Cardiac development and implications for heart disease. *N Engl J Med* 2010;363:1638–47.
25. Wilson KD, Hu S, Venkatasubrahmanyam S, Fu JD, Sun N, Abilez OJ, et al. Dynamic microRNA expression programs during cardiac differentiation of human embryonic stem cells: role for miR-499. *Circ Cardiovasc Genet* 2010;3:426–35.
26. Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW, et al. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* 2007;116:258–67.
27. Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, Pinto YM. MiR423–5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res* 2010;106:1035–9.

- Association entre les miARN circulants, les facteurs de risque CV et le pronostic après IM

Le potentiel diagnostique des miARN circulants a tout d'abord été testé dans des études à petite échelle qui reportaient une valeur diagnostique robuste des miARN enrichis dans le cœur ¹⁰⁵. Cependant, les études à grande échelle n'ont pas permis de confirmer ces résultats ⁷⁴. Cela peut s'expliquer par le fait que le taux de miARN circulants est modulé par de nombreux éléments, tels que la taille de l'IM, ou encore l'âge ou le genre des patients ⁷⁴. Après avoir mesuré les taux circulants de miR-208b et le miR-499 dans la cohorte LUCKY, nous avons retravaillé sur les données recueillies sur ces patients. En effet, les données récoltées sur les patients contenaient de nombreux éléments tels que la présence de facteurs de risque CV et leur suivi après IM.

Cette étude a donc servi à nouveau afin de mettre en évidence l'existence de potentielles associations entre les taux des miARN circulants miR-208b et miR-499, les facteurs de risque CV et le pronostic après IM.

Cette étude est basée sur des analyses statistiques effectuées sur les données obtenues sur la cohorte LUCKY. Les patients ont été suivis jusqu'à 6 ans après IM.

Nous avons obtenu les résultats suivants:

- Après analyses multivariées, le taux de miR-208b circulant est significativement associé avec l'âge, l'IMC et l'hypertension alors que le taux de miR-499 est associé avec l'hypertension. Des analyses univariées ont confirmé l'association entre le taux de miR-208b, et l'âge ou l'IMC.

- L'âge médian de la population est de 62 ans. Les patients de plus de 62 ans ont 2,3 fois plus de miR-208b circulants que les patients plus jeunes. L'IMC médian de la population est de 27. Il n'y a pas de différence de taux de miR-208b entre les patients avec IMC>27, comparés à ceux avec IMC<27. Par contre, les patients obèses (IMC>30) âgés (>62ans) ont 4,6 fois plus de miR-208b circulants que les patients non obèses (IMC<25) et jeunes (<62 ans).

- La hs-cTnT est associée uniquement avec l'âge dans les analyses univariées et multivariées.

- Nous nous sommes ensuite intéressés au pronostic après IM. Par analyses multivariées, nous avons montré que la mortalité à l'hôpital est associée avec l'âge, l'hypercholestérolémie, et la hs-cTnT. La mortalité à 4 mois est associée à l'âge et la hs-cTnT. La mortalité à 1 et 6 ans est associée à l'âge uniquement. Aucun des deux miARN circulants mesurés n'a d'association significative avec la mortalité des patients à l'hôpital, à 4 mois, 1 et 6 ans. L'association de l'âge avec la mortalité à 6 ans se vérifie sur les courbes de Kaplan-Meier.

Cette étude a montré que les taux de miR-208b circulants et la hs-cTnT sont associés principalement à l'âge. Mais aucun des deux miARN ou la hs-cTnT ne permettent d'établir un pronostic de mortalité à 6 ans des patients après IM. Les miARN circulants sont donc modulés par les facteurs de risque CV, cela est donc à prendre en compte lors des analyses de leur capacité en tant que biomarqueurs.

- [12] Cohen DJ, Doucet M, Cutlip DE, Ho KK, Popma JJ, Kuntz RE. Impact of smoking on clinical and angiographic restenosis after percutaneous coronary intervention: another smoker's paradox? *Circulation* 2001;104:773–8.
- [13] Weisz G, Cox DA, Garcia E, et al. Impact of smoking status on outcomes of primary coronary intervention for acute myocardial infarction – the smoker's paradox revisited. *Am Heart J* 2005;150:358–64.
- [14] Sherif MA, Nienaber CA, Toelg R, et al. Impact of smoking on the outcome of patients treated with drug-eluting stents: 1-year results from the prospective multicentre German Drug-Eluting Stent Registry (DES.DE). *Clin Res Cardiol* 2011;100:413–23.
- [15] Goto K, Nikolsky E, Lansky AJ, et al. Impact of smoking on outcomes of patients with ST-segment elevation myocardial infarction (from the HORIZONS-AMI Trial). *Am J Cardiol* 2011;108:1387–94.
- [16] Rakowski T, Siudak Z, Dziewierz A, Dubiel JS, Dudek D. Impact of smoking status on outcome in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *J Thromb Thrombolysis* 2012;34:397–403.
- [17] Lin GM, Li YH, Lin CL, Wang JH, Han CL. Relation of body mass index to mortality among Asian patients with obstructive coronary artery disease during a 10-year follow-up: A report from the ET-CHD registry. *Int J Cardiol* 2013 Sep 20;168(1):616–20.
- [18] Lin GM, Li YH, Lin CL, Wang JH, Han CL. Seasonal variation in cardiac death of patients with angiographic coronary artery disease from the ET-CHD registry, 1997–2006. *Int J Cardiol* 2013;168(3):3090–2.
- [19] Lin GM, Li YH, Lin CL, Wang JH, Han CL. Gender differences in the impact of diabetes on mortality in patients with established coronary artery disease: a report from the Eastern Taiwan integrated health care delivery system of Coronary Heart Disease (ET-CHD) registry, 1997–2006. *J Cardiol* 2013;61:393–8.
- [20] Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ* 2003;327:557–60.
- [21] Shah AM, Pfeffer MA, Hartley LH, et al. Risk of all-cause mortality, recurrent myocardial infarction, and heart failure hospitalization associated with smoking status following myocardial infarction with left ventricular dysfunction. *Am J Cardiol* 2010;106:911–6.
- [22] Nakatani D, Sakata Y, Sato H, et al. Clinical impact of metabolic syndrome and its additive effect with smoking on subsequent cardiac events after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2007;99:885–9.
- [23] Berger JS, Bhatt DL, Steinhubl SR, et al. Smoking, clopidogrel, and mortality in patients with established cardiovascular disease. *Circulation* 2009;120:2337–44.
- [24] Bliden KP, Dichiaro J, Lawal L, et al. The association of cigarette smoking with enhanced platelet inhibition by clopidogrel. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:531–3.
- [25] Yasue H, Kugiyama K. Coronary spasm: clinical features and pathogenesis. *Intern Med* 1997;36:760–5.

0167-5273/\$ – see front matter © 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jccard.2013.06.093>

Association between circulating microRNAs, cardiovascular risk factors and outcome in patients with acute myocardial infarction [☆]



Emeline Goretti ^{a,1}, Mélanie Vausort ^{a,1}, Daniel R Wagner ^{a,b,1}, Yvan Devaux ^{a,*}

^a *Laboratory of Cardiovascular Research, Centre de Recherche Public de la Santé, Luxembourg*

^b *Division of Cardiology, Centre Hospitalier, Luxembourg*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 May 2013

Accepted 30 June 2013

Available online 19 July 2013

Keywords:

MicroRNAs

Cardiovascular risk factors

Troponin

Survival

Myocardial infarction

MicroRNAs (miRNAs) are highly conserved short noncoding RNAs that regulate gene expression through repression of target messenger RNA translation or destabilization. MicroRNAs regulate multiple biological functions in the healthy and diseased heart, thereby contributing to disease development. The biomarker value of circulating miRNAs has been extensively tested, especially for acute myocardial infarction (AMI). Initial small scale studies reported robust diagnostic value for AMI for cardiac-enriched miRNAs [1]. However, their biomarker potential was recently questioned by larger studies showing a failure of these miRNAs to improve the diagnostic value of high-sensitivity cardiac troponins [2,3].

This new development may be explained by the fact that circulating levels of miRNAs may be influenced by confounding factors. Infarct size

probably has the strongest effect on circulating levels of cardiac-enriched miRNAs. miRNA expression is also associated with age and gender in patients with acute coronary syndrome [3]. A recent study by Seeger et al. reported that circulating miRNA levels are affected by age and heart failure [4]. However, so far, the influence of cardiovascular risk factors on circulating levels of miRNAs has not been investigated in patients with AMI. Also, it is still uncertain whether miRNAs can be used to predict outcome of these patients.

We enrolled 510 consecutive patients with AMI referred to the Luxembourg Heart Institute for emergent primary percutaneous coronary intervention. Blood samples were obtained at presentation for measurement of miRNA concentrations by quantitative PCR and high sensitivity cardiac troponin T (hs-cTnT), as previously described [2]. Patients were followed up for up to 6 years. The protocol conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki and has been approved by the local ethics committee. All subjects signed an informed consent. Patient characteristics have been described [2].

Two cardiac-enriched miRNAs were investigated in this study, miR-208b and miR-499. Plasma levels of these miRNAs, also called myomiRs since they regulate cardiac myosin isoform expression, are highly up-regulated after MI and therefore constitute potential cardiac biomarkers [5].

Multivariable analyses using linear regression were conducted to search for associations between circulating levels of miR-208b and miR-499, and the following risk factors: age, gender, obesity (as assessed by the body mass index, BMI), diabetes, hypertension, hypercholesterolemia, and smoking habit. As shown in Table 1, miR-208b was significantly associated with age, BMI and hypertension, and miR-499 was significantly associated with hypertension. In univariable analyses, only the associations between miR-208b, age and BMI remained significant.

Median age of the population was 62. We observed that patients older than 62 had, on average, 2.3-fold higher levels of miR-208b compared to younger patients (age < 62) (P = 0.005). MiR-208b levels were

[☆] Grant support. This study was supported by the Society for Research on Cardiovascular Diseases, the Ministry of Culture, Higher Education and Research of Luxembourg, and the National Research Fund of Luxembourg (grant # 785036). E.G. received a fellowship from the National Research Fund of Luxembourg.

* Corresponding author at: Laboratory of Cardiovascular Research, CRP – Santé, L1150, Luxembourg. Tel.: +352 26970300; fax: +352 26970396.

E-mail address: yvan.deviaux@crp-sante.lu (Y. Devaux).

¹ This author takes responsibility for all aspects of the reliability and freedom from bias of the data presented and their discussed interpretation.

Table 1
Multivariable and univariable linear regression analysis for the association between miRNAs, hs-cTnT and cardiovascular risk factors.

Variable	miR-208b				miR-499				hs-cTnT			
	Multivariable		Univariable		Multivariable		Univariable		Multivariable		Univariable	
	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P
Age	0.14	0.011	0.10	0.031	0.09	0.12			0.16	0.004	0.12	0.006
Gender	-0.03	0.48			-0.004	0.93			-0.03	0.46		
BMI	0.10	0.042	0.09	0.044	0.08	0.09			0.01	0.78		
Diabetes	0.08	0.07			0.003	0.54			0.01	0.89		
Hypertension	-0.14	0.004	-0.07	0.10	-0.13	0.009	-0.08	0.06	-0.05	0.27		
Hypercholesterolemia	0.02	0.69			-0.002	0.96			0.01	0.75		
Smoking habit	-0.01	0.84			-0.47	0.64			0.03	0.51		

Results of univariable analyses are shown only when associations were significant in multivariable analysis. B: beta factor. P: P value.

comparable between patients with a BMI above or below the median value of the population, which was 27. However, obese patients (BMI ≥ 30) over 62 (n = 56) had 4.6-fold higher levels of miR-208b compared to non-obese patients (BMI < 25) below 62 (n = 78) (P = 0.005). Therefore, older age and obesity are associated with elevated plasma levels of miR-208b. This observation contrasts with a previous study by Widera et al. who reported an inverse relationship between miR-208b and age in patients with acute coronary syndrome [3]. A possible explanation for this discrepancy is that 26% of patients enrolled in the study by Widera et al. had unstable angina pectoris, while only patients with AMI were enrolled in our study. The finding that miRNAs are regulated upon cell ageing [4] is consistent with our observation that circulating levels of miR-208b are affected by age in patients with AMI.

The association between miR-208b and BMI observed in the present study was not evidenced in our previous study in patients with diastolic dysfunction [5]. In addition, in the study by Eitel et al. in patients with AMI, miR-133a was not affected by BMI [6]. There were no significant relationships between miRNAs and other cardiovascular risk factors

such as diabetes, gender, hypercholesterolemia and smoking habit. In contrast, in the Widera study, miR-499 was associated with gender, and miR-1 and miR-133a were associated with smoking habit [3]. Furthermore, plasma miRNA levels were associated with diabetes in some [7,8] but not all [3,6,9] studies. Overall, these results, strongly dependent on patient characteristics, are consistent with an association between circulating levels of miRNAs and cardiovascular risk factors.

Levels of hs-cTnT were associated with age in both multivariable and univariable analyses (Table 1). This association is consistent with the correlation between miR-208b and hs-cTnT (r = 0.49, P < 10⁻²⁰) reported previously [2]. Elevation of troponin T levels is a frequent clinical observation in the elderly that often requires serial testing.

We next investigated the prognostic value of miRNAs, cardiovascular risk factors, and hs-cTnT. Eight patients (1.6%) died during hospital stay. 481 patients (94%) had a 4-month follow-up, 457 patients (90%) had a 1-year follow-up, and 461 patients (90%) had a follow-up between the 2nd and the 6th year following MI. 18 patients (3.5%) died during the 4 months following MI, 6 patients (1.2%) died between 4 months and

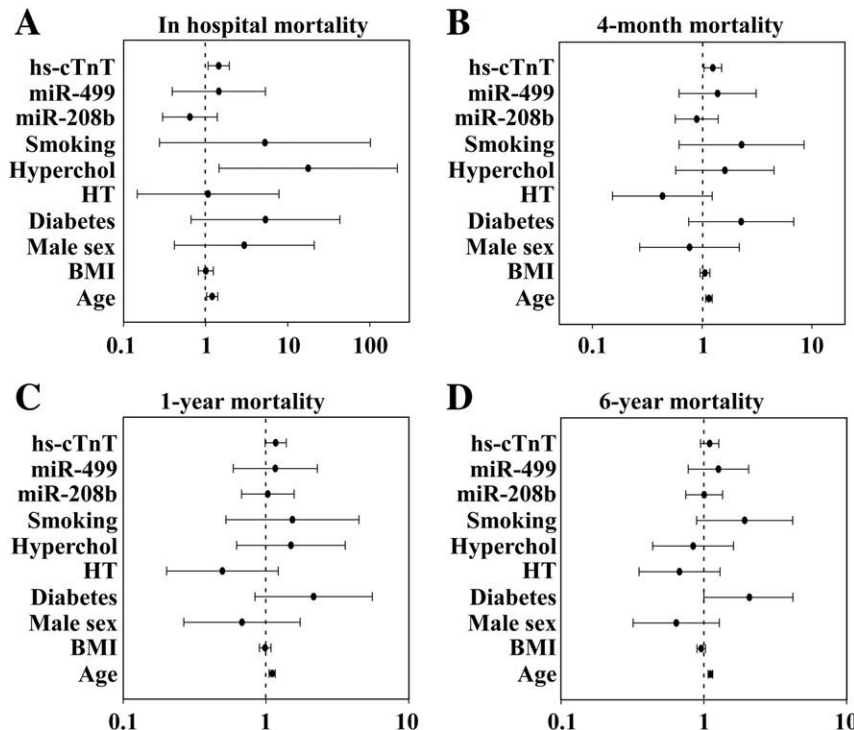


Fig. 1. Risk estimates for cardiovascular risk factors, hs-cTnT, and miRNAs. Plasma levels of miR-208b, miR-499 and hs-cTnT were measured at presentation in 510 MI patients. Multiple logistic regression was used to determine the ability of cardiovascular risk factors, miRNAs, and hs-cTnT to predict in-hospital mortality (A), 4-month mortality (B), 1-year mortality (C) and 6-year mortality (D). Odds ratio with 95% confidence intervals is shown. HT: hypertension; hyperchol: hypercholesterolemia.

1 year, and 32 patients (6.3%) died between the 2nd and the 6th year following MI. Overall, the 6-year mortality rate was 12.5%. Multivariable analyses identified the following independent predictors of in-hospital mortality (Fig. 1A): age (odds ratio (OR) 1.20, 95% confidence interval (CI) [1.03–1.40], $P = 0.02$), hypercholesterolemia (OR 17.71, 95% CI [1.46–215.52], $P = 0.02$), and hs-cTnT (OR 1.44, 95% CI [1.07–1.94], $P = 0.02$). As shown in Fig. 1B, age (OR 1.15, 95% CI [1.08–1.24], $P < 0.001$) and hs-cTnT (OR 1.25, 95% CI [1.04–1.51], $P = 0.02$) also predicted mortality at 4 months. Age was the sole significant predictor of 1-year (OR 1.11, 95% CI [1.05–1.16], $P < 0.001$), and 6-year (OR 1.11, 95% CI [1.07–1.16], $P < 0.001$) mortality (Fig. 1C–D).

When patients were divided into tertiles of age (30–55, 55–70 and 70–91 years), the Kaplan–Meir survival analysis confirmed the association between age and mortality (Log-Rank statistic 41.3, $P < 0.001$). Therefore, age, hypercholesterolemia and hs-cTnT are predictors of early mortality after MI, and only age has a significant long-term predictive value.

Although we previously observed that neither miR-208b nor miR-499 was associated with left ventricular function 4-months after MI [2], they were not significant predictors of mortality. Similarly, circulating levels of miR-133a were correlated with myocardial damage after AMI but did not independently predict the occurrence of major adverse cardiovascular events [6]. In patients with acute coronary syndrome, miR-208b – not miR-499 – was a significant, albeit modest, predictor of 6-month mortality [3]. Overall, these data do not support a strong prognostic value for cardiac-enriched miRNAs after AMI. Of note, in both our study and the study by Widera and colleagues [3], the prognostic value of hs-cTnT was of borderline significance.

In conclusion, circulating levels of miR-208b and hs-cTnT measured at presentation in AMI patients are affected by age. Neither miR-208b and miR-499, nor hs-cTnT, was a significant predictor of 6-year mortality in this cohort. The influence of cardiovascular risk factors on plasma levels of miRNAs has to be taken into account when analysing their biomarker value. Other miRNAs than prototypic cardiac miRNAs may be of prognostic utility, as suggested recently [10].

References

- [1] Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res* 2012;110:483–95.
- [2] Devaux Y, Vausort M, Goretti E, et al. Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction. *Clin Chem* 2012;58:559–67.
- [3] Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM, et al. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 2011;51:872–5.
- [4] Seeger T, Haffez F, Fischer A, et al. Immunosenescence-associated microRNAs in age and heart failure. *Eur J Heart Fail* 2013;15:385–93.
- [5] Corsten MF, Dennert R, Jochems S, et al. Circulating microRNA-208b and microRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2010;3:499–506.
- [6] Eitel I, Adams V, Dieterich P, et al. Relation of circulating microRNA-133a concentrations with myocardial damage and clinical prognosis in ST-elevation myocardial infarction. *Am Heart J* 2012;164:706–14.
- [7] Caporali A, Meloni M, Vollenkle C, et al. Deregulation of microRNA-503 contributes to diabetes mellitus-induced impairment of endothelial function and reparative angiogenesis after limb ischemia. *Circulation* 2011;123:282–91.
- [8] Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res* 2010;107:810–7.
- [9] Ai J, Zhang R, Li Y, et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391:73–7.
- [10] Devaux Y, Vausort M, McCann GP, et al. MicroRNA-150: a novel marker of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Genet* 2013;6:290–8.

Etude n°3: Détermination de la capacité diagnostique et pronostique des miARN circulants chez des patients avec ICA (cohorte LARIBOISIERE)

L'ICA est une maladie associée à un haut risque de mortalité et de réadmission à l'hôpital³⁴. Même si de nombreux peptides comme le BNP permettent d'améliorer le diagnostic et le traitement à court ou long terme, ces peptides sont insuffisants pour prédire le devenir des patients⁴².

Cette 3^{ème} étude a donc eu pour but d'évaluer la capacité diagnostique et pronostique de 5 miARN chez des patients avec ICA:

- Le miR-1, connu pour être impliqué dans l'hypertrophie.
- Le miR-21, impliqué dans l'apoptose et la fibrose.
- Le miR-23, connu pour être associé à l'hypertrophie, l'apoptose et l'angiogenèse.
- Le miR-126, connu comme angiomiR, impliqué dans l'angiogénèse.
- Le miR-423-5p, qui est augmenté chez les IC et associé avec le diagnostic de l'ICA.

Pour cela, nous avons mené une étude prospective unicentrique comprenant 294 patients avec dyspnée aiguë hospitalisés aux urgences ou aux soins intensifs de l'hôpital Lariboisière à Paris entre février 2008 et juin 2011. Le diagnostic final a été déterminé par 2 médecins seniors spécialisés en IC, grâce aux paramètres cliniques et biologiques comme le taux de BNP. Parmi les 294 patients avec dyspnée aiguë, 236 ont une dyspnée reliée à une ICA et 58 non reliée à une ICA. Environ la moitié des patients avec ICA ont un passé d'IC (123 ICA décompensés) et les 113 autres souffrent d'ICA de novo. Les plasmas de 44 patients avec ICC stable ont également été inclus. Nous avons mesurés l'expression de ces 5 miARN circulants à l'admission et 5 jours plus tard, par PCR quantitative. Les patients ont été suivis durant 1 an.

Nous avons obtenu les résultats suivant:

- Nous avons mesuré les taux de ces miARN circulants à l'admission dans tous ces groupes: le taux de miR-1 est surexprimé dans le plasma des patients avec dyspnée non reliée à de l'ICA, comparés aux autres patients avec IC. Les taux de miR-126 et miR-423-5p sont surexprimés chez les patients avec ICC stable comparés aux autres groupes. Par contre, les miARN circulants miR-21 et miR-23 sont stables parmi les 3 groupes.

- Aucun des 5 miARN n'a de capacité diagnostique supérieure au BNP (AUC <0,7 pour les 5 miARN, alors que le BNP a eu une AUC de 0,97).

- Nous nous sommes ensuite intéressés à l'évolution du taux de miARN circulants, entre l'admission et 5 jours plus tard, chez 64 patients. Tous ces miARN restent stables chez les patients avec ICA. Par contre, chez les patients avec dyspnée non reliés à de l'ICA, les miR-23/-126/-423-5p diminuent après 5 jours.

- Nous avons ensuite recherché s'il existait une association entre les taux de miARN circulants à l'admission et une réadmission à l'hôpital dans l'année suivante, chez les patients avec ICA. Un an après, 17% des patients avec ICA sont décédés et 75% ont été réadmis à l'hôpital, en majorité pour des MCV. Beaucoup des paramètres classiques de congestion ou d'altérations cardiaques ne sont pas associés avec une réadmission, comme le BNP. Par contre, les taux de miR-21/-126/-423-5p sont inférieurs chez les patients réadmis dans l'année par rapport à ceux qui ne l'ont pas été. Les taux de miARN ne sont pas différents entre les patients décédés et les survivants.

- Parmi tous les marqueurs biologiques classiques et les taux de miARN circulants, seul le miR-423-5p a une capacité pronostique significative, avec un OR ajusté à de multiples paramètres cliniques de 0,7. Aucun de ces miARN n'est associé avec la mortalité.

Même si ces miARN sont régulés chez les patients avec ICA, aucun d'entre eux n'a de valeur diagnostique ou ne dépasse le BNP. Nous avons également démontré qu'un faible taux de miR-423-5p à l'admission chez ces patients est associé avec une réadmission dans l'année suivante. Cette étude suggère que le miR-423-5p est un biomarqueur pronostique de l'ICA.

Word counts: 2435 (text), XX (abstract)

Circulating MicroRNAs and Outcome in Patients with Acute Heart Failure

Short title: microRNAs and heart failure

Marie-France Seronde^{1,2}, MD; Emeline Goretti³, MSc; Mélanie Vausort³, MSc; Etienne Gayat^{2,4}, MD, PhD; Nicolas Vodovar², MD; Malha Sadoune², MD; Jane-Lise Samuel², MD; Thomas Thum⁵, MD-PhD; Alain Cohen Solal^{2,6}, MD-PhD; Said Laribi^{2,7}, MD, PhD; Patrick Plaisance, MD, PhD^{2,7}; Daniel R. Wagner³, MD-PhD; Alexandre Mebazaa², MD-PhD; Yvan Devaux³, PhD; for the GREAT network.

¹Department of Cardiology, EA3920, University Hospital, Besançon, France; ²UMRS 942 Inserm ; University Paris Diderot, France; ³Laboratory of Cardiovascular Research, Centre de Recherche Public de la Santé, Luxembourg; ⁴Department of Anesthesiology and Critical Care Saint Louis - Lariboisière Hospital, Paris, France; ⁵Institute of Molecular and Translational Therapeutic Strategies (IMTTS), Hannover, Germany; ⁶Department of Cardiology, Lariboisière Hospital, Paris, France; ⁷Department of Emergency Medicine, Lariboisière Hospital, Paris, France.

Address for correspondence: Yvan Devaux

Laboratory of Cardiovascular Research - Centre de Recherche Public de la Santé ; 84 rue Val Fleuri L-1526 Luxembourg

Tel +352 26970300 ; Fax +352 26970396 ; Email : yvan.devaux@crp-sante.lu

Financial or ethical conflicts of interest: none.

Funding: This work was supported by a grant from the National Fund for Research of Luxembourg (# 785036). EG received a fellowship from the National Fund of Research of Luxembourg. NV is supported by a post-doctoral fellowship from the European Commission's Seventh Framework programme under grant agreement N° 305507 (HOMAGE).

ABBREVIATIONS LIST

ADHF: acute decompensated heart failure

AHF: acute heart failure

AUC: area under the curve

BNP: brain natriuretic peptide

CCU: cardiac care unit

CHF: chronic heart failure

CI: confidence interval

ED: emergency department

ESC: european society of cardiology

HF: heart failure

miRNA: microRNA

ROC: receiver operating characteristic

OR: odds ratio

ABSTRACT

Background The biomarker value of circulating microRNAs (miRNAs) has been extensively addressed in patients with acute coronary syndrome. However, the diagnostic and prognostic performances of miRNAs in patients with acute heart failure (AHF) has received less attention.

Methods 294 patients with acute dyspnea (236 AHF and 58 non-AHF) and 44 patients with stable chronic heart failure (CHF) were included. Circulating levels of miR-1/-21/-23/-126/-423-5p were assessed in plasma samples obtained at admission and after 5 days.

Results At admission, levels of miR-21 and miR-23 were comparable among AHF, non-AHF and CHF patients. Levels of miR-1 were lower in AHF and stable CHF patients compared to non-AHF patients ($p=0.0016$). Levels of miR-126 and miR-423-5p were lower in AHF and in non-AHF patients compared to stable CHF patients (both $p<0.001$). All miRNAs had a poor diagnostic value for AHF. During the 5 days post admission, miRNA levels were stable in AHF patients. In non-AHF patients, levels of miR-23, miR-126 and miR-423-5p decreased over the same period. Interestingly, admission levels of miR-423-5p were lower in patients who were re-admitted to the hospital in the year following the index hospitalization compared to patients who were not ($p=0.0001$). Adjusted odds ratios [95% confidence interval] for one-year readmission was 0.70 [0.53-0.93] for miR-423-5p ($p=0.01$). Admission levels of the five miRNAs were not associated with one-year mortality.

Conclusions In AHF patients, low circulating levels of miR-423-5p at presentation are associated with hospital readmission. This study supports the value of miR-423-5p as prognostic biomarker of AHF.

INTRODUCTION

Acute heart failure (AHF) carries a high mortality risk and a high incidence of hospital readmission.¹ Various circulating peptides, including natriuretic peptides, have been shown to be of interest to improve the diagnosis and guidance of short and long term therapy in AHF patients but are poorly associated with outcome.² Recently, the 22 nucleotide-long non coding microRNAs (miRNAs) that are known to modulate gene expression have gained attention as potential biomarkers.³

Since the discovery of miRNA presence in the bloodstream^{4,5}, the potential of miRNAs to aid in disease management has been an active field of investigation. Their ability to diagnose patients with cardiovascular disease has been thoroughly addressed in small scale studies (reviewed in⁶). Subsequently, the diagnostic performance of circulating miRNAs was assessed in larger cohorts of patients with acute coronary syndrome⁷ and acute myocardial infarction.⁸ In addition, some miRNAs were found to be prognostically valuable.^{7,9-11}

So far, the investigation of the biomarker value of circulating miRNAs has received less attention in the critically ill. Tijssen et al. identified a set of 6 miRNAs in HF patients among which miR-423-5p was strongly associated with AHF.¹² Fukushima et al. observed that circulating levels of miR-126 were negatively correlated with disease severity in patients with HF.¹³ We found in AHF patients an elevation of circulating levels of cardiac-enriched miR-499.¹⁴ It is worth mentioning that the results of these studies are limited by relatively small population size (< 40 cases).¹²⁻¹⁴

In the present study, we assessed the diagnostic and prognostic performance of 5 miRNAs (miR-1/-21/-23/-126/-423-5p) in a cohort of AHF patients. We selected these miRNAs because of their known association with cardiac hypertrophy (miR-1/-23), angiogenesis (miR-23/-126), apoptosis (miR-21/-23), and fibrosis (miR-21).¹⁵ We also selected miR-423-5p which is up-regulated in failing hearts¹⁶ and which circulating levels are associated with the clinical diagnosis of AHF.^{12,17}

MATERIALS AND METHODS

Study cohort

The studied population consisted of 294 patients admitted to the emergency department (ED) or the cardiac care unit (CCU) with the diagnosis of acute dyspnea, either related to AHF (n=236) or to non-AHF (n=58) according to ESC guidelines¹⁸, during the entire study period (from February 2008 to June 2011). The diagnosis of AHF or non-AHF was performed by 2 senior physicians, experts in HF, using all clinical and biological parameters including plasma brain natriuretic peptide (BNP) level. BNP was measured within 4 h after admission in emergency department, on an Abbott Architect system (Abbott laboratories, Abbott Park, IL, USA). According to the study protocol, blood sampling was performed in ethylenediaminetetraacetic acid tubes within four hours after ED or CCU admission and plasma was immediately stored at – 80°C. Blood sampling was also performed and plasma stored in a subgroup of 64 patients, 5 days after admission for dyspnea. Demographic and biological parameters at admission along with hospital readmission and mortality data at one year of follow-up were recorded in AHF patients. In addition, plasma was also withdrawn from 44 chronic HF patients in stable condition (stable CHF) during an outpatient visit. The present study was performed in accordance with the ethical guidelines of the declaration of Helsinki and all patients provided written consent. The study was registered in clinical trials.gov under the identifier NCT01374880.

Measurement of circulating miRNAs

Total RNA was extracted from plasma samples using the mirVana PARIS kit (Ambion, Applied Biosystem, Lennik, Belgium) without enrichment for small RNAs. Spiked-in synthetic *C. elegans* miRNA controls (Qiagen, Venlo, The Netherlands) were added to plasma samples for correction of extraction efficiency. After DNase treatment, RNAs were reverse transcribed with the miScript reverse transcription kit (Qiagen). cDNA was diluted 10-fold before quantitative PCR with the miScript SYBR Green PCR kit (Qiagen). MicroRNA-specific miScript primer sets were obtained from Qiagen. Expression values were normalized using the mean Ct of the spiked-in controls and calculated with the formula: $2^{\text{exp}(\text{mean Ct spiked-in controls} - \text{Ct target miRNA})}$. Additional technical details have previously been published.⁸

Statistical analysis

Continuous variables were expressed as median (interquartile range) and categorical variables as count (percentage). For all analyses, circulating levels of miRNAs were log-transformed. Levels of miRNAs were compared among several group of patients, namely AHF with or without history of CHF (respectively named acute decompensated HF - ADHF - or *de novo* AHF), acute dyspnea from non-cardiac origin (non-AHF) and stable CHF using first the Kruskal-Wallis test and then the pairwise Wilcoxon test using an adjusted p value according to the Holm method.¹⁹

The ability of miRNAs to discriminate dyspnea of cardiac from non-cardiac origin was studied using receiver operating characteristic (ROC) curve and the area under the ROC curve (AUC).^{20,21} Association of circulating levels of miRNAs with one-year outcome was assessed using the chi square test. To take into account a potential confounding

effect of prognostic covariates, adjusted analyses were performed using logistic regression.

Statistical analyses were performed using R statistical software (<http://www.r-project.org/>). A 2-sided p value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Patient characteristics

A total of 294 patients admitted to the ED or CCU for acute dyspnea were included in this study (Figure 1): 236 were diagnosed with AHF, and 58 with dyspnea of non-cardiac origin. In addition, 44 patients diagnosed with chronic stable heart failure (stable HF) were included. Half of the AHF patients had a history of CHF (ADHF, n=123) and the other 113 patients suffered from *de novo* AHF. Table 1 shows that AHF patients had a high prevalence of history of cardiovascular disease and their median BNP plasma level on admission was 10-fold greater than in non-AHF patients.

Baseline levels of circulating miRNAs

The plasma levels at admission of five miRNAs known to regulate multiple pathways activated in the failing heart were compared among AHF, non-AHF and stable CHF groups (Figure 2). Circulating levels of miR-1 were low in AHF or stable CHF compared to non-AHF ($p=0.0016$). Levels of miR-126 and miR-423-5p were both lower in AHF and non-AHF on admission compared to stable CHF patients (both $p<0.001$). Levels of miR-21 and miR-23 were similar among the three patient groups. Levels of the 5 miRNAs studied were comparable between *de novo* AHF and ADHF (data not shown). Furthermore, admission levels of all 5 miRNAs displayed poor diagnostic performance for AHF (AUCs below 0.70) compared to BNP (AUC=0.97) (Supplementary Figure 1).

Five-day evolution of circulating miRNAs

The kinetic of miRNA plasma levels was determined by calculating the change between admission and day 5 in 64 patients with acute dyspnea (51 AHF and 13 non-AHF; Figure 3). Overall, while the plasma levels of the 5 miRNAs remained unchanged in patients with AHF over the 5 days following admission, patients with non-AHF showed a decrease in the levels of miR-23, miR-126 and miR-423-5p over the same period.

Circulating miRNAs and one-year outcome

During the year following admission, 176/236 (75%) AHF patients had a hospital readmission, mostly for cardiovascular disease 156/176 (89%). Among the 236 AHF patients, 41 (17%) died during the year following admission. As shown in Table 2, many classical parameters of congestion or altered cardiac status were not associated with hospital readmission. Interestingly, plasma levels of miR-21, miR-126 and miR-423-5p at admission were lower in patients who were readmitted in the year following the index hospitalization compared to patients who were not. However, plasma levels of miRNAs were similar between patients who survived and patients who died within the one-year of follow-up.

Among many biological markers, including the 5 studied miRNAs, the odds ratios (OR) [95% confidence interval] for hospital readmission, adjusted for age, gender, heart rate, systolic and diastolic blood pressure, history of atrial fibrillation and of heart failure, left ventricular ejection fraction, plasma levels of BNP, sodium, creatinine, proteins and hemoglobin, was only significant for miR-423-5p (0.70 [0.53 - 0.93], $p=0.01$) (Figure 4). Of note, left ventricular ejection fraction was also associated with the risk of hospital

readmission (OR 2.25 [1.16-4.34]). Admission levels of miRNAs were not associated with mortality of AHF patients within the year following the index hospitalization.

DISCUSSION

The main finding of the present study is that low plasma levels of miR-423-5p are associated with hospital readmission in patients with AHF. Furthermore, we confirm in a large cohort of AHF patients the very high incidence of hospital readmission. All the miRNAs investigated in this study had a poor diagnostic value for AHF.

The 5 miRNAs investigated in this study are all related to HF, either through the regulation of critical pathways involved in the development and progression of HF (miR-1/-21/-23/-126), or because of their regulation in the failing heart (miR-423-5p). Although circulating levels of some of these miRNAs were associated with the diagnosis of CHF, both at admission and at follow-up, none of them provided a significant diagnostic value for AHF. In particular, miR-423-5p, which was reported to discriminate HF cases from healthy controls in the studies by Tijssen¹² and Goren¹⁷, failed to provide a significant diagnostic value for AHF in our study (AUC=0.61), even though its plasma level was lower in AHF patients compared to stable CHF patients. This is likely related to the use of healthy controls in the studies by Tijssen¹² and Goren¹⁷, compared to the use of all dyspneic patients in our study. Consistently with our findings, Ellis and colleagues²² recently showed that miR-423-5p was not significantly associated with HF diagnosis in ROC analysis (AUC 0.577). However, in this study, miR-423-5p increased the diagnostic value of N-terminal pro-BNP (AUC 0.896 for N-terminal pro-BNP and 0.928 for N-terminal pro-BNP with

miR-423-5p). This incremental value, although very modest (+3.2%), was statistically significant (P=0.03). In our study, miR-423-5p provided no additive value to BNP (not shown) which itself generated a robust diagnostic value for AHF (AUC 0.97). In the recent study of Vogel et al., miR-423-5p was not significantly dysregulated in whole peripheral blood of HF patients with reduced EF²³. Whether miR-423-5p provides a clinically relevant incremental diagnostic value to BNP is still uncertain and deserves further testing in independent cohorts. In Ellis²² and our study, miR-423-5p was down-regulated while it was mostly elevated in other studies^{12,17}. This may be explained by differences in disease phenotype but also by the regulation of circulating levels of miR-423-5p from non-cardiac cause^{24,25}. As such, miR-423-5p may reflect the pathological status of not only the heart but also other organs.

Despite improvements in the survival rate of HF in the last 30 years, the 30-day readmission rate after hospital discharge is greater than 20%²⁶ and risk-standardized 30-day all-cause readmission rates have remained unchanged in recent years²⁷. Until recently, hospital readmission and death have been seen as highly linked parameters in HF patients and many trials have combined these two parameters as primary objectives. However, the notion of dependency between hospital readmission and death in HF has been recently challenged. A very recent study showed that the mortality rate and readmission rate were weakly associated with even a negative relationship in HF patients²⁸. Our study is consistent with the notion that hospital readmission and death after an AHF episode are independent parameters, supported by different pathophysiological mechanisms. Hospital readmission seems related to high central venous pressure that leads to organ congestion and not to death in AHF patients²⁹, while death is often related to sudden death in AHF. Various

plasma biomarkers, including natriuretic peptides, stress factors (glycemia, pro-adrenomedullin), inflammatory markers (soluble growth stimulation gene-2, C-reactive protein, ST2) have been increasingly shown to predict long term death, either when used alone or combined or when added to a clinical model ². In the present study, we showed that low plasma levels of miR-423-5p were able to identify AHF patients with high risk of hospital readmission, mostly for cardiovascular disease. Early identification of these patients is clinically relevant since they may best benefit from post-discharge care, home-based follow-up and patient education. How miRNA determination can add to the value of existing plasma biomarkers, as suggested for BNP ^{22,23}, deserves further investigation.

Study limitations

We acknowledge that the present results suffer some limitations. Only 5 miRNAs were measured and other miRNAs of interest might have been measured. However, the choice of these miRNAs was rationalized and recent studies seem to confirm that these 5 miRNAs are relevant in the cardiovascular area. The time-course analysis of miRNA in dyspneic patients was performed in a subgroup of 64 patients; however, it showed marked differences between AHF and non-AHF patients.

CONCLUSIONS

Although circulating levels of miRNAs appear to be regulated in AHF patients, their diagnostic value is poor. Our study also shows that admission levels of circulating miR-423-5p are markers of hospital readmission in AHF patients. These findings must be corroborated by further independent cohort studies. MiR-423-5p might be also

investigated in more severe forms of AHF including cardiogenic shock where biomarkers are needed to help predicting failure of medical therapy and the need of ventricular device as bridge to therapy ³⁰.

ACKNOWLEDGMENTS

Guarantor statement

Dr Devaux had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the content of the manuscript, including the data and analysis.

Author Contributions

Dr Seronde contributed to the study concept and design, the analysis and interpretation of data, and the drafting of the manuscript and critical revision for important intellectual content.

Dr Goretti contributed to the study concept and design, the analysis and interpretation of data, and the drafting of the manuscript and critical revision for important intellectual content.

Dr Vausort contributed to the study concept and design, the analysis and interpretation of data, and the drafting of the manuscript and critical revision for important intellectual content.

Dr Gayat contributed to the analysis and interpretation of data, the drafting of the manuscript and critical revision for important intellectual content, and the statistical analysis.

Dr Vodovar contributed to the study concept and design, the analysis and interpretation of data, and the drafting of the manuscript and critical revision for important intellectual content.

Dr Sadoune contributed to the study concept and design, the analysis and interpretation of data, and the drafting of the manuscript and critical revision for important intellectual content.

Dr Samuel contributed to the study concept and design, the analysis and interpretation of data, and the drafting of the manuscript and critical revision for important intellectual content.

Dr Thum contributed to the study concept and design, the analysis and interpretation of data, and the drafting of the manuscript and critical revision for important intellectual content.

Dr Solal contributed to the study concept and design, the analysis and interpretation of data, and the drafting of the manuscript and critical revision for important intellectual content.

Dr Laribi contributed to the study concept and design, the analysis and interpretation of data, and the drafting of the manuscript and critical revision for important intellectual content.

Dr Plaisance contributed to the study concept and design, the analysis and interpretation of data, and the drafting of the manuscript and critical revision for important intellectual content.

Dr Wagner contributed to the study concept and design, the analysis and interpretation of data, and the drafting of the manuscript and critical revision for important intellectual content.

Dr Mebazaa contributed to the study concept and design, the analysis and interpretation of data, and the drafting of the manuscript and critical revision for important intellectual content.

Financial/nonfinancial disclosures: none.

Role of the sponsors: none.

Other contributions: none.

REFERENCES

1. Mebazaa A, Gheorghide M, Pina IL, et al. Practical recommendations for prehospital and early in-hospital management of patients presenting with acute heart failure syndromes. *Crit Care Med.* 2008;36(1 Suppl):S129-139.
2. Lassus J, Gayat E, Mueller C, et al. Incremental value of biomarkers to clinical variables for mortality prediction in acutely decompensated heart failure: The Multinational Observational Cohort on Acute Heart Failure (MOCA) study. *Int J Cardiol.* 2013;168(3):2186-2194.
3. Dimmeler S, Zeiher AM. Circulating microRNAs: novel biomarkers for cardiovascular diseases? *Eur Heart J.* 2010;31(22):2705-2707.
4. Gilad S, Meiri E, Yogev Y, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One.* 2008;3(9):e3148.
5. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(30):10513-10518.
6. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating MicroRNAs: Novel Biomarkers and Extracellular Communicators in Cardiovascular Disease? *Circ Res.* 2012;110(3):483-495.
7. Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM, et al. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;51(5):872-875.

8. Devaux Y, Vausort M, Goretti E, et al. Use of Circulating MicroRNAs to Diagnose Acute Myocardial Infarction. *Clin Chem.* 2012;58(3):559-567.
9. Devaux Y, Vausort M, McCann GP, et al. A Panel of 4 microRNAs Facilitates the Prediction of Left Ventricular Contractility after Acute Myocardial Infarction. *PLoS One.* 2013;8(8):e70644.
10. Devaux Y, Vausort M, McCann GP, et al. MicroRNA-150: A Novel Marker of Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction. *Circ Cardiovasc Genet.* 2013;6(3):290-298.
11. Matsumoto S, Sakata Y, Nakatani D, et al. A subset of circulating microRNAs are predictive for cardiac death after discharge for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;427(2):280-284.
12. Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, et al. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res.* 2010;106(6):1035-1039.
13. Fukushima Y, Nakanishi M, Nonogi H, Goto Y, Iwai N. Assessment of plasma miRNAs in congestive heart failure. *Circ J.* 2011;75(2):336-340.
14. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 2010;3(6):499-506.
15. Zhu H, Fan GC. Role of microRNAs in the reperfused myocardium towards post-infarct remodelling. *Cardiovasc Res.* 2012;94(2):284-292.
16. Thum T, Galuppo P, Wolf C, et al. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation.* 2007;116(3):258-267.

17. Goren Y, Kushnir M, Zafrir B, Tabak S, Lewis BS, Amir O. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2012;14(2):147-154.
18. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J.* 2012;33(14):1787-1847.
19. Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Stat.* 1979;6(2):65-70.
20. Pencina MJ, D'Agostino RB, Sr., D'Agostino RB, Jr., Vasan RS. Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Stat Med.* 2008;27(2):157-172; discussion 207-212.
21. Pencina MJ, D'Agostino RB, Sr., Steyerberg EW. Extensions of net reclassification improvement calculations to measure usefulness of new biomarkers. *Stat Med.* 2011;30(1):11-21.
22. Ellis KL, Cameron VA, Troughton RW, Frampton CM, Ellmers LJ, Richards AM. Circulating microRNAs as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients. *Eur J Heart Fail.* 2013;15(10):1138-1147.
23. Vogel B, Keller A, Frese KS, et al. Multivariate miRNA signatures as biomarkers for non-ischaemic systolic heart failure. *Eur Heart J.* 2013;34(36):2812-2822.
24. Ali S, Saleh H, Sethi S, Sarkar FH, Philip PA. MicroRNA profiling of diagnostic needle aspirates from patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2012;107(8):1354-1360.

25. Liu R, Zhang C, Hu Z, et al. A five-microRNA signature identified from genome-wide serum microRNA expression profiling serves as a fingerprint for gastric cancer diagnosis. *Eur J Cancer*. 2011;47(5):784-791.
26. Ross JS, Chen J, Lin Z, et al. Recent national trends in readmission rates after heart failure hospitalization. *Circ Heart Fail*. 2010;3(1):97-103.
27. Heidenreich PA, Sahay A, Kapoor JR, Pham MX, Massie B. Divergent trends in survival and readmission following a hospitalization for heart failure in the Veterans Affairs health care system 2002 to 2006. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(5):362-368.
28. Krumholz HM, Lin Z, Keenan PS, et al. Relationship between hospital readmission and mortality rates for patients hospitalized with acute myocardial infarction, heart failure, or pneumonia. *JAMA*. 2013;309(6):587-593.
29. Uthoff H, Thalhammer C, Potocki M, et al. Central venous pressure at emergency room presentation predicts cardiac rehospitalization in patients with decompensated heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2010;12(5):469-476.
30. Pratt AK, Shah NS, Boyce SW. Left Ventricular Assist Device Management in the ICU. *Crit Care Med*. 2014;42(1):158-168.

TABLES

Table 1 - Patient characteristics

	Acute dyspnea (n=294)		Stable HF(n=44)
	Acute HF (n=236)	Non-AHF (n=58)	
Age (years)	76 (65.5 to 84.5)	72.5 (62 to 79.75)	64 (52 to 71)
<i>Gender</i>			
Male	93 (39)	27 (47)	37 (86)
<i>Medical history</i>			
HF history	123 (52)	0 (0)	44 (100)
Atrial fibrillation	97 (41)	8 (14)	0 (0)
COPD/Asthma	30 (13)	38 (66)	5 (11)
Coronary artery disease	67 (28)	9 (16)	20 (45)
Diabetes mellitus	65 (27)	7 (12)	9 (20)
Chronic kidney disease	34 (14)	1 (2)	6 (14)
<i>Physical examination</i>			
Heart rate (bpm)	88 (71 to 107)	97 (84 to 110)	74 (63 to 90)
Systolic BP (mmHg)	135 (118 to 155)	134 (123 to 156)	109 (94.75 to 126)
Diastolic BP (mmHg)	78 (70 to 89)	76 (69.5 to 88)	70 (63 to 78)
<i>Echographic examination</i>			
LVEF (%)*	35 (25 to 56)	-	20 (20 to 30)
<i>Admission labs</i>			
BNP (pg/mL)	1242 (722 to 2394)	112 (38 to 157)	770 (430 to 1542)

Creatinine ($\mu\text{mol/L}$)	100 (75 to 139)	69 (60 to 80)	114 (92 to 150)
<i>Admission diagnosis (%)</i>			
Acutely decompensated HF	123 (52)	0 (0)	-
De novo acute HF	113 (48)	0 (0)	-
COPD/Asthma	0 (0)	48 (83)	-
Pulmonary embolism	0 (0)	3 (5)	-
Pneumonia	0 (0)	13 (22)	-
Other	0 (0)	13 (22)	-
<i>Treatment at admission</i>			
Beta-blockers	110 (37)	1 (2)	32 (73)
Statins	94 (32)	5 (9)	23 (52)
Antiplatelets	125 (42)	3 (5)	29 (66)
Calcium antagonists	69 (23)	3 (5)	0 (0)
Diuretics	150 (51)	6 (10)	27 (62)
ACE/ARB	156 (53)	11 (19)	32 (73)

ACE/ARB: angiotensin-converting enzyme inhibitors/angiotensin-receptor blockers;

AHF: acute heart failure; BNP: B-type natriuretic peptide; BP: blood pressure; Bpm:

beats per minute; COPD : chronic obstructive pulmonary disease; HF: heart failure;

LVEF: left ventricular ejection fraction.

* LVEF was recorded by echocardiography during the index hospitalization in 80 patients.

Table 2 - MiRNA levels according to one-year outcome

<i>Hospital</i>	No readmission	Readmission	p value
<i>Readmission</i>	(n=60)	(n=176)*	
BNP (pg/mL)	1358 (834 to 2472)	1151 (707 to 2375)	0.3
Creatinine (µmol/L)	97 (75.5 to 145)	104 (75 to 137)	0.77
LVEF (%) [#]	28 (24 to 31)	39 (25 to 60)	0.16
Natremia (mEq/L)	138 (134 to 140.5)	138 (135 to 141)	0.74
Proteins (g/L)	69.5 (64.25 to 73)	71 (66 to 75)	0.32
Hemoglobin (g/dL)	12.2 (11.1 to 13.35)	12.4 (11.275 to 13.4)	0.79
miR-1 (10 ⁶)	6.5 (2.75 to 19.75)	6 (2 to 20)	0.83
miR-21 (10³)	11.5 (6.2 to 24.9)	7.4 (4.2 to 15.2)	0.013
miR-23 (10 ³)	4.2 (2.0 to 10.0)	3.1 (2.0 to 6.4)	0.17
miR-126 (10³)	2.8 (1.6 to 6.2)	1.85 (1.2 to 3.6)	0.011
miR-423 5p (10³)	0.5 (0.3 to 1.0)	0.2 (0.1 to 0.5)	0.0001
<i>Death</i>	Survived	Died	p value
	(n=195)	(n=41)	

BNP (pg/mL)	1188 (729.75 to 2332.5)	1338 (646.5 to 2675)	0.87
Creatinine (μ mol/L)	97 (75 to 136)	114 (85 to 161)	0.097
LVEF (%) [#]	35 (25 to 57.5)	35 (20 to 45)	0.60
Natremia (mEq/L)	138 (135 to 140)	137 (133 to 141)	0.64
Proteins (g/L)	71 (66 to 75)	70 (64 to 74)	0.48
Hemoglobin (g/dL)	12.4 (11.3 to 13.4)	12.2 (11.1 to 13.2)	0.48
miR-1 (10^6)	6 (2 to 20)	7 (3 to 17)	0.56
miR-21 (10^3)	8.373 (4.518 to 15.72)	9.0 (4.9 to 16.5)	0.79
miR-23 (10^3)	3.058 (1.987 to 6.723)	4.0 (2.7 to 9.0)	0.18
miR-126 (10^3)	2 (1.3 to 4.4)	2.2 (1.2 to 4.2)	0.91
miR-423-5p (10^3)	0.3 (0.2 to 0.6)	0.3 (0.2 to 0.5)	0.61

BNP: B-type natriuretic peptide. LVEF: left ventricular ejection fraction.

* 156/176 (89%) patients were readmitted for cardiovascular causes. [#] LVEF was recorded in 80 patients.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Flow chart of the study population.

Figure 2. Admission levels of miRNAs. Levels of 5 miRNAs were assessed in plasma samples obtained at admission in 236 AHF patients 58 non-AHF patients, and 44 CHF patients. Between-group comparisons were performed and corresponding p values are indicated.

Figure 3 Time-course of plasma miRNA levels. The change between miRNA levels at admission and day 5 was calculated and compared between AHF patients (n=51) and non-AHF patients (n=13). P values for comparison between levels at admission and at day 5 are indicated for non-AHF. For AHF patients, all p values are > 0.05 .

Figure 4. Association between miRNA levels and hospital readmission. Odds ratios (OR) [95% confidence interval] are shown for biological parameters, including miRNAs for the risk of hospital readmission during the first year following initial presentation. ORs have been adjusted for age, gender, heart rate, systolic and diastolic blood pressure, history of atrial fibrillation and of HF, LVEF, BNP, sodium, creatinine, proteins and hemoglobin.

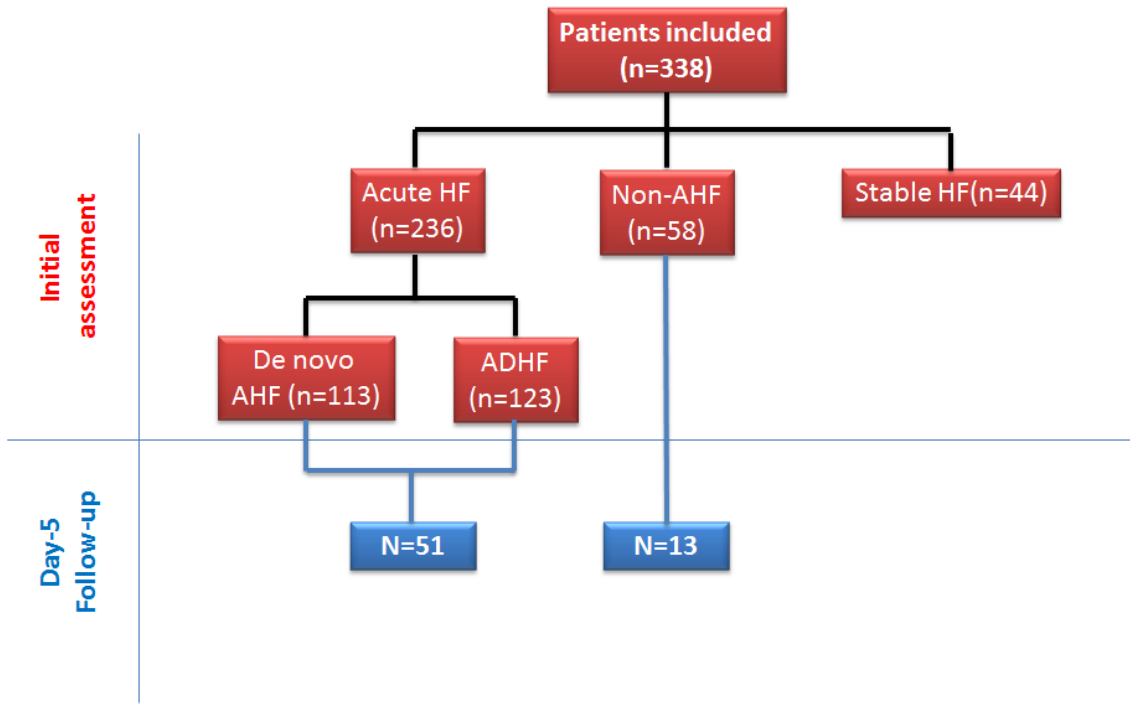


Figure 1.

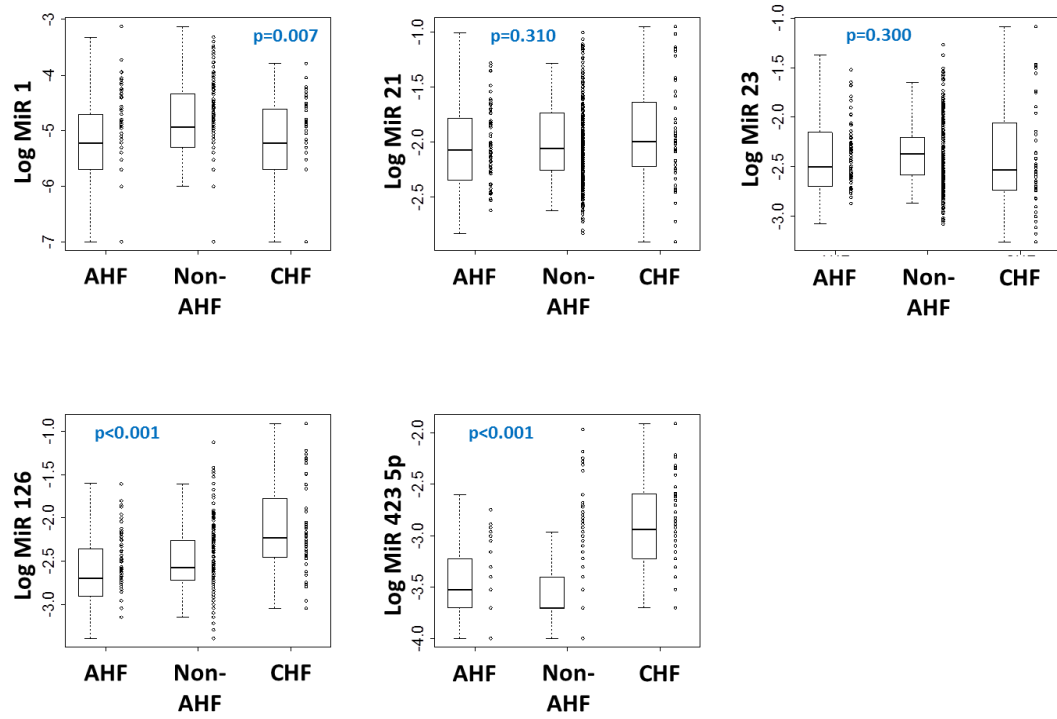


Figure 2.

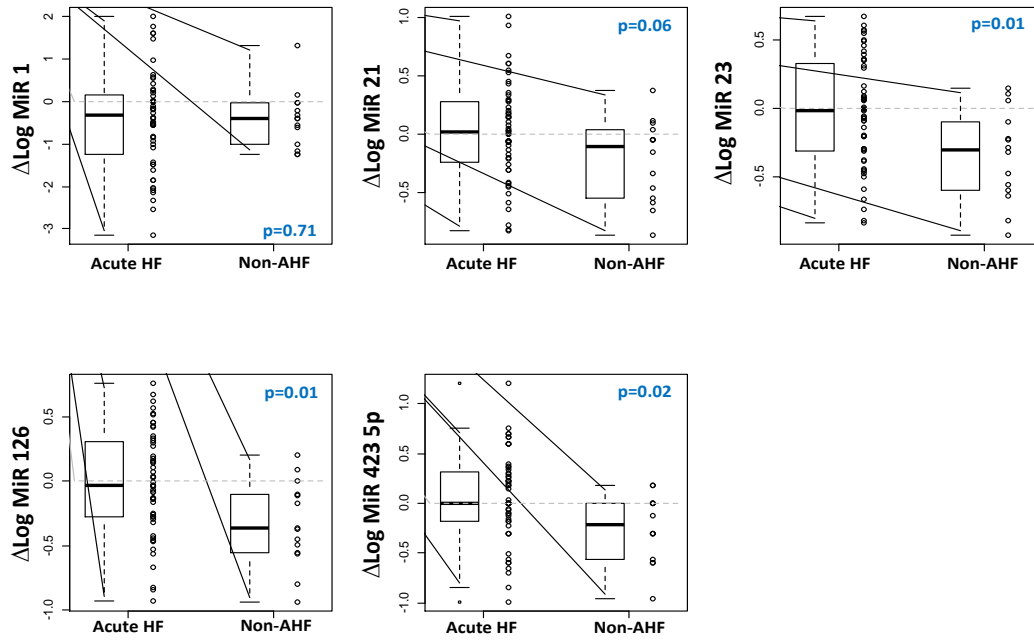


Figure 3.

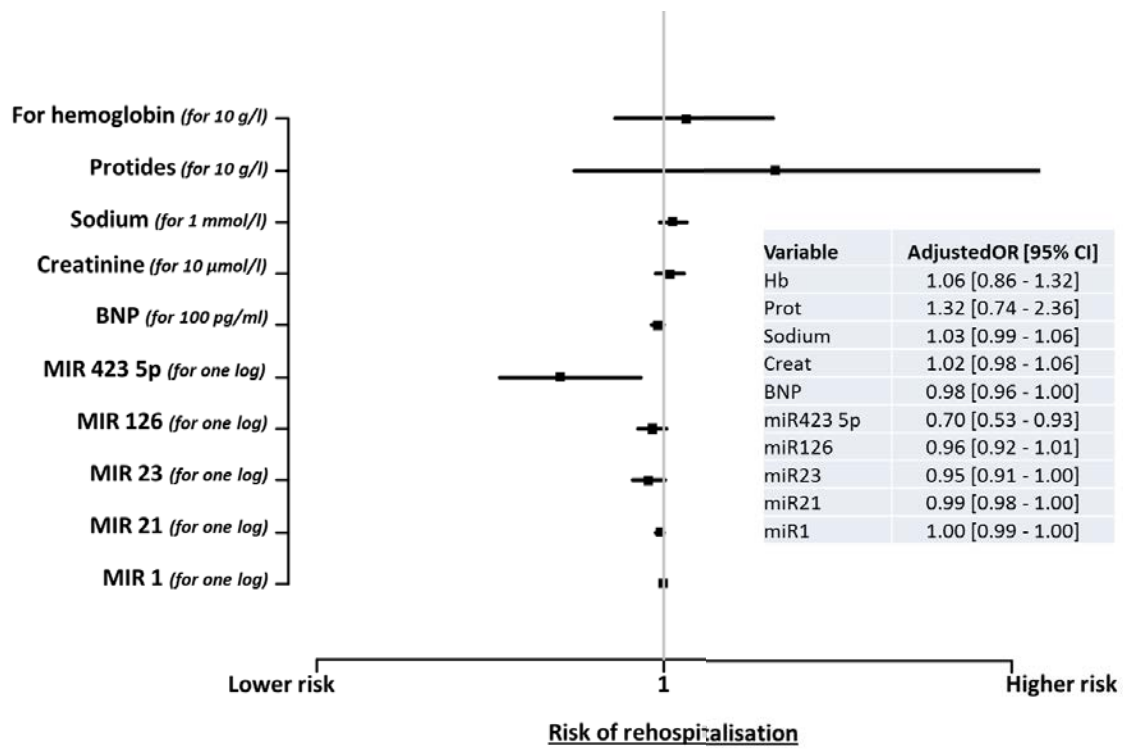


Figure 4.

Etude n°4: Détermination de la capacité pronostique des miARN circulants chez des patients après AC (cohorte NORTH POLE)

La prédiction du devenir clinique des patients après AC est très importante. En effet, le taux de survie après AC est très faible (moins de 20% ⁴⁴) même si l'hypothermie communément utilisée après AC permet de diminuer les séquelles neurologiques ⁴⁶. Le devenir des patients reste très difficile à pronostiquer. Actuellement, la NSE semble être un biomarqueur pronostique prometteur mais elle n'a jamais été testée dans de grandes études avec des patients traités par hypothermie. La capacité pronostique des miARN circulants n'a pas été étudiée.

Cette étude a eu pour but d'étudier la capacité pronostique des miARN circulants chez des patients après AC et de la comparer à la NSE et la PCT.

Pour cela, nous avons utilisé des échantillons plasmatiques de patients en AC traités par hypothermie après ressuscitation: la cohorte NORTHPOLE. Nous avons utilisé 28 patients de cette cohorte, que nous avons séparé en 2 groupes de 14 patients, suivant leur pronostic neurologique (CPC 1-2 ou CPC 3-5). Les taux de PCT et de NSE ont été mesurés. Des puces à miARN ont été effectuées, des cellules neuronales ont été mises en culture, et des PCR quantitative ainsi que différentes analyses statistiques ont été effectuées.

Nous avons obtenu les résultats suivant:

- Un total de 115 miARN est détecté sur les puces à miARN. Un profil d'expression des miARN plasmatiques a été établi chez ces patients après AC. Parmi eux, le miR-122 est surexprimé dans le plasma des patients à mauvais pronostic neurologique (CPC3-5).

- Des cellules neuronales ont été mises en culture et différenciées. Quatre miARN retrouvés dans le plasma de patients après AC, miR-21/-122/-150*/-451, sont également retrouvés dans les surnageants de ces cellules neuronales in vitro, suggérant que ces miARN peuvent refléter les dommages cérébraux.

- Le miR-21 (très exprimé dans le surnageant des cellules neuronales) et le miR-122 (identifié par puces à miARN) sont validés par PCR quantitative dans le plasma des patients. Tous deux sont surexprimés chez les patients à mauvais pronostic neurologique (48 fois pour le miR-122 et 3 fois pour le miR-21).

- Le miR-122 est corrélé à la NSE et la PCT, mais pas le miR-21. Ces 2 miARN permettent de prédire le devenir clinique des patients après AC avec une AUC de 0,73 pour le miR-122 et 0,77 pour le miR-21. La combinaison des 2 n'a pas amélioré la prédiction à 6 mois. La NSE a la meilleure valeur pronostique avec une AUC de 0,98.

- En divisant en tertiles les patients en fonction de leur taux de miR-21, miR-122 ou NSE, les patients ayant les plus hautes valeurs de ces marqueurs (tertile supérieur) ont un taux de mortalité plus élevé. Le PCT n'a aucune valeur prédictive de la mortalité, alors que la NSE a la valeur prédictive la plus significative.

- Aucune association n'est mise en évidence entre les taux de miARN et les facteurs de risque CV ou avec une maladie hépatique.

- Le miR-21 est diminué dans le plasma des patients avec IM comparés à des patients sans IM. Les taux de miARN ne sont pas associés avec les dommages du myocarde (caractérisés par le dosage de différents marqueurs comme la CPK, la cTnT ou la FE).

- Les taux de miARN ne sont pas associés avec l'activation de l'inflammation (le nombre de globules blancs et la CRP). Cependant, les 2 miARN sont corrélés avec la PCT.

On peut donc en conclure que les miARN circulants semblent être associés avec le pronostic neurologique des patients après AC, en particulier les miARN circulants miR-122 et miR-21 qui pourraient discriminer les patients selon leur pronostic neurologique et selon leur mortalité, mais qui ne surpassent pas la NSE. Ces miARN sont produits par des cellules neuronales, ce qui suggère que leur augmentation dans le plasma après AC pourrait être due aux dommages cérébraux consécutifs à l'AC.

Circulating microRNAs after cardiac arrest*

Pascal Stammet, MD; Emeline Goretti, MSc; Mélanie Vausort, MSc; Lu Zhang, MSc; Daniel R. Wagner, MD, PhD; Yvan Devaux, PhD

Objective: Prediction of clinical outcome after cardiac arrest is clinically important. While the potential of circulating microRNAs as biomarkers of acute coronary syndromes is an active field of investigation, it is unknown whether microRNAs are associated with outcome in cardiac arrest patients.

Design: Prospective, single-center proof-of-concept study.

Setting: Eighteen-bed adult general intensive care unit of an academic tertiary care hospital in Luxembourg.

Patients: Twenty-eight patients with cardiac arrest treated by therapeutic hypothermia after cardiac resuscitation were enrolled.

Measurements and Main Results: Blood samples were obtained at 48 hrs after cardiac arrest for the determination of microRNA levels and neuron-specific enolase. Neurological outcome was determined by the cerebral performance category at discharge from the intensive care unit and at 6-month follow-up. Analysis of microRNA arrays and quantitative assessment by polymerase chain reaction identified two microRNAs, miR-122 and miR-21, overexpressed in patients with poor neurological outcome (cerebral performance category 3–5, $n = 14$) compared to patients with favorable neurological outcome (cerebral performance category

1–2, $n = 14$) (48-fold and three-fold, respectively). *In vitro* experiments showed that both miR-122 and miR-21 are produced by neuronal cells, indicating that the elevation of circulating levels of these microRNAs after cardiac arrest may reflect brain damage. miR-122 and miR-21 predicted neurological outcome with areas under the receiver operating characteristic curve of 0.73 and 0.77, respectively. Patients within the highest third of miR-122 or miR-21 values had elevated mortality rate ($p = .02$). Neuron-specific enolase was an accurate predictor of neurological outcome (areas under the receiver operating characteristic curve = 0.98) and mortality ($p < .001$). MicroRNA levels were not associated with myocardial damage or activation of inflammation.

Conclusions: As compared to neuron-specific enolase, circulating microRNAs are modest but significant predictors of neurological outcome and mortality in this small group of patients with cardiac arrest. This motivates assessing the prognostic value of microRNAs in larger cohorts of cardiac arrest patients. (Crit Care Med 2012; 40:3209–3214)

KEY WORDS: biomarkers; cardiac arrest; microRNAs; neurological manifestation; prognosis; survival

During the past 30 yrs, the overall prevalence of all-rhythm cardiac arrest (CA) was 38 patients per 100,000 per year in Europe (1). In the United States, the prevalence of out-of-hospital CA was 124 patients per 100,000 in 2010 (2). Survival

after in-hospital CA is <20% (3) and <10% after out-of-hospital CA (4).

The protective effect of therapeutic hypothermia on neurological sequelae and mortality has been demonstrated (5–7) and is now commonly used (8). However, despite hypothermia, outcome remains variable. The interest for early and reliable neurological prognostication after hypothermia in patients resuscitated from CA is major to avoid prolonged treatment to patients with low chance of good recovery (especially persisting coma or vegetative state) and to assure maximal treatment to those expected to have good outcome. However, the research for early clinical or biological markers to reliably predict outcome in these patients has not yet been completely successful (9). Neuron-specific enolase (NSE) seems to be the most promising biomarker for outcome prediction, but no well-designed large-scale trial investigated this marker since the implementation of induced hypothermia.

Recently, microRNAs (miRNAs) have been at the center of investigations in the heart. Their functional roles in cardiac

development, homeostasis, remodeling, and dysfunction are being actively deciphered. The value of circulating miRNAs as diagnostic biomarkers of acute coronary syndromes is currently under investigation (10). The performance of miRNAs to predict outcome after acute coronary syndrome has also been investigated (11–13). In CA, the prognostic value of miRNAs has not been studied. We hypothesized that miRNAs may be released in the blood stream as a result of post-CA neurological damage. Therefore, the aim of the current study was to determine whether circulating miRNAs can be used to predict outcome after CA.

MATERIALS AND METHODS

An expanded version of Methods in the online supplemental data (Supplement Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/A484>) includes detailed methods for the following: culture of neuronal cells, measurement of gene and miRNAs expression, microarrays, and biochemical assays.

Patients. Twenty-eight patients after resuscitated CA that survived >48 hrs were enrolled in this prospective study. The protocol

*See also p. 3321.

From the Department of Anaesthesia and Intensive Care (PS), and the Division of Cardiology (DRW), Centre Hospitalier, Luxembourg, Luxembourg; and Laboratory of Cardiovascular Research (EG, MV, LZ, DRW, YD), Centre de Recherche Public-Santé, Luxembourg, Luxembourg.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (<http://journals.lww.com/ccmjournal>).

Supported, in part, by grants from the National Research Funds, the Society for Research on Cardiovascular Diseases, and the Ministry of Culture, Higher Education and Research of Luxembourg. Ms. Goretti is a recipient of a fellowship from the National Research Funds of Luxembourg.

The authors have not disclosed any potential conflicts of interest.

For information regarding this article, E-mail: yvan.devaux@crp-sante.lu

Copyright © 2012 by the Society of Critical Care Medicine and Lippincott Williams and Wilkins

DOI: 10.1097/CCM.0b013e31825fd5de

has been approved by the National Research Ethics Board (National Committee for Ethics in Research of Luxembourg), and informed consent has been obtained from all subjects or their legal representatives. Over an 18-month period, patients admitted with CA to the intensive care unit of an academic tertiary care center were enrolled. Patients were treated by hypothermia at 33°C during 24 hrs after CA. The Coolgard System (Zoll Circulation, Sunnyvale, CA) was used for maintenance and controlled rewarming at a maximal rate of 0.5°C/hr. Blood samples for the determination of miRNA expression levels by microarrays and PCR were harvested in citrated tubes at 48 hrs after CA, in normothermic conditions. Creatine phosphokinase and cardiac troponin T were determined for the assessment of acute myocardial injury. NSE and procalcitonin (PCT) were measured 48 hrs after CA. Neurological evaluation was performed before intensive care unit discharge and at 6-month follow-up. Each patient was classified according to the cerebral performance category (CPC) score—favorable outcome: CPC 1–2 = no or minor neurological sequelae; poor outcome: CPC 3–4 = severe neurological sequels or coma, CPC 5 = death.

Culture of Neuronal Cells. The SH-SY5Y neuroblastoma cell line was differentiated with all-trans retinoic acid (Sigma, Bornem, Belgium) and human brain-derived neurotrophic factor (Sigma).

Microarrays. Plasma samples obtained at the end of hypothermia were used for microarrays. Identical volumes of plasma from two groups of 14 patients, one group of patients with CPC 1–2 and one group of patients with CPC 3–5, were pooled (see Table 1 for patient characteristics). Total RNA was extracted from these two pools of plasma, and miRNAs were hybridized on Human Microarray Release 12.0 slides covering 695 miRNAs (Agilent, Deigem, Belgium). Five arrays per pool were hybridized. Data are available at the Gene Expression Omnibus under the accession number GSE 34643.

Measurement of Gene and miRNAs Expression. Quantitative PCR was used to measure the expression of miRNAs in plasma samples and conditioned medium from cultured SH-SY5Y cells, and gene expression in SH-SY5Y cells.

Statistical Analysis. Mann-Whitney rank sum test was used to compare two groups of continuous variables. Fisher's exact test or the chi-square test was used to compare categorical variables. Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks was used for multiple group comparisons. Correlations were determined using Spearman's test on ranks. Prognostic performances were evaluated using receiver operating characteristic curves and the area under the receiver operating characteristic curves (AUC).

Kaplan-Meier curves and the log-rank statistic were used for survival analysis, in which patients were distributed in thirds of biomarker values. To isolate the thirds that differ from each other, all pairwise multiple comparison

Table 1. Demographic features

	CPC 1–2 (n = 14)		CPC 3–5 (n = 14)		p
Age, (yrs, mean-range)	64	45 – 82	63	47 – 78	.724
Sex (male, n, %)	9	64.3	9	64.3	1.000
Simplified Acute Physiology Score II (mean-range)	62	47 – 83	74	56 – 98	.009
Time cardiac arrest to return of spontaneous circulation (min, median-range)	20	5 – 35	30	22 – 76	<.001
Initial rhythm (n, %)					.038
Asystole	0	0	6	42.9	
Pulseless electric activity	2	14.3	0	0	
Ventricular fibrillation/ventricular tachycardia	11	84.6	8	57.1	
Associated factors (n, %)					
Cardiogenic shock	3	21.4	8	57.1	.120
Acute myocardial infarction	9	64.3	10	71.4	1.000
Electroencephalographic status epilepticus	0	0	5	35.7	.041
Seizures	0	0	6	42.9	.016
Medical history (n, %)					
Tobacco	6	42.9	2	14.3	.209
Alcohol abuse	0	0	1	7.1	1.000
Hepatic disease	0	0	2	14.3	.481
Renal impairment	2	14.3	2	14.3	1.000
Hypertension	8	57.1	7	50	1.000
Heart failure	5	35.7	7	50	.704
Coronary disease	5	35.7	5	35.7	1.000
Diabetes					
Insulin dependent	3	21.4	0	0	.222
Noninsulin dependent	2	14.3	2	14	1.000
CPC end intensive care unit (n, %)					<.001
CPC 1	10	71	0	0	
CPC 2	4	29	0	0	
CPC 3	0	0	3	21	
CPC 4	0	0	3	21	
CPC 5	0	0	8	58	
CPC 6 months (n, %)					<.001
CPC 1	13	93	0	0	
CPC 2	1	7	0	0	
CPC 3	0	0	1	7	
CPC 4	0	0	1	7	
CPC 5	0	0	12	86	

CPC, cerebral performance category.

Note: CPC 3–5 denotes CPC 3, 4, or 5.

procedure was applied (Holm-Sidak method). The SigmaPlot v11.0 software was used for statistical testing. $p < .05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Clinical Characteristics. Main clinical and demographic data are shown in Table 1. Two groups of 14 age- and sex-matched patients were formed: on one hand, patients with a favorable neurological outcome (6-month CPC 1–2), and on the other patients with a poor neurological outcome (6-month CPC 3, 4, or 5, thereafter noted CPC 3–5). Parameters related to the severity of illness, like Simplified Acute Physiology Score, and time from CA to return of spontaneous circulation were significantly higher in the CPC 3–5 group. However, the groups did not

differ significantly regarding preexisting diseases.

No patient evolved from the poor neurological outcome group to the favorable neurological outcome group between discharge and follow-up. Three patients from the favorable neurological outcome group improved their CPC from 2 to 1 during the follow-up period. Patients with poor neurological outcome either remained stable or died during the follow-up period.

Expression Profiles of Circulating miRNAs After CA. Total RNA samples from the two groups of patients were pooled and used to determine miRNA expression profiles by microarrays. Of the 695 miRNAs represented on the microarrays, 115 were consistently detected (at least in three of the five arrays performed per group; see Materials and Methods section for details). Figure 1A shows a heat-map

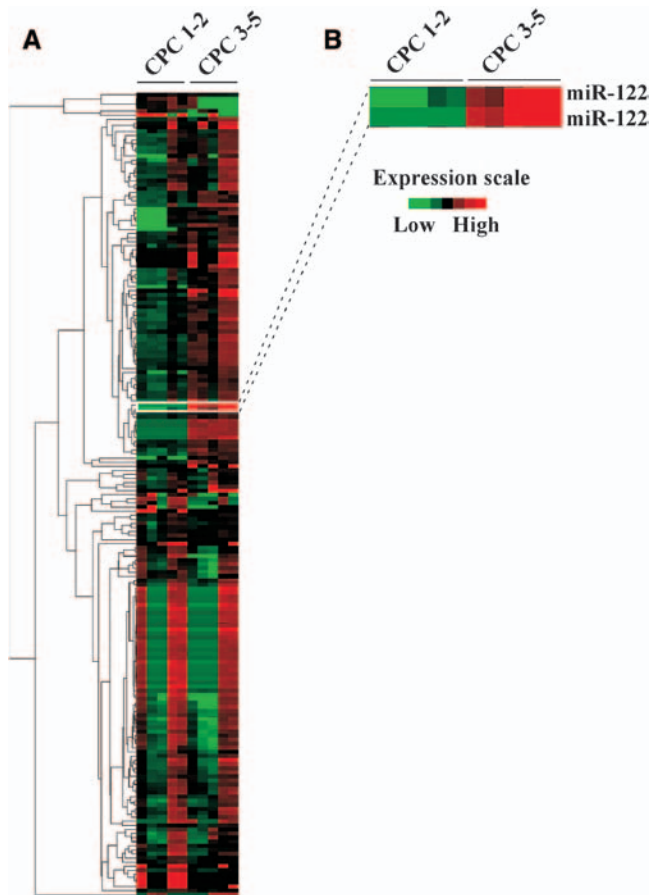


Figure 1. Expression profiles of circulating microRNAs (*miRNAs*) in cardiac arrest patients. Plasma samples from patients with favorable neurological outcome (cerebral performance category [CPC] 1–2, $n = 14$) and patients with poor neurological outcome (CPC 3–5, $n = 14$) were pooled in two groups. *A*, Clustering of the 115 *miRNAs* detected on microarrays in at least three arrays. Five arrays per pool were hybridized. *B*, Expression level of miR-122 in the two groups of patients. Color indicates expression level. Note that miR-122 was recognized by two probes on the arrays.

of these 115 *miRNAs*. Visual inspection of this heat-map allowed identifying miR-122 as differently expressed between the two groups of patients (Fig. 1*B*).

Expression of *miRNAs* in Neuronal Cells. To confirm that circulating *miRNAs* may reflect neuronal damage after CA, we investigated the expression of several *miRNAs* in the SH-SY5Y neuroblastoma cell line. Cells were differentiated by a 5-day incubation with retinoic acid followed by a 7-day incubation with brain-derived neurotrophic factor (Fig. 2*A*). Microscopic examination of the cells showed a characteristic change in morphology. Differentiated cells were rounded, had bright phase bodies, reduced size, and displayed extended neuritis. Complete cell differentiation was verified by increased expression of the neuronal markers, CNR1, GABBR1, and SYT-5 (Fig. 2*B*). Measure of the expression of several *miRNAs* in conditioned medium of differentiated cells revealed that miR-21/-122/-150*/-451 were

reliably detectable (Fig. 2*C*). This observation indicated that *miRNAs*, detected in the blood stream after CA, may originate from neurons.

Expression of Selected Circulating *miRNAs* After CA. Quantitative PCR was used to accurately measure expression levels of miR-122, as identified by microarrays, and miR-21, because it displayed a high expression level in cultured neuronal cells. Both *miRNAs* were up-regulated in patients with poor neurological outcome (48-fold and three-fold for miR-122 and miR-21, respectively; Fig. 3).

Prediction of Neurological Outcome. We then determined the ability of miR-122 and miR-21 to predict 6-month neurological outcome. This prediction was compared to NSE and PCT measured 48 hrs after CA. First, we observed positive correlations among miR-122, NSE, and PCT. miR-21 did not correlate with any marker (Supplementary Table I; see Supplementary Digital Content 1, [http://](http://links.lww.com/CCM/484)

links.lww.com/CCM/484). Analysis of receiver operating characteristic curves reported an AUC of 0.73 (95% confidence interval, 0.54–0.93) for miR-122 and an AUC of 0.77 (95% confidence interval, 0.58–0.95) for miR-21 to predict neurological outcome after CA (Fig. 4). Combining miR-122 and miR-21 did not improve prediction accuracy (not shown). NSE, and to a lesser extent PCT, was accurate predictor of neurological outcome. A maximal AUC of 0.98 was obtained for NSE (Fig. 4). Lower AUCs were obtained when NSE was measured 12 and 24 hrs after CA (AUC = 0.89 and 0.94, respectively).

Prediction of Mortality. Eight patients died in the intensive care unit and four patients (total 43%) died during the 6-month follow-up period. Mean survival time was 116 days. Patients within the highest third of miR-122, miR-21, or NSE values had elevated mortality rate (Fig. 5, *A–C*). The performance of NSE to predict mortality was more significant ($p < .001$) than miR-122 and miR-21 ($p = .02$ for both). PCT did not have a significant predictive value for mortality (Fig. 1*C*). Therefore, miR-122 and miR-21 are significant predictors of mortality but do not outperform NSE.

Association Between *miRNAs* and Preexisting Pathologies. We searched for confounding factors that may affect *miRNA* plasma levels. No significant correlation between *miRNAs* and any risk factor was detected (Supplementary Table II; see Supplementary Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/484>). Because miR-122 is enriched in the liver, we investigated whether elevated miR-122 levels in CA patients could be consecutive to hepatic problems. Two patients had hepatic disease prior to their CA and their levels of miR-122 were below the average value, suggesting that elevated miR-122 levels after CA are not associated with hepatic problems.

Impact of Cardiac Damage on *miRNA* Plasma Levels in CA Patients. In 19 of the 28 patients of our cohort, CA was due to acute myocardial infarction (AMI). miR-122 levels were not different between patients with AMI and patients without AMI. miR-21 was lower in patients with AMI compared to patients without AMI (Supplementary Figure IA; see Supplementary Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/484>). *miRNA* levels did not correlate with the markers of myocardial injury creatine phosphokinase and cardiac troponin T or with left ventricular ejection fraction

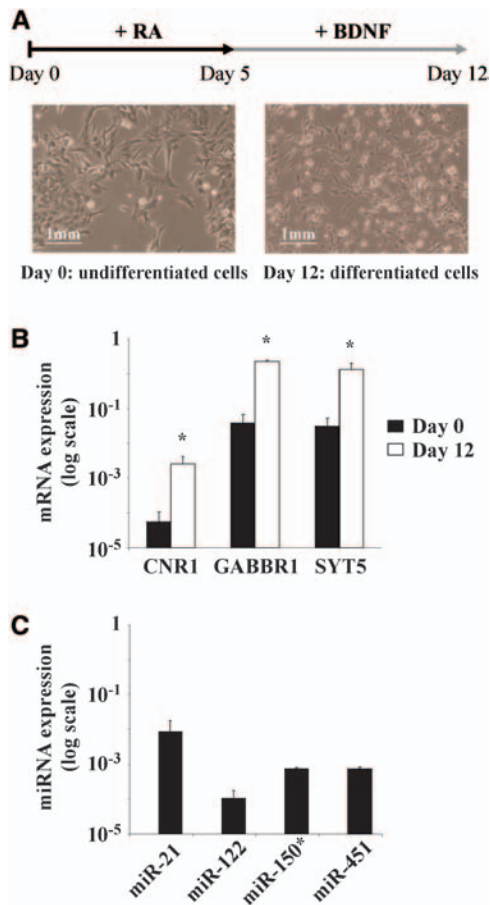


Figure 2. MicroRNAs (*miRNAs*) production by neuronal cells. *A*, Experimental protocol used to differentiate SH-SY5Y cells. Cells were cultured during 5 days with retinoic acid (*RA*) and then during 7 days with brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*). Pictures display the microscopic aspect of cells, before and after differentiation. *B*, Total RNA was extracted from undifferentiated (day 0) and differentiated cells (day 12), and mRNA expression of markers of differentiation was assessed by polymerase chain reaction (PCR). Data are mean \pm SD ($n = 3$). $*p < .001$. *C*, Total RNA was extracted from conditioned medium of differentiated cells cultured for 24 hrs, and miRNA expression was assessed by PCR. Data are mean \pm SD ($n = 3$). *CNR1*, cannabinoid receptor 1; *GABBR1*, gamma-aminobutyric acid type B receptor 1; *SYT-5*, synaptogamin-5.

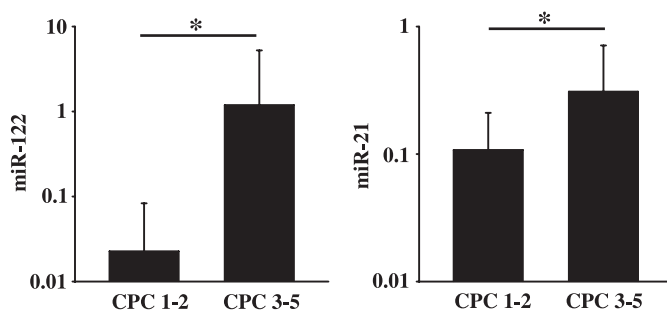


Figure 3. miR-122 and miR-21 in patients with cardiac arrest (CA). Circulating levels of microRNAs (*miRNAs*) in 28 patients with CA were assessed by quantitative polymerase chain reaction and dichotomized into favorable neurological outcome (cerebral performance category [CPC] 1–2), ($n = 14$) and poor neurological outcome (CPC 3–5, $n = 14$). Data are mean \pm SD. $*p < .05$.

measured by transthoracic echocardiography (Supplementary Figure IB–D; see Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/484>). These data show that miRNA plasma levels do not

correlate with myocardial damage in patients with CA.

Association Between miRNAs and Inflammation. CA is associated with a strong inflammatory response. White blood cell

count, CRP, and PCT are markers of inflammation. Neither miR-122 nor miR-21 levels correlated with white blood cell count and CRP, but both miRNAs positively correlated with PCT levels (Supplementary Figure II; see Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/484>). Even after removal of a patient with highly elevated PCT (135.5 ng/mL) due to a very long resuscitation period and immediate multiorgan failure, the correlation between miR-21 and PCT remained significant ($r = .48, p = .02$).

DISCUSSION

Having characterized miRNA expression profiles in the plasma of patients with CA, we observed that neurological outcome of these patients is associated with an miRNA biosignature. Circulating levels of miR-122 and miR-21, measured in normothermia 48 hrs after hypothermia-treated CA, are elevated in patients with poor outcome and provide some prognostic value. In addition, we provide evidence that miR-122 and miR-21 are produced by neuronal cells, suggesting that up-regulation of their plasma levels after CA may arise from injured neurons.

We dichotomized the patients into two groups according to their neurological outcome, age, and sex. Not surprisingly, Simplified Acute Physiology Score II was higher and time to return of spontaneous circulation longer in the CPC 3–5 group. This is also true for the initial rhythm, as asystole is more prone to lead to poor outcome than a shockable rhythm (4). In the CPC 3–5 group, clinical and/or electroencephalographic seizures or status epilepticus were more often present, indicating that cerebral damage was more extensive. Regarding medical history, we did not find any significant differences between the two groups. Overall, baseline characteristics were comparable.

We used a pooling strategy to perform microarrays. Identical volumes of plasma samples from two groups of patients with preserved (CPC 1–2) and impaired (CPC 3–5) cerebral performance after CA were pooled before analysis by miRNA microarrays. Although the effectiveness of this approach to screen miRNA biomarker candidates has been shown elsewhere (14), it prevented from performing statistical analysis to identify differentially expressed miRNAs. Indeed, the replicate data obtained by microarrays were technical and not biological replicates. This limitation was however compensated in a

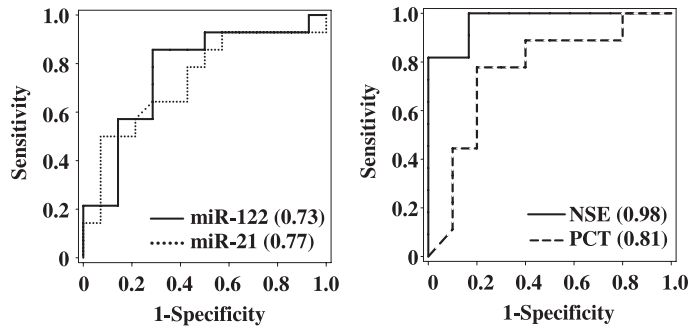


Figure 4. Prediction analyses. Circulating levels of miR-122 and miR-21 were determined by quantitative polymerase chain reaction at the end of hypothermia in 28 cardiac arrest (CA) patients. Neuron-specific enolase (NSE) and procalcitonin (PCT) were measured 48 hrs after CA. Displayed are receiver operating characteristic curves showing the value of biomarkers to predict neurological outcome (cerebral performance category [CPC] 1–2 vs. CPC 3–5). Areas under the receiver operating characteristic curve are indicated.

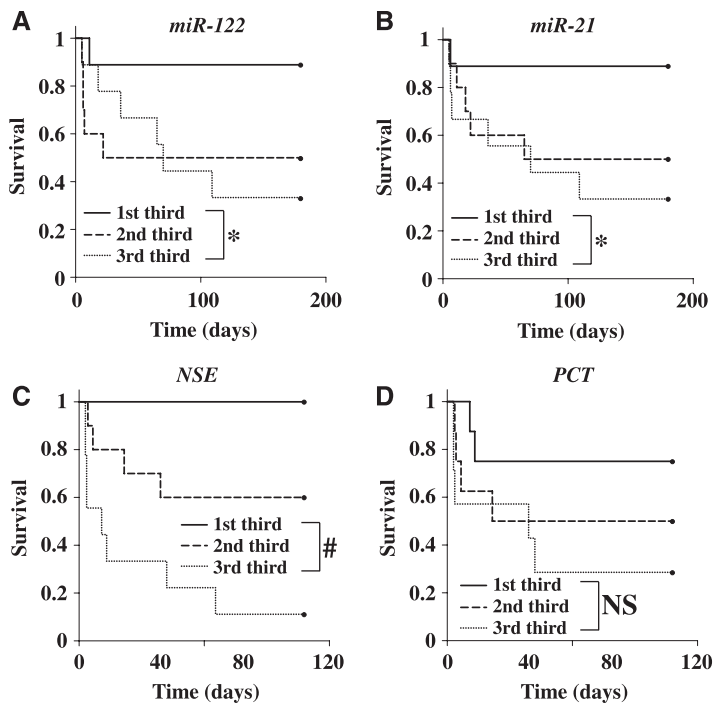


Figure 5. Kaplan-Meier curves showing the survival of patients according to thirds of (A) miR-122, (B) miR-21, (C) neuron-specific enolase (NSE), and (D) procalcitonin (PCT). Patients in the highest third of miR-122 or NSE values had elevated mortality rate. * $p < .05$; # $p < .001$. NS, not significant ($p = .08$).

second step by quantitative assessment of miRNAs expression in each patient individually by PCR. All prediction and association analyses were performed using these individual data. The pooling strategy can lead to high false discovery rate in some circumstances, notably in the presence of outliers. In the present study, one patient from the group of patients with poor outcome had a very high level of miR-122. This patient had impaired cerebral performance after hypothermia (CPC = 3) and died 3.5 months after discharge. However, exclusion of this patient did not affect the

prognostic value of miR-122 (AUC = 0.73 and 0.71 in the presence and absence of the outlier, respectively).

Cardiac injury may influence plasma levels of miRNAs (15). After AMI notably, there is a massive release of cardiomyocyte-enriched miRNAs in the circulation as a result of cardiac ischemia (10, 16). In our study, miR-122 and miR-21 levels were not influenced by cardiovascular risk factors and known coronary artery disease. In addition, levels of both miRNAs were similar in patients with CA after AMI and in patients with CA not related to

AMI. Finally, miRNA levels did not correlate with the markers of myocardial injury creatine phosphokinase and cardiac troponin T. These observations strongly suggest that the elevation of miR-122 and miR-21 levels after CA is not linked to myocardial damage.

Because miR-122 is enriched in the liver (17), it was plausible that high circulating levels of miR-122 could be consecutive to liver damage. In the present study, two patients had impaired liver function, and their levels of miR-122 were not distinct from patients with normal liver function. These observations suggest that our findings are not critically affected by hepatic failure.

The observation that miRNA levels did not correlate with white blood cell count and CRP suggests that the elevation of miRNA levels is not a direct consequence of activation of inflammation, which is induced after CA (18). However, we observed a positive correlation between both miR-122 and miR-21, and PCT. The reason for this association is not clear.

PCT was found to predict neurological outcome with an AUC of 0.81, in line with other reports (18–20), including ours (21) showing that elevated levels of PCT in CA patients are related to the severity of the postresuscitation phase and are associated with a poor outcome (18–20). NSE was very accurate at predicting both neurological outcome and mortality, better than PCT and miRNAs. When measured 48 hrs after CA, NSE was an excellent predictor of neurological outcome (AUC = 0.98), and this although our study population is more heterogeneous than in most reports on NSE. Of note, NSE measured at earlier timepoints (12 and 24 hrs after CA) also provided an accurate prognostic, albeit lower than that measured at 48 hrs. Treating physicians were not blinded to NSE values, but we observed patients over a sufficiently long time period before withdrawing treatment (21, 22). It has to be noted that NSE was not used as sole indicator for decision making, and treatment withholding or withdrawal was based on solid electrophysiological findings and clinical examination. Previous studies reported that NSE is especially a good predictor of poor outcome, but a relatively poor predictor of favorable outcome (23–26). Predicting patients who survive cardiac resuscitation is of major clinical interest (27). In our study, a level of NSE >33 $\mu\text{g/L}$, which perfectly predicted a poor prognosis in another study (28), predicted survival with 94% sensitivity. The low number of patients included here

prevented an accurate determination of cutoff values and sensitivity values for miRNAs to predict survival.

Because our initial hypothesis was that prognostic markers of neurological damage after CA may be isolated from the blood stream as a result of neuronal death, we verified that miR-122 and miR-21 were indeed produced by neuronal cells. Both miRNAs were detected in conditioned medium of SH-SY5Y neuronal cells. This observation is consistent with our working hypothesis and suggests that miRNAs may be used to evaluate brain damage. The presence of miRNAs in the blood implies a disruption of the blood-brain barrier. Such phenomenon has been observed following cerebral ischemia (29).

This study is limited by a multiplicity issue due to the search of miRNAs among the high number of miRNAs recognized by microarrays. Nevertheless, the association between miR-122 and outcome after CA was confirmed using an independent and quantitative technique, and miR-21 was not identified by microarrays but in cultured neuronal cells. It is acknowledged that the second part of this study, that is, quantitative assessment of miRNAs in individual patients, is not an independent validation of the first part, that is, characterization of miRNA profiles in two pools of CA patients. Finally, the present findings will have to be independently replicated before miR-122 and miR-21 can be considered potential biomarkers after CA.

CONCLUSIONS

We report the first characterization of circulating miRNA profiles in patients with CA. These profiles are attractive sources of miRNA biomarker candidates. In this pilot study, miR-122 and miR-21 were identified as potential biomarkers of neurological outcome and survival after CA. Their clinical relevance remains to be determined in larger patient cohorts.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Céline Jeanty, Loredana Jacobs, and Malou Gloesener for expert assistance. We thank Dr. Nicolas Deye for his contribution and Dr. Stephen Senn for statistical review of the manuscript.

REFERENCES

1. Atwood C, Eisenberg MS, Herlitz J, et al: Incidence of EMS-treated out-of-hospital cardiac arrest in Europe. *Resuscitation* 2005; 67:75–80
2. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee: Executive summary: Heart disease and stroke statistics—2012 update: A report from the American Heart Association. *Circulation* 2012; 125:188–197
3. Meaney PA, Nadkarni VM, Kern KB, et al: Rhythms and outcomes of adult in-hospital cardiac arrest. *Crit Care Med* 2010; 38:101–108
4. Nichol G, Thomas E, Callaway CW, et al; Resuscitation Outcomes Consortium Investigators: Regional variation in out-of-hospital cardiac arrest incidence and outcome. *JAMA* 2008; 300:1423–1431
5. The Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group: Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N Engl J Med* 2002; 346:549–556
6. Bernard SA, Gray TW, Buist MD, et al: Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med* 2002; 346:557–563
7. Nielsen N, Hovdenes J, Nilsson F, et al; Hypothermia Network: Outcome, timing and adverse events in therapeutic hypothermia after out-of-hospital cardiac arrest. *Acta Anaesthesiol Scand* 2009; 53:926–934
8. Nolan JP, Soar J, Zideman DA, et al; ERC Guidelines Writing Group: European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2010 Section 1. Executive summary. *Resuscitation* 2010; 81:1219–1276
9. Mayer SA: Outcome prediction after cardiac arrest: New game, new rules. *Neurology* 2011; 77:614–615
10. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM: Circulating microRNAs: Novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res* 2012; 110:483–495
11. Matkovich SJ, Van Booven DJ, Youker KA, et al: Reciprocal regulation of myocardial microRNAs and messenger RNA in human cardiomyopathy and reversal of the microRNA signature by biomechanical support. *Circulation* 2009; 119:1263–1271
12. Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM, et al: Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 51:872–875
13. Zile MR, Mehurg SM, Arroyo JE, et al: Relationship between the temporal profile of plasma microRNA and left ventricular remodeling in patients after myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Genet* 2011; 4:614–619
14. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al: Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:10513–10518
15. Gupta SK, Bang C, Thum T: Circulating microRNAs as biomarkers and potential paracrine mediators of cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2010; 3:484–488
16. Devaux Y, Vausort M, Goretti E, et al: Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction. *Clin Chem* 2012; 58: 559–567
17. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al: Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 2002; 12:735–739
18. Adrie C, Adib-Conquy M, Laurent I, et al: Successful cardiopulmonary resuscitation after cardiac arrest as a “sepsis-like” syndrome. *Circulation* 2002; 106:562–568
19. Fries M, Kunz D, Gressner AM, et al: Procalcitonin serum levels after out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation* 2003; 59:105–109
20. Hayashida H, Kaneko T, Kasaoka S, et al: Comparison of the predictability of neurological outcome by serum procalcitonin and glial fibrillary acidic protein in postcardiac-arrest patients. *Neurocrit Care* 2010; 12:252–257
21. Stammel P, Devaux Y, Azaufe J, et al: Assessment of procalcitonin to predict outcome in hypothermia-treated patients after cardiac arrest. *Crit Care Res Pract* 2011; 2011:631062
22. Stammel P, Werer C, Mertens L, et al: Bispectral index (BIS) helps predicting bad neurological outcome in comatose survivors after cardiac arrest and induced therapeutic hypothermia. *Resuscitation* 2009; 80:437–442
23. Zandbergen EG, Hijdra A, Koelman JH, et al; PROPAC Study Group: Prediction of poor outcome within the first 3 days of postanoxic coma. *Neurology* 2006; 66:62–68
24. Reisinger J, Höllinger K, Lang W, et al: Prediction of neurological outcome after cardiopulmonary resuscitation by serial determination of serum neuron-specific enolase. *Eur Heart J* 2007; 28:52–58
25. Rundgren M, Karlsson T, Nielsen N, et al: Neuron specific enolase and S-100B as predictors of outcome after cardiac arrest and induced hypothermia. *Resuscitation* 2009; 80: 784–789
26. Tiainen M, Roine RO, Pettilä V, et al: Serum neuron-specific enolase and S-100B protein in cardiac arrest patients treated with hypothermia. *Stroke* 2003; 34:2881–2886
27. Bazarian JJ: Neuron-specific enolase correlates with other prognostic markers after cardiac arrest. *Neurology* 2011; 77:1856; author reply 1856–1857
28. Cronberg T, Rundgren M, Westhall E, et al: Neuron-specific enolase correlates with other prognostic markers after cardiac arrest. *Neurology* 2011; 77:623–630
29. Rink C, Khanna S: MicroRNA in ischemic stroke etiology and pathology. *Physiol Genomics* 2011; 43:521–528

Etude n°5: Intérêt des miARN circulants chez les patients hémodialysés (cohorte MINOS)

Les MCV sont la cause principale de morbidité et mortalité chez des patients en insuffisance rénale terminale, traitée par hémodialyse²⁶. Le diagnostic de l'IM est basé en partie sur la mesure du taux circulant de cTnT. Or, les cTnT sont chroniquement augmentées chez la plupart des patients en insuffisance rénale terminale, traitée par hémodialyse, et donc sont très peu utilisées pour diagnostiquer l'IM chez ces patients²⁵. Les miARN circulants pourraient être utiles dans ce cas précis, mais l'effet de l'hémodialyse sur ces miARN plasmatiques n'a pas encore été étudié.

Dans cette étude, nous avons mesuré les taux de miR-499 circulant et de hs-cTnT, chez des patients en insuffisance rénale terminale, traitée par hémodialyse, et nous avons évalué leur stabilité après hémodialyse afin de déterminer si les miARN circulants pourraient être utilisés comme biomarqueurs diagnostiques de l'IM chez ses patients.

Pour cela, la hs-cTnT et différents miARN ont été mesurés sur des échantillons plasmatiques de 41 patients en insuffisance rénale terminale, traitée par hémodialyse (avant et après hémodialyse) et 41 contrôles.

Nous avons obtenu les résultats suivants:

- Nous avons observé une augmentation des taux plasmatiques de hs-cTnT et de miR-499 chez les patients en insuffisance rénale terminale traitée par hémodialyse, comparés aux contrôles (85 et 83 fois, respectivement).
- Parmi les patients hémodialysés, 98% sont positifs pour la hs-cTnT et 46% pour le miR-499.
- Le taux de miR-499 circulants n'est pas associé avec l'hypertension ou un précédent IM.
- Le taux de hs-cTnT n'est pas modifié après hémodialyse, alors que le taux de miR-499 diminue 6,5 fois. Cependant, le miR-499 n'est pas détecté dans les dialysats de 4 patients alors que d'autres miARN testés comme le miR-16 et le miR-451 y sont présents.

On peut donc conclure que la hs-cTnT et le miR-499 sont surexprimés chez des patients en insuffisance rénale terminale, traités par hémodialyse. Cependant, l'hémodialyse n'affecte pas le taux de hs-cTnT contrairement au miR-499 qui est diminué. Ces données suggèrent

que comme la hsTnT, le miR-499 n'est pas capable d'effectuer un diagnostic de l'IM chez les patients hémodialysés.

MicroRNAs in Patients on Chronic Hemodialysis (MINOS Study)

Cristina Emilian,* Emeline Goretti,[†] Fernand Prospert,[‡] Dominique Pouthier,[‡] Pierre Duhoux,[‡] Georges Gilson,[§] Yvan Devaux,[†] and Daniel R. Wagner^{*†}

Summary

Background and objectives Diagnosis of acute myocardial injury with biomarkers is difficult in patients with advanced renal failure. Circulating microRNAs are promising new biomarkers of myocardial injury. It is unknown whether levels of microRNAs are affected in patients undergoing hemodialysis.

Design, setting, participants, & measurements High-sensitivity cardiac troponin T (hsTnT) and cardiac-enriched miR-499 were measured in 41 patients with ESRD undergoing hemodialysis and 41 controls.

Results Levels of hsTnT and miR-499 were highly elevated in patients with ESRD compared with controls (>80-fold increase; $P < 0.001$). Among patients with ESRD, 98% had positive hsTnT levels and 46% had positive miR-499 levels. Levels of troponins were not affected by hemodialysis. However, miR-499 levels were decreased after hemodialysis (6.5-fold decrease; $P = 0.002$).

Conclusions Both miR-499 and troponins are elevated in patients with advanced renal failure. However, whereas levels of troponins are unaffected by hemodialysis, this is not the case for miR-499. Therefore, these observations mitigate the potential of miR-499 as a marker of myocardial injury in patients with ESRD.

Clin J Am Soc Nephrol 7: 619–623, 2012. doi: 10.2215/CJN.10471011

Cardiovascular disease is the main source of morbidity and mortality in patients with ESRD, independent of classic cardiovascular risk factors (1,2). The rapid diagnosis of acute myocardial injury is essential for the triage of patients presenting to the emergency department with chest pain. This diagnosis is currently based on cardiac troponin testing and electrocardiographic findings. However, cardiac troponins are chronically elevated in most patients with ESRD (1,3) and are useful for diagnosing an acute coronary syndrome in these patients only if a rise and fall are observed (2,4). This requires serial testing and substantially delays the diagnosis. These delays may affect prognosis. Therefore, there is an urgent need to find new diagnostic tools to accurately detect or rule out myocardial injury in patients with ESRD presenting with chest pain.

MicroRNAs (miRNAs) are 20–25 oligonucleotides implicated in post-transcriptional regulation of messenger RNAs (5). miRNAs are ubiquitous and essential for all cellular processes of proliferation, cell growth, differentiation, apoptosis, or oncogenesis. We and others have observed that cardiac-enriched miRNAs, such as miR-499, are elevated in the circulation after myocardial damage and correlate with cardiac troponin levels (6–9). Thus, microRNAs appear to be promising biomarkers of acute myocardial injury, although their exact role remains to be determined (10). It is unknown whether circulating levels of microRNAs are affected in patients undergoing hemodialysis. In this

study, we assessed circulating levels of miR-499 and high-sensitivity cardiac troponin T (hsTnT) in patients with ESRD.

Materials and Methods

Patients

The study population consisted of 41 patients with ESRD undergoing long-term hemodialysis and 41 healthy controls. Patients were evaluated with standard 12-lead electrocardiography and transthoracic echocardiography at the end of a hemodialysis session to exclude silent ischemia. Two blood samples were collected for each patient: one before hemodialysis and one at the end of hemodialysis. The study protocol was approved by the local ethics committee, and informed consent was obtained for each patient. The 41 controls were obtained from a local cardiovascular prevention study.

Biochemical Analyses

We measured hsTnT in serum samples using the Roche high-sensitive assay performed on the Cobas e601 system. The detection limit was 0.003 $\mu\text{g/L}$, the 99th-percentile cutoff point was 0.014 $\mu\text{g/L}$, and coefficient of variation was less than 10% at 0.035 $\mu\text{g/L}$.

Plasma miRNA Determination

Total RNA was extracted from plasma and dialysate samples with the mirVana PARIS kit (Ambion,

*Division of Cardiology, [†]Division of Nephrology, and [§]Laboratory of Biochemistry, Centre Hospitalier, Luxembourg, Luxembourg; and [‡]Laboratory of Cardiovascular Research, Centre de Recherche Public Santé, Luxembourg, Luxembourg

Correspondence: Dr. Yvan Devaux, Laboratory of Cardiovascular Research, Centre de Recherche Public Santé, 120 route d'Arlon, L1150 Luxembourg, Luxembourg. Email yvan.devaux@crp-sante.lu

Applied Biosystem, Lennik, Belgium). No enrichment for small RNAs was performed. Three spiked-in synthetic *Caenorhabditis elegans* miRNAs (Qiagen, Venlo, the Netherlands) that lack sequence homology with human miRNAs were added to plasma samples to correct for extraction efficiency. Potential genomic DNA was eliminated using DNase (Qiagen). RNA was reverse-transcribed with the miScript reverse transcription kit (Qiagen), and the resulting cDNA was diluted 10-fold. Quantitative PCR was performed using the miScript SYBR-green PCR kit (Qiagen) and miScript primer sets obtained from Qiagen. An internal control containing a pool of plasma from patients was used in each PCR plate to adjust for interplate variability. All tests were performed in duplicate. Expression values were normalized using the following equation:

$$2^{-\text{exp}(\text{mean } Ct \text{ spiked-in controls} - Ct \text{ target miRNA})}$$

The values were then log-transformed. miRNAs fulfilling the following criteria were considered present: PCR duplicate with standard deviation less than 0.3, mean quantification cycle (C_q) for target miRNA less than 35, and specific peak on the melt curve. Undetectable miRNAs were arbitrarily given a value of -7.2 , which is the lowest detectable value divided by 10.

Statistical Analyses

The Wilcoxon signed-rank test was used to compare two groups of paired continuous variables, and the Mann-Whitney rank-sum test was used to compare two groups of unpaired continuous variables. Correlations were assessed using the Spearman rank test. All statistical tests were two-sided. SigmaPlot software, version 11.0, was used to perform statistical analyses. A P value less than 0.05 was considered to represent a statistically significant difference.

Results

Demographic and Functional Analysis of the Study Population

A total of 82 patients were enrolled in this study. Clinical characteristics of all patients are shown in Table 1. Forty-one patients had ESRD with ongoing hemodialysis and were evaluated by electrocardiography and echocardiography. None of these 41 patients had signs of myocardial ischemia. Forty-one healthy volunteers without documented kidney or heart diseases were used as controls.

Plasma Levels of hsTnT and miR-499

Blood samples obtained in controls and in patients with ESRD before hemodialysis were used to determine hsTnT and miR-499 plasma levels. miR-499 expression levels were log-transformed, and a value of -7.2 (corresponding to the lowest detected value divided by 10) was assigned to undetectable expressions. A cutoff value of -6.2 , corresponding to the 99th percentile of miR-499 values, was calculated for miR-499. Because of the small size of the control group, we used the method described by Hyndman and Fan (11) for this calculation. This method interpolates the position of quantiles and therefore allowed for the calculation of 99th percentiles from the cohort of 41 controls. A cutoff value of $0.014 \mu\text{g/L}$ was used for hsTnT, as reported elsewhere (12).

Table 1. Clinical characteristics of the study population

Characteristic	Controls ($n=41$)	ESRD ($n=41$)
Men, n (%)	41 (100)	26 (63)
Median BMI (range) (kg/m^2)	29 (22–40)	26 (17–42)
Median age (range) (yr)	57 (54–60)	67 (30–82)
Cardiovascular history, n (%)		
myocardial infarction	0 (0)	5 (12)
PTCA	0 (0)	6 (15)
CABG	0 (0)	2 (5)
pacemaker	0 (0)	0 (0)
defibrillator	0 (0)	1 (2)
hypertension	10 (24)	20 (49)
diabetes	0 (0)	7 (17)
hypercholesterolemia	9 (22)	13 (32)
tobacco	5 (12)	9 (22)
family history of CAD	–	13 (32)
Renal failure, n (%)	0 (0)	41 (100)
Hemodialysis, n (%)	0 (0)	41 (100)
Median hemodialysis duration (range) (yr)	–	5 (0.5–24)
Medication, n (%)		
aspirin	0 (0)	19 (46)
clopidogrel	0 (0)	5 (12)
β -blocker	0 (0)	21 (51)
calcium antagonists	0 (0)	7 (17)
nitrates	0 (0)	2 (5)
ACE inhibitors	0 (0)	3 (7)
ARBs	0 (0)	1 (2)
statins	0 (0)	18 (44)
fibrates	0 (0)	1 (2)
warfarin	0 (0)	7 (17)
furosemide	0 (0)	6 (15)
amiodarone	0 (0)	3 (7)

BMI, body mass index; PTCA, percutaneous transluminal coronary angioplasty; CABG, coronary artery bypass grafting; CAD, coronary artery disease; ACE, angiotensin-converting enzyme; ARBs, angiotensin receptor blockers.

Patients with ESRD had highly elevated hsTnT and miR-499 levels compared with controls (elevations of 85-fold and 83-fold, respectively; Figure 1, A and B). One control had a level of hsTnT above the cutoff value of $0.014 \mu\text{g/L}$, and 6 (15%) had a level of miR-499 above the cutoff value of -6.2 . All patients with ESRD but 1 (98%) had a level of hsTnT above the cutoff value, and 19 (46%) had a level of miR-499 above the cutoff value (Figure 1C). Therefore, hsTnT and miRNAs were both elevated in patients with ESRD.

We next investigated the association between miR-499 levels and hypertension. Twenty patients with ESRD and 10 controls had hypertension. We have compared miR-499 levels in patients with ESRD and controls, with or without hypertension. No significant differences were found. Five patients with ESRD had a history of acute myocardial infarction. miR-499 levels did not differ between these patients and the patients who did not have a previous myocardial infarction. Thus, miR-499 levels in patients with ESRD are not associated with elevated BP or with a history of myocardial infarction in the present population.

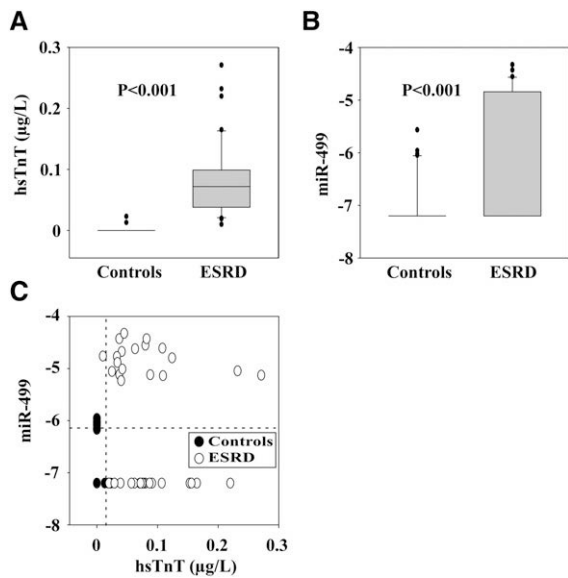


Figure 1. | Plasma levels of high-sensitivity cardiac troponin T (hsTnT) and miR-499 in 41 patients with ESRD and 41 controls. Samples were obtained before hemodialysis in patients with ESRD. (A and B) Box plots showing elevated hsTnT and miR-499 levels in patients with ESRD compared with controls. The lower boundary of the box designates the 25th percentile, the line within the box marks the median, and the upper boundary of the box indicates the 75th percentile. Error bars above and below the box designate the 90th and 10th percentiles. *P* values are indicated. (C) Dot plot showing hsTnT and miR-499 levels for individual patients. Cutoff values of hsTnT (0.014 µg/L) and miR-499 (−6.2) are indicated by dotted lines. Log-transformed values of miRNA expression are represented.

Biomarker Levels before and after Hemodialysis

Levels of hsTnT and miR-499 were assessed in blood samples obtained before and after hemodialysis in patients with ESRD. Hemodialysis did not modify hsTnT levels, and a robust correlation was found between hsTnT levels before and after hemodialysis (Figure 2A). In contrast, levels of miR-499 were lower after hemodialysis (6.5-fold reduction; *P*=0.002) and miR-499 levels before and after hemodialysis were not correlated (Figure 2B). We then assessed the levels of six miRNAs, including miR-499, in dialysates from four patients. Although some miRNAs, such as miR-16 and miR-451, were present in some dialysates, miR-499 was undetectable (Table 2).

Discussion

In the present study, plasma levels of miR-499 and hsTnT were measured in patients with ESRD undergoing hemodialysis and controls. Both markers were highly elevated compared with values in controls, and miR-499 levels were decreased after hemodialysis.

Troponin levels were elevated in patients with ESRD. This observation is expected and consistent with previous reports (1,3). Circulating levels of miR-499 were also higher (>80-fold) in patients with ESRD than in controls, although echocardiographic assessment ensured that none of the patients with ESRD had signs of myocardial ischemia. We recently showed that miR-499 is highly elevated after acute myocardial infarction (13). Average levels of miR-499 were 350-fold higher in patients with acute myocardial infarction than patients with ESRD. Therefore, although miR-499 may not be the optimal marker of the presence or absence or myocardial injury in patients with

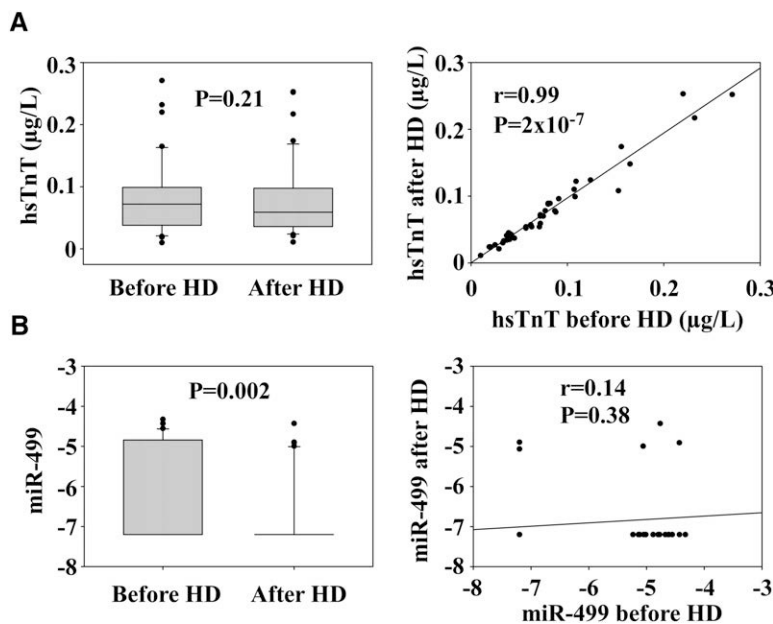


Figure 2. | Biomarker levels before and after hemodialysis. High-sensitivity cardiac troponin T hsTnT (A) and miR-499 (B) levels were measured in 41 patients with ESRD undergoing hemodialysis (HD). Blood samples were obtained before and after hemodialysis. Left panels represent box plots and right panels represent linear correlations curves. *P* values and correlation coefficients are indicated. Log-transformed values of miRNA expression are represented.

Table 2. miRNA expression in dialysates of 4 patients with ESRD

Patient	miR-16	miR-122	miR-208b	miR-223	miR-451	miR-499
1	-5.0	ND	ND	ND	ND	ND
2	-4.4	ND	ND	ND	-5.0	ND
3	-4.2	ND	ND	ND	-3.7	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND, not detected.

ESRD, its clinical relevance in the diagnosis of acute myocardial infarction remains.

Of the 41 controls enrolled in this study, 6 had miR-499 levels above, although very close to, the cutoff point. The presence of miR-499 in the plasma of these controls is intriguing. None of them had a previous myocardial infarction, which excludes the possibility that miR-499 emanates from myocardial injury. Accordingly, these 6 controls had normal levels of troponins. A very recent report by Jaffe and colleagues (14) showed that diseased skeletal muscle is a potential source of circulating troponins. It would be interesting to test whether diseased muscles also secrete miR-499. However, we do not have any indication of the presence of muscular diseases in the controls enrolled in our study.

The observation of a strong correlation between troponin levels before and after hemodialysis suggests that cardiac troponins are not eliminated by hemodialysis. There is no consensus on the origin of elevated troponins in patients with ESRD. Several hypotheses have been discussed, such as a decreased renal clearance with subsequent accumulation in the circulation. This mechanism is unlikely given that troponins have a molecular weight similar to that of albumin and are therefore unlikely to be filtered at the glomerular level (2,15). Furthermore, renal transplantation and improvement in renal function are not associated with normalization of cardiac troponin levels (16). Other studies have suggested that uremic cardiomyopathy, myocardial hypertrophy, apoptosis, or small areas of silent myocardial necrosis might be involved (15). Cross-reactivity of muscular cTnT isoforms reported by McLaurin and colleagues (3) for first-generation cTnT assays is no longer demonstrated with the high-sensitivity new-generation assays (17).

In contrast to troponins, miR-499 levels were significantly decreased after hemodialysis, suggesting that miRNAs were possibly eliminated by hemodialysis. To address this possibility, we assessed the levels of miR-499, together with five other miRNAs, in dialysates. We observed that some miRNAs, such as miR-16 and miR-451, are dialyzed. However, we were unable to detect miR-499 in any dialysate. Gidlöf and colleagues recently reported that cardiac-enriched miR-1 and miR-133a, but not miR-208b and miR-499, are subjected to renal elimination and can be detected in urine after acute myocardial infarction (18). The relevance of the presence of some miRNAs in the dialysate of some patients deserves further investigation.

This study is limited by its small size. In addition, only patients with ESRD were enrolled and only a single measurement was performed. Thus, we could not investigate the association between miRNAs levels and various grades

of renal dysfunction. The control group consisted only of men, but this may not have affected our data because miRNA levels are not related to gender, as previously reported (7). Finally, patients with ESRD also differed from controls in terms of age, body mass index, cardiovascular history, and risk factors; these differences temper the observation that the differences in troponin and miR-499 levels are due solely to ESRD.

In conclusion, troponin levels and miR-499 levels are both elevated in patients with ESRD. miR-499 levels are decreased after hemodialysis, whereas troponin levels remain stable. Our observations argue against the use of miR-499 as a diagnostic marker of myocardial injury in patients with ESRD.

Acknowledgments

We thank Malou Gloesener, Loredana Jacobs, Céline Jeanty, Emilie Leyder, Christelle Nicolas, and Laurent Quennery for expert technical assistance.

This study was supported by the Society for Research on Cardiovascular Diseases, the Ministry of Culture, Higher Education and Research of Luxembourg, and the National Fund of Research of Luxembourg. E.G. is recipient of a fellowship from the National Fund of Research of Luxembourg.

Disclosures

None.

References

- Dierkes J, Domröse U, Westphal S, Ambrosch A, Bosselmann HP, Neumann KH, Luley C: Cardiac troponin T predicts mortality in patients with end-stage renal disease. *Circulation* 102: 1964–1969, 2000
- Wang AY, Lai KN: Use of cardiac biomarkers in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 19: 1643–1652, 2008
- McLaurin MD, Apple FS, Voss EM, Herzog CA, Sharkey SW: Cardiac troponin I, cardiac troponin T, and creatine kinase MB in dialysis patients without ischemic heart disease: Evidence of cardiac troponin T expression in skeletal muscle. *Clin Chem* 43: 976–982, 1997
- Hamm CW, Giannitsis E, Katus HA: Cardiac troponin elevations in patients without acute coronary syndrome. *Circulation* 106: 2871–2872, 2002
- Ambros V: The functions of animal microRNAs. *Nature* 431: 350–355, 2004
- Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, Nishimura K, Hirokawa G, Goto Y, Nonogi H, Iwai N: Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 56: 1183–1185, 2010
- Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen JA, Heymans S, Schroen B: Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet* 3: 499–506, 2010

8. D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, Rubino M, Carena MC, Spazzafumo L, De Simone M, Micheli B, Biglioli P, Achilli F, Martelli F, Maggolini S, Marenzi G, Pompilio G, Capogrossi MC: Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J* 31: 2765–2773, 2010
9. Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, Qin YW, Jing Q: Circulating microRNA: A novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J* 31: 659–666, 2010
10. Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM, Bang C, Bauersachs J, Bethmann K, Kempf T, Wollert KC, Thum T: Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 51: 872–875, 2011
11. Hyndman RJ, Fan Y: Sample quantiles in statistical packages. *Am Stat* 50: 361–365, 1996
12. Reichlin T, Hochholzer W, Bassetti S, Steuer S, Stelzig C, Hartwiger S, Biedert S, Schaub N, Buerge C, Potocki M, Noveanu M, Breidthardt T, Twerenbold R, Winkler K, Bingisser R, Mueller C: Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. *N Engl J Med* 361: 858–867, 2009
13. Devaux Y, Vausort M, Goretti E, Nazarov PV, Azuaje F, Gilson G, Corsten MF, Schroen B, Lair ML, Heymans S, Wagner DR: Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction [published online ahead of print January 17, 2012]. *Clin Chem* doi: 10.1373/clinchem.2011.173823
14. Jaffe AS, Vasile VC, Milone M, Saenger AK, Olson KN, Apple FS: Diseased skeletal muscle: A noncardiac source of increased circulating concentrations of cardiac troponin T. *J Am Coll Cardiol* 58: 1819–1824, 2011
15. Freda BJ, Tang WH, Van Lente F, Peacock WF, Francis GS: Cardiac troponins in renal insufficiency: Review and clinical implications. *J Am Coll Cardiol* 40: 2065–2071, 2002
16. Fredericks S, Chang R, Gregson H, Bewick M, Collinson PO, Gaze D, Carter ND, Holt DW: Circulating cardiac troponin-T in patients before and after renal transplantation. *Clin Chim Acta* 310: 199–203, 2001
17. Apple FS, Ricchiuti V, Voss EM, Anderson PA, Ney A, Odland M: Expression of cardiac troponin T isoforms in skeletal muscle of renal disease patients will not cause false-positive serum results by the second generation cardiac troponin T assay. *Eur Heart J* 19 [Suppl N]: N30–33, 1998
18. Gidlöf O, Andersson P, van der Pals J, Götberg M, Erlinge D: Cardiospecific microRNA plasma levels correlate with troponin and cardiac function in patients with ST elevation myocardial infarction, are selectively dependent on renal elimination, and can be detected in urine samples. *Cardiology* 118: 217–226, 2011

Received: October 12, 2011 **Accepted:** January 17, 2012

Published online ahead of print. Publication date available at www.cjasn.org.

Axe 2: Intérêt des miARN pour la réparation cardiaque post infarctus

Ces études mécanistiques ont principalement été effectuées sur des EPC, qui sont connues pour être recrutées de la moelle osseuse jusqu'au site de l'ischémie afin de participer à la revascularisation post IM.

Etude n°1: Implication du miR-16 dans les fonctions principales des EPC

Depuis leur découverte ¹², les EPC ont été énormément étudiées. Cependant leur phénotype exact et leurs capacités régénératives sont toujours controversées ¹³. Deux types d'EPC ont plus particulièrement été mis en évidence ¹⁴⁶: les EPC précoces, connues pour leur sécrétion de facteurs pro-angiogéniques, et les EPC tardives, qui prolifèrent et forment spontanément des réseaux de microtubules. Les EPC ont une capacité réparatrice assez limitée après IM. En effet, même si leur capacité de néovascularisation et de réparation du tissu ischémique a été démontrée plusieurs fois ^{15, 253}, les études cliniques n'ont montré que des effets modérés d'une thérapie cellulaire à partir de cellules souches dérivées de la moelle osseuse ²⁵⁴ ou de cellules CD34+ par exemple ²⁵⁵. Une meilleure connaissance de la biologie de ces cellules permettrait d'améliorer les thérapies cellulaires.

Il a été prouvé que les miARN sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques mais également qu'ils ont un rôle fonctionnel dans les progéniteurs angiogéniques ^{231, 242}. Cependant, le rôle des miARN chez les EPC est très peu connu.

Dans cette 1^{ère} étude mécanistique, nous avons étudié le potentiel des miARN à augmenter les capacités régénératives des EPC.

Pour cela, nous avons isolé des EPC précoces de PBMCs humains sur plaques recouvertes de fibronectine humaine et nous avons amplifié des EPC tardives à partir de cellules CD34+ périphériques. Nous avons caractérisé ces 2 types cellulaires puis des puces à miARN et à ARNm ainsi que différents tests fonctionnels (cytométrie de flux, test de luciférase, de prolifération, d'angiogenèse...) ont été effectués afin de caractériser l'effet des miARN sur les capacités régénératrices des EPC précoces.

Nous avons obtenus les résultats suivants:

- Nous avons caractérisé les 2 types d'EPC: les EPC précoces ont été caractérisées par leur capacité à se lier aux lectines et à absorber les LDL acétylés, mais aussi par l'expression de certains marqueurs de surface (CD133+/CD34+/CD45+/CD14+/vWF+/VEGFR2+/CD144-/CD105+) et leur incapacité à proliférer. Les EPC tardives ont été caractérisées par leur apparence endothéliale sur plastique, par leur faculté à former des réseaux microtubulaires une fois sur matrigel, par l'expression de certains marqueurs de surface (CD133-/CD34+/CD45-/CD14-/vWF+/VEGFR2+/CD144+/CD105+), ainsi que par leur capacité à proliférer.

- Nous avons effectué des puces de miARN sur chacun de ces types cellulaires. Nous avons obtenus des profils d'expression des miARN caractéristiques pour chacun de ces types cellulaires: parmi les 695 miARN présents sur la puce, 144 sont détectables chez les EPC précoces, et 120 chez les EPC tardives. En tout, 87 miARN sont communément exprimés par ces 2 types cellulaires. Après analyses, nous avons trouvés 16 miARN surexprimés par les EPC précoces et 7 par les EPC tardives, ainsi que 11 miARN exprimés que par les EPC précoces et 21 que par les EPC tardives.

- Parmi les miARN différentiellement exprimés entre ces 2 types cellulaires, 5 membres de la famille du miR-16 (miR-15a/15b/16/-103/-107) sont surexprimés par les EPC précoces. Ces résultats ont été validés par PCR quantitative.

- Nous avons grâce à 3 bases de données accessibles sur internet, déterminé une liste de gènes cibles de ces 5 miARN. En tout, 375 gènes cibles sont identifiés: 91 pour le miR-15a, 56 pour le miR-15b, 123 pour le miR-16, 81 pour le miR-103 et 1 pour le miR-107.

- Nous avons effectué des puces à ARNm et nous nous sommes intéressés aux 375 gènes cibles identifiés. Seuls 289 d'entre eux sont exprimés soit par les EPC précoces, soit par les EPC tardives ou par les 2 types cellulaires. Une classification fonctionnelle de ces gènes par l'utilisation de termes GO (gene ontology) met en évidence un enrichissement en gènes impliqués dans « les voies du cycle cellulaire » et « l'interphase du cycle cellulaire mitotique ». Trois gènes, membres de la famille des cyclines, sont mis en évidence: CCND1 et CCNE1, ainsi qu'un gène associé, CDK6 (sous unité catalytique de CCND1). Ces 3 gènes sont sous exprimés chez les EPC précoces.

- L'ajout d'un antimir-16 chez les EPC précoces entraîne une augmentation de ces 3 gènes alors que l'ajout d'un prémiR-16 chez des EPC tardives entraîne une diminution de l'expression de ces gènes. Grâce à un test luciférase, nous avons pu vérifier que le miR-16 se fixe bien sur la séquence de l'ARN messenger de CCND1.

- Nous avons également observé que l'ajout d'antimiR-16 chez des EPC précoces permet une entrée dans le cycle cellulaire (diminution de nombre de cellules en phase G0/G1, et augmentation du nombre de cellules en phases S et G2/M).

- Quatre autres gènes cibles impliqués dans la différenciation sont validés comme étant sousexprimés chez les EPC précoces par PCR quantitative, mais seul USP25 est augmenté après inhibition du miR-16 (pas d'effet sur SERBP1, UBE2V1 et SNRK).

- L'inhibition du miR-16 chez les EPC précoces a permis cependant de stimuler leur différenciation vers un phénotype plus endothélial, en augmentant les marqueurs de surface VEGFR2, CD144, CD54 et CD105.

- L'antagonisme du miR-16 entraîne une augmentation de la sécrétion d'IL-8 qui est un facteur pro-angiogénique (le VEGF n'était pas détectable, et pas d'effet dur miR-16 sur la TSP-1, thrombospondine-1).

- Finalement, l'inhibition du miR-16 permet de stimuler la formation de tube de cellules endothéliales, comme démontré lors d'une coculture d'HUVECs avec des EPC précoces transfectées par de l'antimiR-16 et leur milieux conditionnés, sur matrigel.

Nous avons donc tout d'abord caractérisé des transcriptômes de miARN différents entre les EPC précoces et tardives. Puis nous avons mis en évidence le rôle du miR-16 dans plusieurs voies biologiques clés chez les EPC précoces telles que la progression du cycle cellulaire et leur différenciation. Ces résultats suggèrent qu'inhiber le miR-16 dans les EPC précoces pourrait permettre d'augmenter leurs capacités réparatrices après IM.

MicroRNA-16 affects key functions of human endothelial progenitor cells

Emeline Goretti,* Magali Rolland-Turner,* Frédérique Léonard,* Lu Zhang,*
Daniel R. Wagner,*[†] and Yvan Devaux*¹

*Laboratory of Cardiovascular Research, Public Research Centre–Health, Luxembourg; and [†]Division of Cardiology, Centre Hospitalier, Luxembourg

RECEIVED OCTOBER 16, 2012; REVISED DECEMBER 4, 2012; ACCEPTED DECEMBER 21, 2012. DOI: 10.1189/jlb.1012511

ABSTRACT

The capacity of EPCs to repair injured tissues is limited. The role of miRNAs in EPCs is largely unknown. We tested whether miRNAs may be useful to enhance the regenerative capacity of EPCs. Early EPCs were isolated from human PBMCs, and late EPCs were amplified from enriched human peripheral CD34⁺ cells. Expression profiles of miRNAs and mRNAs were obtained by microarrays. Among the miRNAs differentially expressed between early and late EPCs, five members of the miR-16 family (miR-15a/-15b/-16/-103/-107) were overexpressed in early EPCs. Web-accessible databases predicted 375 gene targets for these five miRNAs. Among these, two regulators of cell cycle progression (CCND1 and CCNE1) and one associated gene (CDK6) were less expressed in early EPCs. Administration of anti-miR-16 in early EPCs enhanced the expression of these three genes, and administration of pre-miR-16 in late EPCs decreased their expression. In early EPCs, antagonism of miR-16 allowed for cell-cycle re-entry, stimulated differentiation, enhanced IL-8 secretion, and promoted the formation of capillary-like structures by HUVECs. In conclusion, miR-16 regulates key biological pathways in EPCs. This may have important implications to enhance the capacity of EPCs to repair injured tissues. *J. Leukoc. Biol.* 93: 645–655; 2013.

Introduction

Since the discovery of EPCs [1], a wide range of cells differing in origin, phenotype, and angiogenic properties has been

identified and named by the global term “EPC” [2]. EPCs were defined historically by their ability to bind lectins and take up acetylated LDLs, and by surface expression of the progenitor markers CD133 and CD34 and the endothelial marker VEGFR2 [1]. Later, the concept of two distinct populations differing in phenotype and angiogenic properties has emerged with the description of early and late EPCs [3]. Early EPCs do not proliferate but produce angiogenic factors, whereas late EPCs proliferate and form microtubules. In addition to their angiogenic properties, these cells can be differentiated by cell-surface markers. Early EPCs express the panleukocyte marker CD45; the monocyte/macrophage markers CD14, CD11b, and CD11c; the endothelial markers VE-cadherin and E-selectin; and the progenitor cell markers CD133, CD34, and CD117 [4]. Late EPCs express the endothelial markers CD31, CD141, CD105, CD146, CD144, vWF, flk-1, and to a lesser extent, the progenitor cell markers CD133, CD34, and CD117 [5].

EPCs have the potential to induce neovascularization and repair injured tissues. In the heart, for instance, the capacity of EPCs to aid in tissue repair after myocardial infarction has been demonstrated by several experimental studies [6, 7]. However, clinical trials have reported only modest benefits of cell therapy with bone marrow-derived stem cells [8], purified CD34⁺ [9] or CD133⁺ progenitors [9, 10]. A recent meta-analysis of 29 randomized trials reported an overall modest improvement of cardiac function in the 1st year following administration of bone marrow-derived stem cells to patients with myocardial infarction [11]. Administration of G-CSF stimulated the recruitment of CD34⁺ cells but did not result in a functional improvement of cardiac function. A deeper knowledge of the biology of stem cells will certainly help to improve cell therapy.

miRNAs are short (20–23 nucleotides) oligonucleotides that down-regulate gene expression through mRNA degradation and translational repression [12]. Although it is now well-known that miRNAs regulate vascular function and angiogenesis [13], it has only been demonstrated recently that miRNAs

Abbreviations: CCND1/E1=cyclin D1/E1, DiAcLDL=1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate acetyl-LDL, EBM=endothelial cell basal medium, EPC=endothelial progenitor cell, FSC=forward-scatter, HEK=human embryonic kidney, miRNA/miR=microRNA, qPCR=quantitative PCR, SAM=significance analysis of microarray, SERBP1=serpine 1 mRNA binding protein 1, SNRK=sucrose nonfermenting protein-related kinase, SSC=side-scatter, TSP-1=thrombospondin-1, UBE2V1=ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1, USP25=ubiquitin-specific protease 25, UTR=untranslated region, vWF=von Willebrand factor

The online version of this paper, found at www.jleukbio.org, includes supplemental information.

1. Correspondence: Laboratory of Cardiovascular Research, Public Research Centre-Health, 120 route d'Arlon, L1150 Luxembourg. E-mail: yvan.deviaux@crp-sante.lu

play functional roles in angiogenic progenitors [14, 15]. However, the effects of miRNAs in EPCs are still poorly characterized. We hypothesized that miRNAs may play significant roles in EPCs that may be used to enhance their regenerative properties. For this purpose, we combined miRNA and mRNA analyses to unravel biologically relevant effects of miRNAs in early and late EPCs.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and characterization

Blood samples were obtained from healthy volunteers. A written, informed consent was obtained from each donor, and the protocol has been approved by the local ethics committee. EPCs were purified from PBMCs by Ficoll gradient.

Early EPCs were prepared as described previously [16]. Briefly, 8×10^6 PBMCs were seeded onto human fibronectin ($2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)-precoated plates and cultured in EBM, supplemented with brain bovine extract, human endothelial growth factor, hydrocortisone, gentamicin, amphotericin B, and 20% FCS (Lonza, Verviers, Belgium). After 3 days of culture, non-adherent cells were discarded, and adherent cells were cultured for 24 h prior to treatment. Cells were assessed for dual-staining by DilAcLDL (Invitrogen, Merelbeke, Belgium) and lectin from *Ulex europaeus* (Sigma, Bornem, Belgium). As assessed by flow cytometry, residual lymphocytes represented typically <5% of the cell population.

Late EPCs were obtained by seeding CD34+ cells, purified from PBMCs by positive magnetic selection (Miltenyi, Utrecht, The Netherlands), onto human fibronectin-precoated plates. CD34+ cells were cultured in EBM-2 medium, supplemented with human endothelial growth factor, FGF-B, insulin growth factor 1, hydrocortisone, VEGF, ascorbic acid, heparin, gentamicin, amphotericin B, and 15% FCS (Lonza) for 2–3 weeks until the appearance of adherent, cobblestone-shaped cells. Cells were then amplified and used at passages 5–10.

Flow cytometry characterization involved 200,000 cells and the following antibodies: CD133/2 (clone 293C3; Miltenyi); CD34 (clone 8G12; Becton Dickinson, Erembodegem, Belgium); CD14 (clone MEM15), CD45 (clone 15D9), CD54 (clone 1H4), and CD105 (clone MEM226; Immunotools, Friesoythe, Germany); CD144 (clone 16B1; eBioscience, Frankfurt, Germany); vWF (polyclonal antibody; ABD Serotec, Düsseldorf, Germany); and VEGFR2 (clone 89,106; R&D Research, Oxon Abingdon, UK). Proper isotype controls were included in all experiments. Fc blocking reagent (Miltenyi) was added before the antibodies to avoid nonspecific binding. Cells (20,000–40,000) were analyzed on a FACSCanto cytometer using FACSDiva software. Residual lymphocytes were excluded from all analyses by FSC/SSC gating. Doublets were also excluded. Overlays were performed using FlowJo 7.2.4 software.

The angiogenic capacity of cells was evaluated using a microtubules formation assay. Briefly, 25,000 cells were seeded onto a solidified layer of growth factor-reduced Matrigel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and cultured in EBM or EBM-2 medium for early and late EPC, respectively. The formation of microtubules was observed after 6–24 h.

Cell proliferation was assessed using CyQUANT cell proliferation assay kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Briefly, conditioned medium was removed, and CyQUANT GR dye (which exhibits strong fluorescence when bound to cellular nucleic acids) mixed with cell lysis buffer was added. Fluorescence intensity was measured after 10 min with a microplate reader.

Cell-cycle assays were performed by flow cytometry using PI. Briefly, cells were harvested using a nonenzymatic solution, and dead cells were stained using LIVE/DEAD fixable near-IR dead cell stain kit, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Cells were then fixed overnight in ethanol 70% before a 40-min incubation in a solution containing 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI, 0.1% Triton, and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A. Cells were analyzed on a

FACSCanto cytometer using FACSDiva software after exclusion of dead cells.

Transfection assays were performed directly in six-well plates using INTERFERin reagent (Polyplus Transfection, Illkirch, France) and without serum starvation. Anti-miR miRNA inhibitors and pre-miR miRNA precursors were purchased from Applied Biosystems (Lennik, Belgium). The FAM dye-coupled anti-miR and pre-miR negative controls (Applied Biosystems) were used to monitor transfection efficiency. The anti-miR and pre-miR negative controls (Applied Biosystems) were used as transfection controls. The average amount of dead cells following transfection was <5%, and dead cells were excluded for flow cytometry analyses.

Protein concentration in conditioned medium of early EPC was assessed by ELISA. VEGF was measured using the human VEGF Quantikine DVE00 kit (R&D Systems), with 5 pg/mL as a detection limit. TSP-1 was measured with the human TSP-1 quantikine kit (DTSP100; R&D Systems) with a detection limit of 0.355 ng/mL , and IL-8 was measured with the human CXCL8/IL-8 DuoSet kit (DY208; R&D Systems), with a detection limit of 3.5 pg/mL .

miRNA microarrays

Total RNA was extracted using the miRvana isolation kit (Applied Biosystems). Total RNA (100 ng) was dephosphorylated and then labeled using the miRNA complete labeling and hybridization kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) before hybridization for 20 h at 55°C onto miRNA human microarray release 12.0 slides (Agilent), as recommended by the manufacturer. Four replicate arrays/sample were hybridized. Slides were scanned with the Genepix 4000B scanner (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), and raw data were acquired with the Genepix Pro software (Molecular Devices). Spots with a signal:noise ratio ≤ 3 were filtered out. Average values of the replicate spots of each miRNA were background-subtracted and normalized by the quantile method (*normalizeQuantiles* function of the Bioconductor *limma* R package). Only miRNAs present in at least three of the four replicate arrays were retained for further analysis. Data were log₂-transformed and mean-centered for each feature using Gene Cluster 3.0 [17]. Hierarchical clustering was performed with TreeView [18] using Pearson correlation and the average-linkage algorithm. Differentially expressed miRNAs were identified using SAM software [19]. Three experiments from independent cultures were performed for early and late EPCs. Data are available at the Gene Expression Omnibus under Accession Number GSE27874.

miRNA target predictions

Putative miRNA target genes were identified from three different databases: microRNA.org [20], TargetScanHuman 5.1 [21], and PicTar [22]. Only overlapping targets were retained for analysis.

mRNA microarrays

Total RNA was extracted using TriReagent and the RNeasy mini kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands), amplified using the Amino Alkyl Message-Amp kit (Ambion, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) and labeled with Cy3 or Cy5 dyes (Amersham, Buckinghamshire, UK) before hybridization onto 25,000 gene microarrays. Experimental protocol, raw data acquisition, preprocessing, and analyses using SAM software have been described previously in details [23, 24]. Three independent experiments were performed for each cell type. The Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery [25] was used to identify gene ontology terms enriched by predicted targets of the miR-16 family. Data are available at the Gene Expression Omnibus under Accession Number GSE26744.

Real-time qPCR

Expression levels of miR-15a/-15b/-16/-103/-107 were measured using quantitative miRNA stem loop RT-PCR technology (TaqMan miRNA assays; Applied Biosystems). This assay uses gene-specific stem-loop RT primers and TaqMan probes to detect mature miRNA transcripts. Each reverse

transcription was performed using 10 ng total RNA and the TaqMan miRNA RT kit (Applied Biosystems). Real-Time PCR was performed on a BioRad IQ5 apparatus using the TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Applied Biosystems). The amplification steps consisted of initial denaturation at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing at 60°C for 1 min. The TaqMan specific primer U24 small nucleolar RNA was used for normalization with the $\Delta\Delta$ threshold cycle method [Gene Expression Macro; Bio-Rad, Hercules, CA, USA].

Expression levels of CCND1, CCNE1, CDK6, SERBP1, SNRK, UBE2V1, and USP25 mRNAs were assessed using SYBR Green-based qPCR, and the following primers were designed using Beacon Designer software (Premier Biosoft, Palo Alto, CA, USA): CCND1 forward 5'-GCAGAGGATGTTTCATA-AGG-3', reverse 5'-AAAGGCAGAAAGTTTTGTG-3'; CCNE1 forward 5'-GT-GTGGGAGCCAGCCTTG-3', reverse 5'-ATCATCTTCTTTGTGAGGTGTGG-3'; CDK6 forward 5'-AATTGAGAAGTTTGTAAACAGATAT-3', reverse 5'-TTTGCTGGGTAAATGT-3'; SERBP1 forward 5'-AAGGAATAAGACGA GTTG-3', reverse 5'-TCAATAATCGGTCTATCAA-3'; SNRK forward 5'-CTG-TATTATAGCCTTATTAGTT-3', reverse 5'-GCACAATCATTCACTTAT-3'; UBE2V1 forward 5'-GCATGAAGATACTTGTAAGC-3', reverse 5'-TTGTTT-CAGTTGTGACATT-3'; USP25 forward 5'-GCTGTAGAAGATATGAGA-3', reverse 5'-TGGAAATGAAGGTAAGT-3'; β -actin forward 5'-AGAAAATCG-GCACACACC-3', reverse 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAA-3'. β -Actin was used as a housekeeping gene for normalization. Expression values were calculated using the Genex Macro, which takes into account primer efficiency (Bio-Rad).

Luciferase assay

HEK 293T cells were cultured in DMEM, supplemented with 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin, and 1% L-glutamine. HEK-293T cells were cotransfected with pre-miR miRNA precursor hsa-miR-16 (Applied Biosystems) and a reporter plasmid containing the 3' UTR of CCND1 inserted downstream of the luciferase reporter gene (pEZX-MT02; GeneCopoeia; LabOmics, Nivells, Belgium). pEZX-MT02 (100 ng) and 30 nmol/L pre-miR-16 or the corresponding control complexed to Lipofectamine 2000 (Invitrogen) were added to 60% confluent HEK-293T in a 96-well plate. Forty-eight hours after transfection, luciferase assay was performed on cell-culture supernatant using Secrete-Pair dual luminescence kit (GeneCopoeia; LabOmics).

Immunoblotting

Total proteins were extracted after homogenization of cells on ice with cell lysis buffer (Cell Signaling, Leiden, The Netherlands), added with protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany) and Immol/1 PMSF. Total proteins (20 μ g) were resolved on 4–8% polyacrylamide gels and transferred onto Immobilon-P membranes (Millipore, Brussels, Belgium). Blots were probed with primary antibodies and were revealed with donkey anti-mouse IgGs coupled to HRP (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) and ECL (SuperSignal West Dura extended duration substrate; ThermoFischer Scientific, Erembodegem, Belgium). Primary antibodies were from Cell Signaling: mouse monoclonal anti-human CCND1 (clone DCS6), CCNE1 (clone HE12), CDK6 (clone DCS83). A mouse anti-human GAPDH mAb (clone 9484; Abcam, Cambridge, UK) was used as loading control.

In vitro angiogenesis assay

HUVECs were cultured in EBM-2 medium, supplemented with human endothelial growth factor, FGF-B, insulin growth factor 1, hydrocortisone, VEGF, ascorbic acid, gentamicin, amphotericin B, and 5% FBS (Lonza). Early EPCs were transfected with anti-miR-16 during 24 h. Media were collected, and then cells were stained with a fluorescent probe (CellTracker Green 5-chloromethylfluorescein diacetate; Invitrogen). Thirty thousand HUVECs and 5000 early EPCs were seeded onto a solidified layer of growth factor-reduced Matrigel (BD Biosciences) on a 48-well plate. Cells were cultured in 75% of conditioned medium of early EPCs treated by anti-miR-16 and 25% of EBM-2 medium, supplemented with 2% FBS. The formation of

microtubules and the insertion of early EPCs in a microtubule network were observed during 24 h by light and fluorescence microscopy.

Statistical analyses

Statistical analyses were conducted with the SigmaPlot v11.0 software. The Shapiro-Wilk test was used for normality assessment. Comparisons between two groups were performed by *t*-test for normally distributed data and Mann-Whitney test for non-normally distributed data. One-way ANOVA was used for multiple group comparisons. A *P* value <0.05 was considered significant.

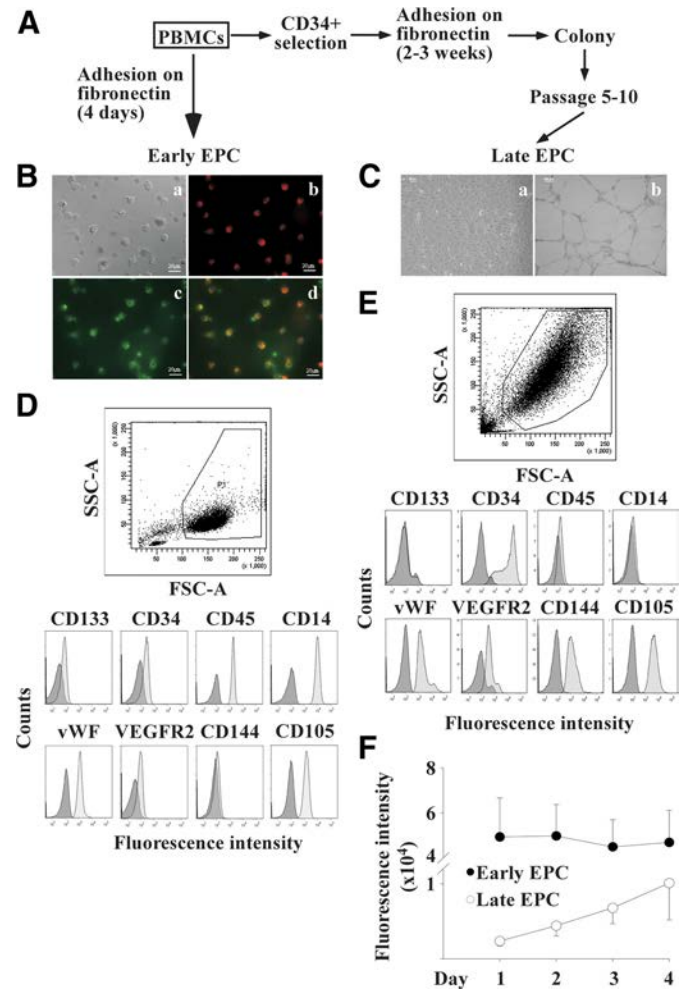


Figure 1. Characterization of early and late EPCs. (A) Experimental protocols used to obtain early and late EPCs. (B) Early EPCs, obtained 4 days after plating PBMCs onto human fibronectin-coated plates (a, phase contrast), were positive for DiIAcLDL uptake (b) and lectin binding (c); (d) overlay. (C) Late EPCs displayed a morphology of endothelial cells when cultured onto plastic (a) and formed microtubules when seeded onto Matrigel (b). (D and E) Flow cytometry analysis. Upper panels show FSC/SSC plots attesting for cell population homogeneity. The PI gates used to select cells to be analyzed are displayed. Lower panels show the expression of cell-surface markers. Dark gray: isotype control; light gray: specific staining. SSC/FSC-A, SSC/FSC-area. (F) Late EPC proliferate ($P<0.001$), whereas early EPCs do not ($P=0.30$). Results are mean \pm SD ($n=3$).

RESULTS

Characterization of early and late EPCs

Early and late EPCs were obtained from PBMCs of healthy volunteers, as shown in Fig. 1A. Early EPCs were obtained by adhesion of PBMCs onto fibronectin-coated plates. To obtain late EPCs, CD34⁺ cells were purified from PBMCs and seeded onto fibronectin-coated plates and clonally expanded. Early EPCs were characterized by their ability to bind lectins and to take up DilAcLDL (Fig. 1B). Late EPCs appeared as endothelial cells when seeded onto plastic and spontaneously formed microtubules when seeded onto Matrigel (Fig. 1C). Cells were then characterized by flow cytometry. The populations of early and late EPCs were homogenous, as demonstrated by FSC/SSC (Fig. 1D and E). Surface expression of the following markers was investigated: CD133 and CD34 (progenitor-specific); CD45 (leukocyte-specific); CD14 (myeloid-specific); vWF, VEGFR2, CD144, and CD105 (endothelial-specific). Early EPCs were CD133⁺/CD34⁺/CD45⁻/CD14⁻/vWF⁺/VEGFR2⁺/CD144⁻/CD105⁺ (Fig. 1D); late EPCs were CD133⁻/CD34⁺/CD45⁻/CD14⁻/vWF⁺/VEGFR2⁺/CD144⁺/CD105⁺ (Fig. 1E). Late EPCs proliferated, whereas early did not (Fig. 1F).

miRNA transcriptome of early and late EPCs

Microarrays were used to characterize miRNAs expressed by early and late EPCs. Out of the 695 miRNAs present on the microarrays, 114 miRNAs were detected in early EPCs, and 120 miRNAs were detected in late EPCs. A heat map representing the expression levels of the 87 miRNAs commonly expressed

between the two cell subtypes is presented in Fig. 2A. With the use of SAM with a threshold fold-change of 1.3, we identified 16 miRNAs overexpressed in early EPCs and 7 overexpressed in late EPCs (Fig. 2B and Table 1). In addition, 11 miRNAs were detected only in early EPCs and 21 only in late EPCs (Supplemental Table 1). This allowed the drawing of a map of the miRNA transcriptome of these two cell types, showing that miR-21/-720/-1274b/-923 are abundant in both cell types, miR-142-3p and miR-223 are only detected in early EPCs, and miR-126 is only detected in late EPCs (Fig. 2C).

Differential expression of miR-16 family members between early and late EPCs

Analysis of the miRNAs differentially expressed between early and late EPCs highlighted several members of the miR-16 family, which consists of at least 17 miRNAs, in cluster with miR-16 (miR-15a) [26, 27] or displaying seed-region identity with miR-16 (miR-15b/-17-5p/-20a/-34/-34a/-103/-106b/-107/-141/-192/-195/-200a/-215/-424/-let-7b) [28]. Out of these 17 miRNAs, 5 (miR-15a/-15b/-16/-103/-107) were more expressed in early EPCs compared with late EPCs (Table 1). This observation was confirmed by qPCR (Fig. 2D). Experiments using early and late EPCs isolated from the same donor attested that isolation techniques did not interfere with this observation (not shown).

Prediction of target genes

We next interrogated three web-accessible databases (miRNA database, TargetScan, and PicTar) for predicted target genes

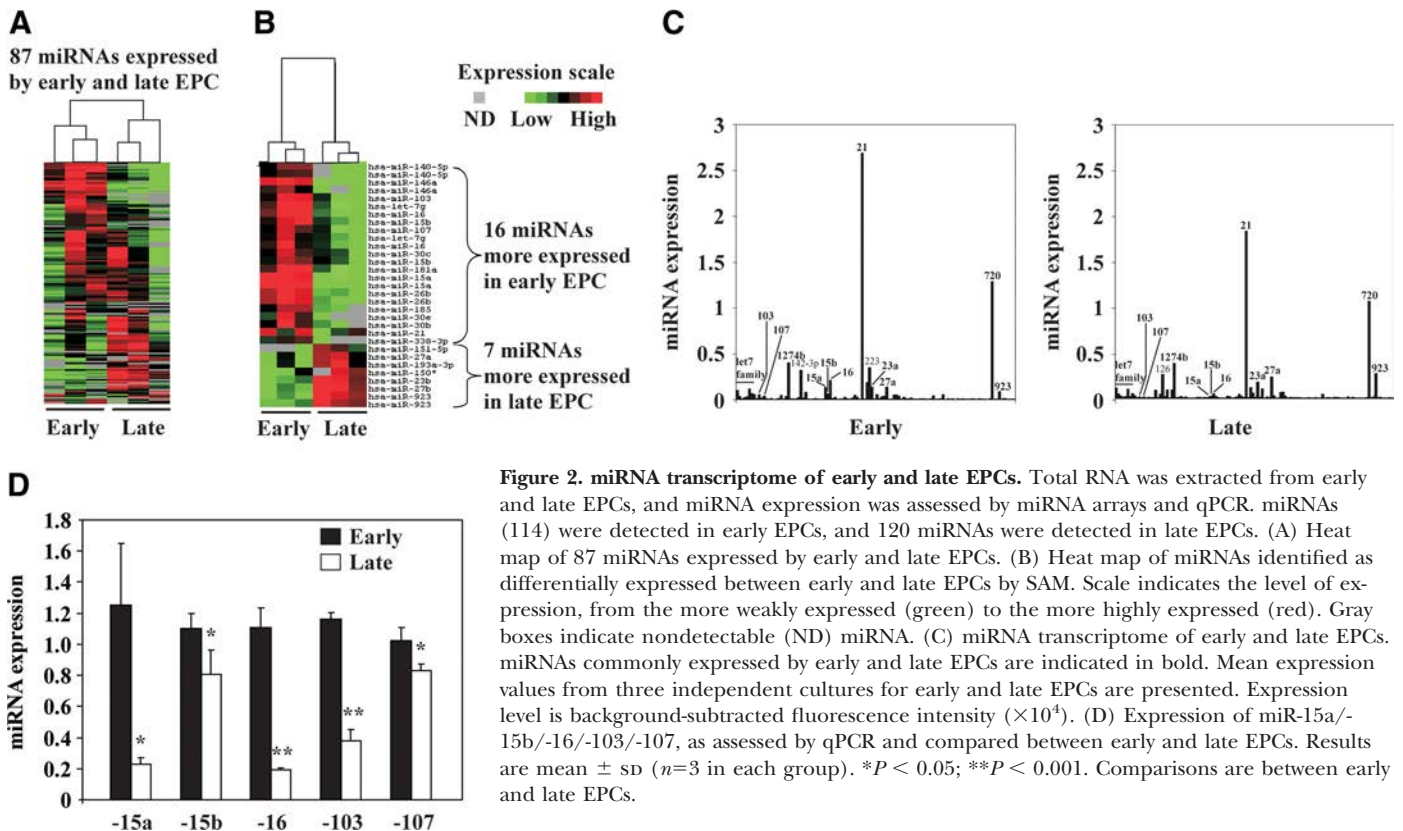


Figure 2. miRNA transcriptome of early and late EPCs. Total RNA was extracted from early and late EPCs, and miRNA expression was assessed by miRNA arrays and qPCR. miRNAs (114) were detected in early EPCs, and 120 miRNAs were detected in late EPCs. (A) Heat map of 87 miRNAs expressed by early and late EPCs. (B) Heat map of miRNAs identified as differentially expressed between early and late EPCs by SAM. Scale indicates the level of expression, from the more weakly expressed (green) to the more highly expressed (red). Gray boxes indicate nondetectable (ND) miRNA. (C) miRNA transcriptome of early and late EPCs. miRNAs commonly expressed by early and late EPCs are indicated in bold. Mean expression values from three independent cultures for early and late EPCs are presented. Expression level is background-subtracted fluorescence intensity ($\times 10^4$). (D) Expression of miR-15a/-15b/-16/-103/-107, as assessed by qPCR and compared between early and late EPCs. Results are mean \pm SD ($n=3$ in each group). * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$. Comparisons are between early and late EPCs.

TABLE 1. Differentially Expressed miRNAs between Early and Late EPCs

ID	Name	Fold-change	q Value (%)
A_25_P00014817	hsa-miR-15a	7.64	0.00
A_25_P00010467	hsa-miR-15a	6.04	0.00
A_25_P00010078	hsa-miR-146a	5.45	0.00
A_25_P00012396	hsa-miR-338-3p	4.99	0.00
A_25_P00014818	hsa-miR-16	4.86	0.00
A_25_P00012002	hsa-miR-26b	3.84	0.00
A_25_P00012001	hsa-miR-26b	3.40	0.00
A_25_P00014832	hsa-miR-181a	3.37	0.00
A_25_P00012142	hsa-let-7g	3.35	0.00
A_25_P00014838	hsa-miR-30b	3.24	3.71
A_25_P00011004	hsa-miR-103	3.03	0.00
A_25_P00010079	hsa-miR-146a	2.96	0.00
A_25_P00011101	hsa-miR-15b	2.70	0.00
A_25_P00010599	hsa-miR-16	2.57	3.71
A_25_P00012301	hsa-miR-30e	2.43	3.71
A_25_P00010607	hsa-miR-140-5p	2.33	0.00
A_25_P00011069	hsa-miR-107	2.21	0.00
A_25_P00012239	hsa-miR-185	2.06	3.71
A_25_P00013930	hsa-miR-140-5p	1.97	0.00
A_25_P00012141	hsa-let-7g	1.97	3.71
A_25_P00013883	hsa-miR-30c	1.78	3.71
A_25_P00010975	hsa-miR-21	1.76	3.71
A_25_P00011102	hsa-miR-15b	1.76	3.71
A_25_P00010797	hsa-miR-27a	0.45	2.96
A_25_P00013450	hsa-miR-150*	0.43	2.96
A_25_P00012376	hsa-miR-151-5p	0.38	2.96
A_25_P00012258	hsa-miR-193a-3p	0.36	2.96
A_25_P00013051	hsa-miR-923	0.35	2.96
A_25_P00010881	hsa-miR-23b	0.35	2.96
A_25_P00013050	hsa-miR-923	0.24	2.96
A_25_P00014837	hsa-miR-27b	0.24	2.96

miRNA expression values between early and late EPCs were compared with SAM. Fold-change and q values are indicated. Fold-change >1 indicates a higher expression in early EPCs compared with late EPCs. False discovery rate was 3%. miR-16 family members are in bold.

of miR-15a/-15b/-16/-103/-107. A total of 375 target genes was identified and considered for further analyses: 91, 56, 123, 181, and 1 targets were selected for miR-15a, -15b, -16, -103, and -107, respectively (Supplemental Table 2).

Correlation between the expression of miRNAs and target genes

To test the accuracy of the prediction of target genes, we flanked the 375 predicted genes with expression values obtained by mRNA microarrays. Of these 375 genes, 289 were expressed by early or late EPCs or both. A heat map of these 289 genes revealed strong differences between the two cell types (Supplemental Fig. 1). Functional classification of these genes into gene ontology terms revealed an enrichment of biological pathways involved in the regulation of the cell cycle. For instance, the term “interphase of mitotic cell cycle” and the “cell cycle pathway” were enriched significantly ($P=5 \times 10^{-5}$ and 2×10^{-2} , respectively). Three genes were found repeatedly in enriched terms: CCND1, CCNE1, and

CDK6. CCND1 and CCNE1 belong to the cyclin family of regulators of cell-cycle progression. CCND1 is responsible for cell-cycle entry from the G0- to G1-phase, and CCNE1 is responsible for entry into S-phase. CDK6 is the catalytic subunit of CCND1 necessary for G1-phase progression and for the transition from G1-phase to S-phase.

Expression data of CCND1, CCNE1 and CDK6, as obtained by microarrays, are shown in Fig. 3A and Table 2. qPCR confirmed that all three genes were less expressed in early EPCs compared with late EPCs. The differences were robust: 3-, 170-, and 15-fold for CCND1, CCNE1, and CDK6, respectively (Fig. 3B). Immunoblotting experiments showed almost no expression of the three genes in early EPCs and high expression levels in late EPCs (Fig. 3C).

CCND1 was predicted as a target of miR-16, CCNE1 was predicted as a target of miR-16 and miR-103, and CDK6 was predicted as a target of miR-103 (Supplemental Table 2). This prediction is in accordance with the high levels of miR-16 and miR-103 (Fig. 2) and the low levels of CCND1, CCNE1, and CDK6 (Fig. 3) observed in early EPCs.

miRNA-16 regulates cyclin expression in EPCs

EPCs were transfected with pre-miR-16 and anti-miR-16 to assess the regulation of cyclin expression by miR-16. Transfection efficiency was ensured using FAM dye-coupled anti-miR and pre-miR negative controls and flow cytometry (Supplemental Fig. 2A). In addition, with the use of qPCR, we observed a down-regulation of miR-16 by anti-miR-16 in early EPCs and an up-regulation of miR-16 by premiR-16 in late EPCs (Supplemental Fig. 2B). In late EPCs, pre-miR-16 decreased the expression of CCND1, CCNE1, and CDK6 (Fig. 4A). Conversely, in early EPCs, anti-miR-16 increased CCND1 and CDK6 expression, whereas no significant effect was detected on CCNE1 (Fig. 4B).

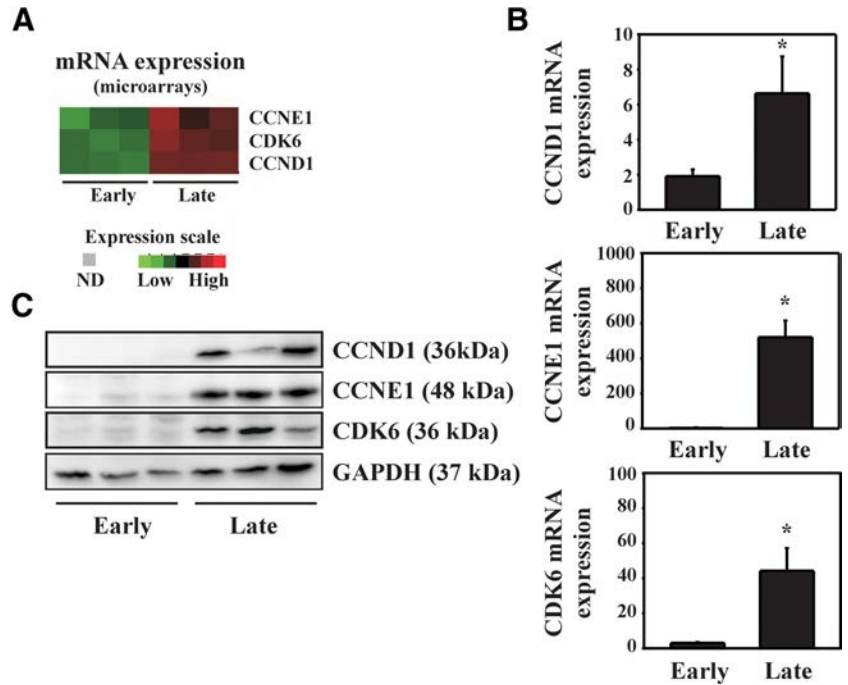
Evidence that miR-16 directly targets CCND1

To validate that miR-16 effectively regulates the expression of CCND1, a luciferase assay was performed using HEK-293T cells. CCND1 was preferred to CCNE1 in these experiments, as it was more reproducibly regulated by miR-16 (Fig. 4A and B). HEK-293T cells were cotransfected with a pre-miR-16 and a plasmid containing the 3’ UTR of CCND1, inserted downstream of the Gaussian luciferase-secreted reporter gene. Cells transfected with the plasmid displayed a high luciferase activity, and addition of pre-miR-16 inhibited this activity (Fig. 4C). This result confirmed that miR-16 binds the 3’ UTR of CCND1 and thereby inhibits its expression.

Blockade of miR-16 restores cell-cycle progression in early EPCs

We tested whether the down-regulation of cyclin expression by miR-16 observed in early EPCs could be responsible for the incapacity of these cells to divide. Early EPCs were transfected with anti-miR-16, and the percentage of cells in each phase of the cell cycle was determined by flow cytometry (Fig. 5). Early EPCs were selected on FSC/SSC plots, excluding cell debris and residual lymphocytes (typically <6%), doublets, and dead

Figure 3. Expression of CCND1, CCNE1, and CDK6 in early and late EPCs. (A) mRNA array data showing up-regulation of the cyclins CCND1, CCNE1, and CDK6 in late EPCs. Scale indicates the level of expression, from the more weakly expressed (green) to the more highly expressed (red). Data from three independent cultures of early and late EPCs are shown. (B) qPCR results showing a higher expression of the three cyclins in late EPCs compared with early EPCs. mRNA expression was normalized to β -actin. Results are mean \pm SD ($n=6$ in each group). $*P < 0.005$. Comparisons are between early and late EPCs. (C) Immunoblotting showing almost absent protein expression of the three cyclins in early EPCs. A representative experiment from three independent cultures of early and late EPCs is shown.



cells (Fig. 5A). In these experiments, FSC/SSC plots of early EPCs resembled the scatter plots of late EPCs shown in Fig. 1E, where cells have a higher granularity. This morphological change of early EPCs was consecutive to transfection. Percentages of cells in the different phases of the cycle were determined using PI staining (Fig. 5B and C). Under control conditions, the vast majority (97%) of cells was blocked in the G0/G1-phase. Addition of anti-miR-16 dose-dependently relieved this blockade, as attested by a decrease of the percentage of cells in the G0/G1-phase, paralleled by an increase of the percentage of cells in the S-phase and G2/M-phase. This effect is however modest, as 5% of cells, on average, re-enter the cell cycle upon treatment with anti-miR-16.

Regulation of cell differentiation by miR-16

miR-16 has been shown to regulate cell differentiation [29]. To investigate potential effects of miR-16 in the differentiation status of EPCs, we identified from mRNA microarrays four genes with expression values inversely correlated with miR-16 expression and sharing functions related to cell differentiation: USP25, SERBP1, UBE2V1, and SNRK. These four genes were less expressed in early EPCs compared with late EPCs, as

assessed by mRNA microarrays (Fig. 6A and Table 3) and qPCR (Fig. 6B). Therefore, in early EPCs, a high level of miR-16 is associated with a low expression of genes linked to cell differentiation. We verified that miR-16 indeed targets USP25 in early EPCs, as anti-miR-16 administration dose-dependently increased USP25 mRNA expression (Fig. 6C). However, anti-miR-16 had no significant effect on SERBP1, UBE2V1, and SNRK (Supplemental Fig. 3). Differentiation of early EPCs toward an endothelial phenotype was stimulated by anti-miR-16, as attested by enhancement of cell-surface expression of the endothelial markers VEGFR2, CD144, CD54, and CD105 (Fig. 6D).

Inhibition of miR-16 stimulates the paracrine function of early EPCs

We investigated whether antagonism of miR-16 affects the paracrine function of early EPCs. Concentrations of the pro-angiogenic factors VEGF and IL-8 and of the anti-angiogenic factor TSP-1 were measured in supernatants of early EPCs treated with anti-miR-16. VEGF was undetectable, and TSP-1 secretion was not affected by anti-miR-16 (data not shown). It is interesting that IL-8 secretion was increased dose-depend-

TABLE 2. Expression of Proliferation-Related Genes in Early and Late EPCs

Target gene	Expression value (mean \pm SD)		Fold change	SAM (q value, %)	t -Test (P value)
	Early EPC	Late EPC			
CCND1	326 \pm 40	13110 \pm 483	40	0	<0.001
CCNE1	483 \pm 32	707 \pm 56	1.5	0.06	0.004
CDK6	229 \pm 25	2036 \pm 483	9	0.06	0.003

mRNA expression values obtained by microarrays are shown as mean \pm SD of three independent experiments for early and late EPCs. Differences between early and late EPCs analyzed by SAM are given as q value and by t -test as standard P value.

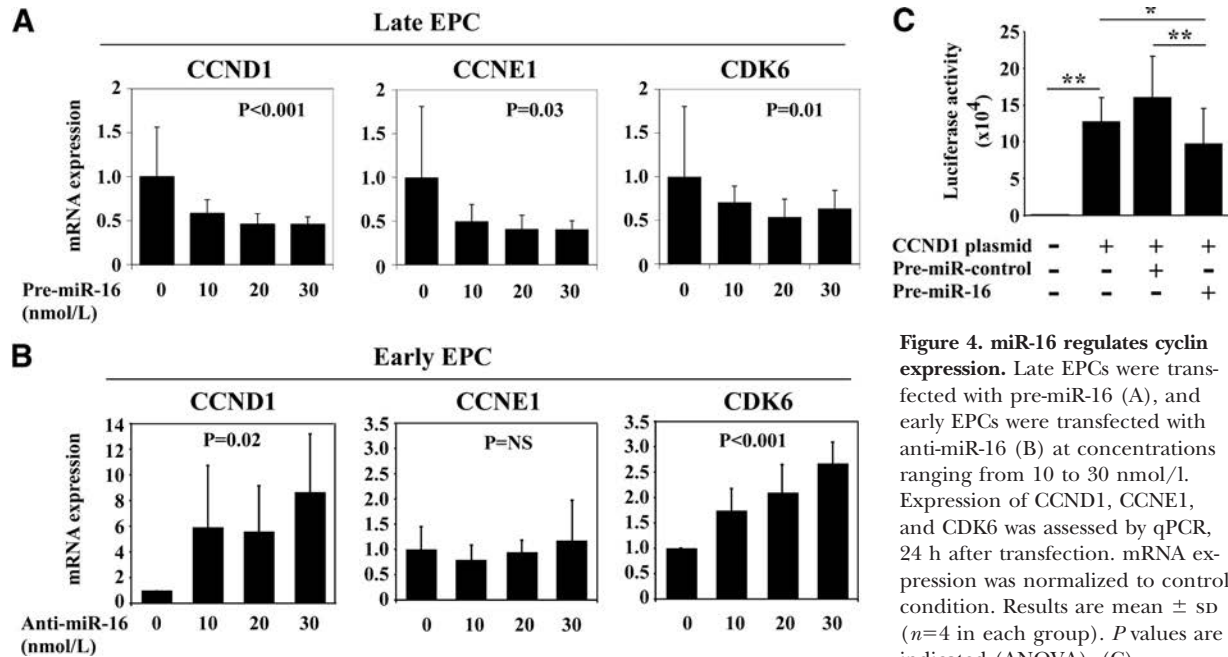


Figure 4. miR-16 regulates cyclin expression. Late EPCs were transfected with pre-miR-16 (A), and early EPCs were transfected with anti-miR-16 (B) at concentrations ranging from 10 to 30 nmol/l. Expression of CCND1, CCNE1, and CDK6 was assessed by qPCR, 24 h after transfection. mRNA expression was normalized to control condition. Results are mean ± SD (n=4 in each group). P values are indicated (ANOVA). (C)

HEK293T were transfected with 30 nmol/l premiR-16 or premiR-control and 100 ng plasmid pEZX-MT02 containing the 3' UTR of CCND1 inserted downstream of the Gaussian luciferase-secreted reporter gene. Luciferase activity was measured in conditioned medium by luminescence assay 48 h after transfection. Results are mean ± SD (n=6). *P < 0.05; **P < 0.001.

ently upon anti-miR-16 treatment (Fig. 7). This result suggests that miR-16 blockade may stimulate the paracrine pro-angiogenic function of early EPCs.

Inhibition of miR-16 promotes the formation of capillary-like structures

Finally, we addressed whether antagonism of miR-16 stimulates the capacity of early EPCs to promote the formation of capillary-like structures (microtubules) by HUVECs. Early EPCs were treated by anti-miR-16, stained by a fluorescent probe, and then cocultured with HUVECs on a growth factor-reduced Matrigel monolayer, in the presence of 75% of conditioned medium from treated EPCs. As shown in Fig. 8, the number of cells in each condition was homogenous (1-h picture). The microtubule network was initiated 6 h after cell seeding and started to decline after 22 h. HUVEC coculture with anti-miR-16-treated EPCs and their conditioned medium developed a more organized network with thicker capillary-like structures. After 22 h, the microtubule network was better preserved in anti-miR-16 conditions, with thicker anastomosing capillaries. Observation under fluorescence microscopy attested that EPCs were inserted in a capillary-like structure. This result shows that antagonism of miR-16 has the potential to improve the pro-angiogenic function of early EPCs.

DISCUSSION

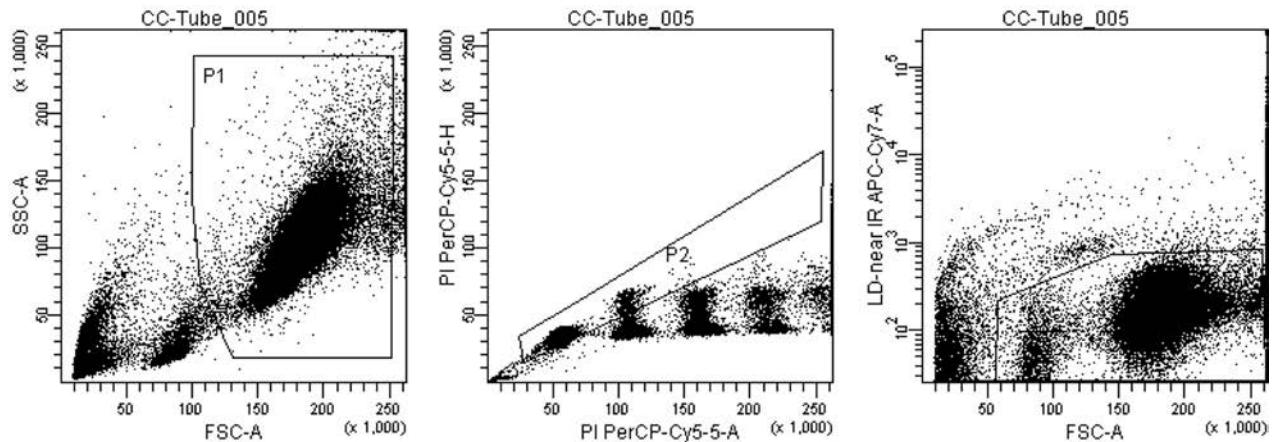
In the present study, we combined miRNA and mRNA analyses to discover new effects of miRNAs in EPCs. Having characterized distinct miRNA transcriptomes between early and late EPCs, we have shown that miR-16 stimulates cell-cycle progres-

sion and differentiation of early EPCs. This may have important therapeutic implications.

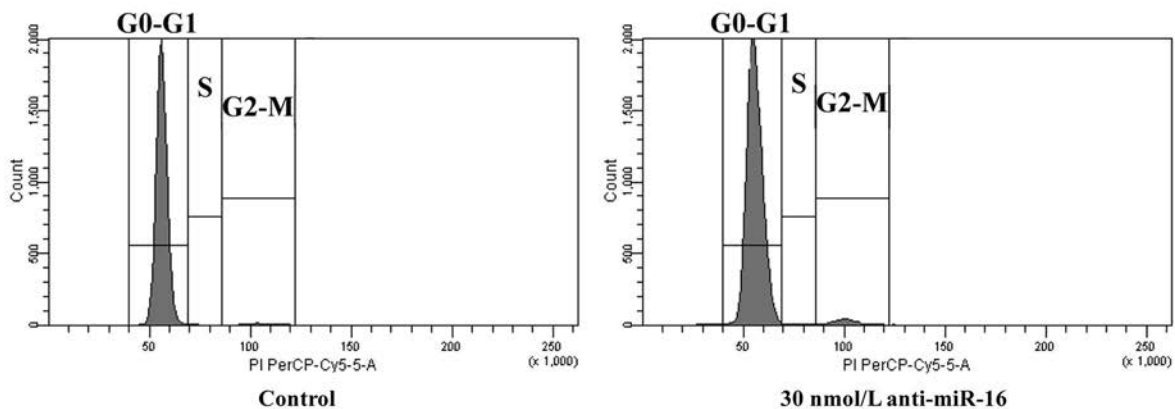
EPCs have been widely investigated in in vitro and in vivo settings. Although their phenotypic characterization has been a major subject of investigation, there is still intense controversy regarding their accurate definition [2, 5, 30–33]. This is, in part, related to their relatively low frequency in peripheral circulation and the multiplicity of techniques being used for their isolation. The concept of two distinct populations differing in phenotype and angiogenic properties has emerged with the description of early and late EPCs [4, 5]. Our phenotypic characterization of these two cell types is consistent with previous studies showing that early EPCs are close to leukocytes, as they express the leukocyte markers CD45 and CD14 [4, 16], whereas late EPCs resemble endothelial cells, as they express several endothelial markers. However, whereas only some late EPCs isolated from mononuclear cells express the progenitor cell marker CD34 [5], all of our late EPCs express CD34, as they are isolated after CD34-positive selection. In addition, we observed that late EPCs are able to form microtubules spontaneously, as observed previously by others [3], whereas the angiogenic capacities of early EPCs rely more on their ability to secrete a high quantity of angiogenic cytokines [34]. Another striking difference resides on their capacity to proliferate: we noticed that late EPCs have a high proliferation rate, whereas early EPCs are unable to self-regenerate.

We have characterized and compared the miRNA transcriptome of early and late EPCs. This comparison is limited by the fact that early and late EPCs did not originate from the same donor. Indeed, isolation of early and late EPCs from a single donor was not feasible throughout the study

A



B



C

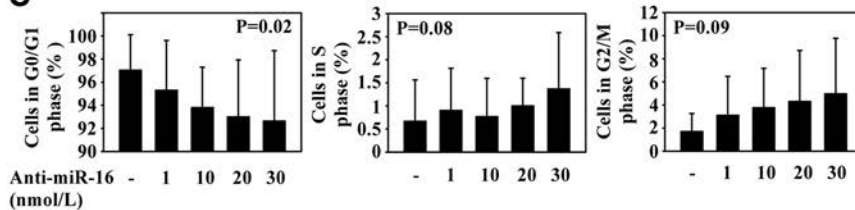


Figure 5. miR-16 inhibits cell-cycle progression in early EPCs. Early EPCs were transfected with anti-miR-16 at concentrations ranging from 1 to 30 nmol/l. Cell-cycle progression was evaluated by flow cytometry using PI, 24 h after transfection. (A) Early EPCs were selected on a FSC/SSC plot after exclusion of cell debris and residual lymphocytes (left panel), doublets (middle panel), and dead cells (right panel). LD-near IR, Laser diode-near infrared; APC, allophycocyanin. (B) Histograms showing the repartition of cells in the different phases of the cell cycle using PI staining. A representative experiment of three is shown. (C) Percentages of cells in the different phases of the cycle. Left panel: G0/G1-phase; middle panel: S-phase; right panel: G2/M-phase. Results are mean \pm SD ($n=3$). *P* values are indicated (ANOVA).

as a result of the high number of PBMCs required for each isolation. However, in some experiments, where early and late EPCs could be isolated from the same donor, we confirmed that isolation techniques did not interfere with our results.

With the use of clustering analyses, we showed that early and late EPCs can be discriminated by their miRNA expression profile. A microarray analysis of 312 miRNAs in angiogenic progenitor cells, which are identical to the early EPCs used in the present study, has been reported [14]. In this study, angiogenic progenitor cells readily expressed miRNAs of the let-7 family, as well as miR-21/-16/-191/-223/-23a/-23b. Our data on 695 miRNAs are consistent with these observa-

tions and provide an update of the knowledge of miRNA expression in EPCs.

A principle of systems biology is to combine different sources of interacting data to provide deeper insights than either source alone. Our study was based on this principle and shows that combined analysis of miRNA and mRNA biosignatures allowed for the discovery of meaningful insights into the regulation of the biology of EPCs by miRNAs. Coupling transcriptional and proteomic profiling with ultrastructural observation by electron microscopy, Medina et al. [35] provided a detailed molecular fingerprint of early and late EPC populations. Consistent with our data, the authors reported that early EPCs share high homology with monocytes and late EPCs with

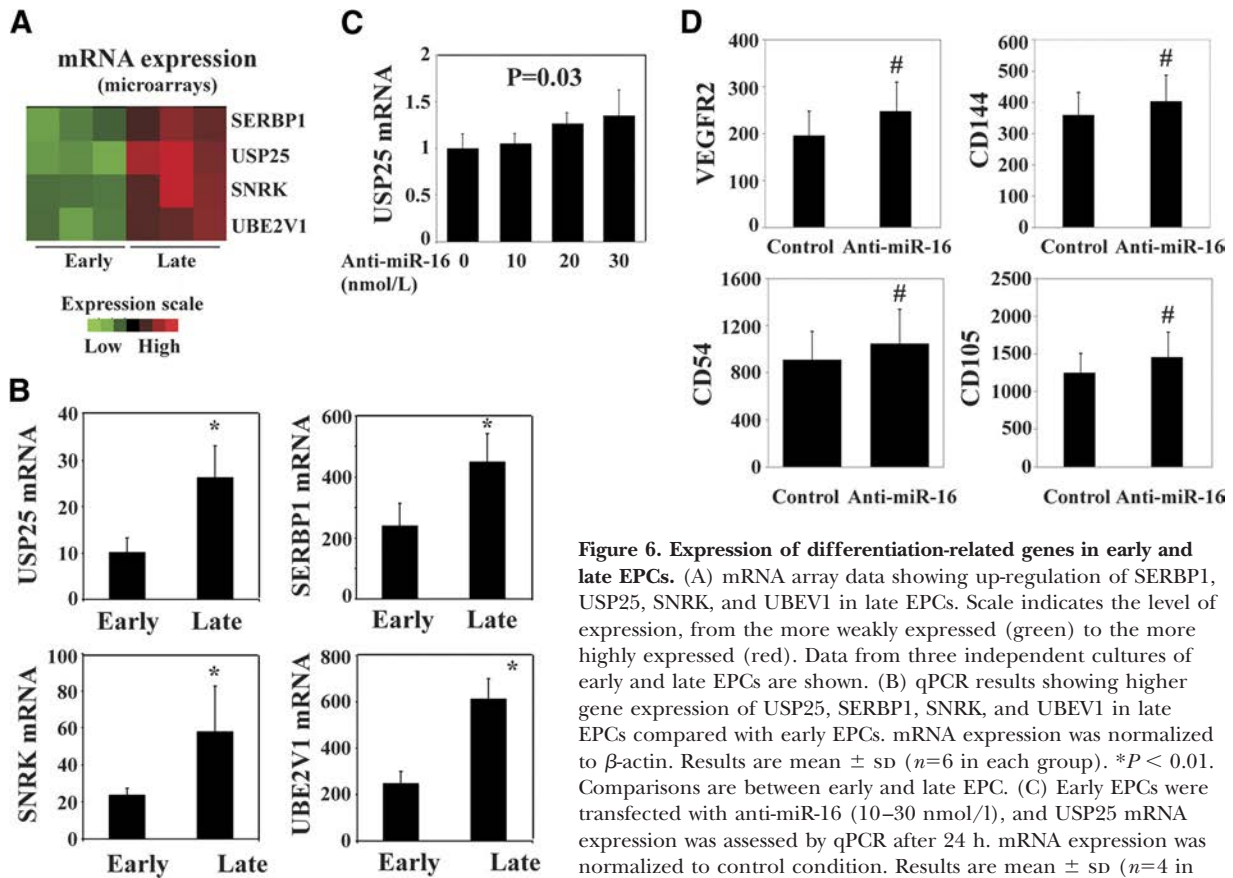


Figure 6. Expression of differentiation-related genes in early and late EPCs. (A) mRNA array data showing up-regulation of SERBP1, USP25, SNRK, and UBEV1 in late EPCs. Scale indicates the level of expression, from the more weakly expressed (green) to the more highly expressed (red). Data from three independent cultures of early and late EPCs are shown. (B) qPCR results showing higher gene expression of USP25, SERBP1, SNRK, and UBEV1 in late EPCs compared with early EPCs. mRNA expression was normalized to β -actin. Results are mean \pm SD ($n=6$ in each group). $*P < 0.01$. Comparisons are between early and late EPC. (C) Early EPCs were transfected with anti-miR-16 (10–30 nmol/l), and USP25 mRNA expression was assessed by qPCR after 24 h. mRNA expression was normalized to control condition. Results are mean \pm SD ($n=4$ in each group). P value is indicated (ANOVA). (D) Early EPCs were transfected with 30 nmol/l anti-miR-16, and expression of endothelial markers was assessed by flow cytometry after 24 h. Results are mean \pm SD ($n=3$). $\#P < 0.05$. Comparisons are between control and anti-miR-16 conditions.

transfected with 30 nmol/l anti-miR-16, and expression of endothelial markers was assessed by flow cytometry after 24 h. Results are mean \pm SD ($n=3$). $\#P < 0.05$. Comparisons are between control and anti-miR-16 conditions.

endothelial cells. In this study, however, cyclin family members were not identified as differentially expressed between early and late EPC populations. Therefore, combined analyses of miRNA and mRNA profiles allowed for the detection of EPCs features that could not be identified by mRNA or protein analysis alone.

miR-34a and miR-21 impair the angiogenic capacity of EPCs through induction of senescence and inhibition of migratory capacity, respectively [14, 15]. Our data are consistent with this effect of miR-21 in early EPCs, a cell population, which in contrast to late EPCs, expresses high levels of miR-21 and does

not proliferate. With respect to miR-34a, no significant difference between early and late EPCs was found in our study.

It is known that some members of the miR-16 family are involved in the progression of the cell cycle from the G0- to S-phase, thereby inducing cell-cycle arrest and acting as potent tumor suppressors [26, 27, 36]. This effect is attributed to down-regulation of the expression of several cyclins, which are major inducers of cell-cycle progression. In this study, we have shown first, that this important mechanism preventing cell proliferation is also present in nonmalignant cells and second, that it can be reversed by administration of anti-miR-16. How-

TABLE 3. Expression of Differentiation-Related Genes in Early and Late EPCs

Target gene	Expression value (mean \pm SD)		Fold change	SAM (q value, %)	t -Test (P value)
	Early EPC	Late EPC			
USP25	360 \pm 40	1316 \pm 220	3.8	0	0.002
SERBP1	4381 \pm 585	11,099 \pm 1500	2.6	0	0.002
SNRK	1103 \pm 20	3137 \pm 751	2.9	0	0.009
UBE2V1	1971 \pm 219	5114 \pm 535	2.7	0	<0.001

mRNA expression values obtained by microarrays are shown as mean \pm SD of three independent experiments for early and late EPCs. Differences between early and late EPCs analyzed by SAM are given as q value and by t -test as standard P value.

ever, the percentage of cells re-entering the cell cycle after anti-miR-16 treatment was relatively low, not exceeding 13% upon administration of the highest dose of anti-miR-16. This effect, although reproducible in all experiments, was of borderline significance, most probably as early EPCs were primary cells obtained from different donors that respond differently to treatments. Transfection efficiency may not be responsible for a large part of the variability observed in the cell responses to anti-miR-16, as proper controls (FAM-coupled anti-miR and premiR negative controls) ensured transfection efficiency.

The moderate effect of miR-16 on cell-cycle progression may be explained partly by the absence of an increase of CCNE1 expression by anti-miR-16. CCNE1 is critical for cell-cycle re-entry, as it allows the transition from the G1- to S-phase. The majority of early EPCs was blocked in the G0/G1-phase, even after transfection with anti-miR-16. Database interrogation revealed that CCNE1 is also a potential target of miR-15a/-15b/-26b/-107/-103, which were overexpressed in early EPCs. In addition to providing an explanation of why the sole inhibition of miR-16 was not sufficient to increase CCNE1 expression, this suggests that multiple anti-miRs may amplify the effect of anti-miR-16 on the proliferation of early EPCs.

In addition to modulating cell-cycle progression, we have observed that miR-16 regulates the differentiation of early EPCs. This finding is consistent with a previous study having shown a down-regulation of miR-16 expression during the transition from monocytes to macrophages [29]. In early EPCs, the expression of four genes known to regulate cell differentiation (USP25, SERBP1, UBE2V1, SNRK) was very low as compared with the differentiated late EPCs. The parallel between high expression of miR-16 and low expression of these four genes in early EPCs suggested that miR-16 may prevent the differentiation of these cells. Accordingly, antagonism of miR-16 increased the differentiation of early EPCs toward a more endothelial-like phenotype, as attested by increased expression of several endothelial cell surface markers, such as VEGFR2, CD144, CD54, and CD105. Furthermore, blockade of miR-16 enhanced the secretion of the proangiogenic factor IL-8 by early EPCs, consistently with a stimulation of the paracrine activity of these cells. According to currently available

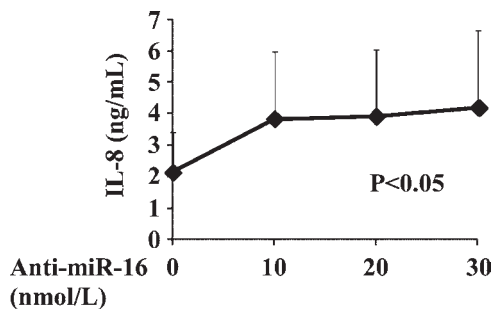


Figure 7. Anti-miR-16 increases the secretion of IL-8 by early EPCs. Early EPCs were transfected with 10–30 nmol/l anti-miR-16 during 24 h. IL-8 concentration in conditioned medium was assessed by ELISA. Results are mean \pm SD ($n=4$). P value is indicated (ANOVA).

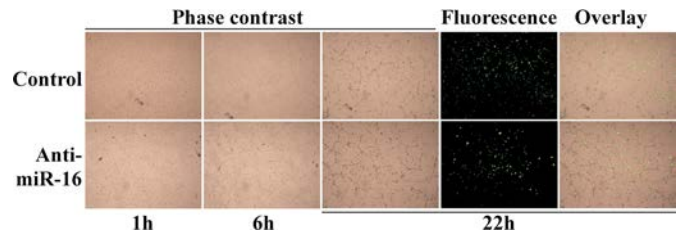


Figure 8. Anti-miR-16 promotes capillary-like structure formation. Early EPCs were transfected with 30 nmol/l anti-miR-16 during 24 h and then stained with a fluorescent probe. Cells were harvested, conditioned medium was collected, and 5000 EPCs were added on growth factor-reduced Matrigel, together with 30,000 HUVECs and 75% of conditioned medium from treated EPCs. Network formation was observed under light and fluorescence microscopy, 1, 6, and 22 h after seeding. Pictures from a representative experiment of three independent experiments are shown. Original magnification, $\times 25$.

prediction algorithms, IL-8 is not a direct target of miR-16. Thus, the increase of IL-8 upon miR-16 antagonism is most probably an indirect effect as a result of enhanced proliferation and differentiation of early EPCs. Finally, we validated that with the use of an in vitro angiogenesis assay involving the formation of a capillary-like structure by HUVECs, antagonism of miR-16 has the potential to stimulate the proangiogenic function of early EPCs. In conclusion, this study deepens our knowledge of the roles of miRNAs in EPCs. Our data suggest that manipulation of the proliferation, differentiation, and paracrine function of early EPCs by miRNAs, including miR-16, may emerge as a new opportunity to improve the regenerative capacity of these cells.

AUTHORSHIP

E.G., M.R.T., and F.L. carried out cell experiments. L.Z. analyzed microarray data and performed bioinformatic analyses. Y.D. conceived of and supervised the project. D.R.W. and Y.D. drafted the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the National Research Fund, the Society for Research on Cardiovascular Diseases, and the Ministry of Culture, Higher Education and Research of Luxembourg. E.G. and F.L. are recipients of fellowships from the National Research Fund of Luxembourg. We thank Christelle Nicolas, Céline Jeanty, and Bernadette Leners for expert technical assistance. The help of Nicolaas Brons and Wim Ammerlaan for flow cytometry analyses is acknowledged.

REFERENCES

- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., Isner, J. M. (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964–967.

2. Fadini, G. P., Losordo, D., Dimmeler, S. (2012) Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ. Res.* **110**, 624–637.
3. Hur, J., Yoon, C. H., Kim, H. S., Choi, J. H., Kang, H. J., Hwang, K. K., Oh, B. H., Lee, M. M., Park, Y. B. (2004) Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 288–293.
4. Rehman, J., Li, J., Orschell, C. M., March, K. L. (2003) Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* **107**, 1164–1169.
5. Ingram, D. A., Mead, L. E., Tanaka, H., Meade, V., Fenoglio, A., Mortell, K., Pollok, K., Ferkowicz, M. J., Gilley, D., Yoder, M. C. (2004) Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* **104**, 2752–2760.
6. Siddique, A., Shantsila, E., Lip, G. Y., Varma, C. (2010) Endothelial progenitor cells: what use for the cardiologist? *J. Angiogenesis Res.* **2**, 6.
7. Rafii, S., Lyden, D. (2003) Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat. Med.* **9**, 702–712.
8. Lipinski, M. J., Biondi-Zoccai, G. G., Abbate, A., Khianey, R., Sheiban, I., Bartunek, J., Vanderheyden, M., Kim, H. S., Kang, H. J., Strauer, B. E., Vetrovec, G. W. (2007) Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**, 1761–1767.
9. Losordo, D. W., Schatz, R. A., White, C. J., Udelson, J. E., Veereshwarayya, V., Durgin, M., Poh, K. K., Weinstein, R., Kearney, M., Chaudhry, M. (2007) Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation* **115**, 3165–3172.
10. Stamm, C., Westphal, B., Kleine, H. D., Petzsch, M., Kittner, C., Klinge, H., Schumichen, C., Nienaber, C. A., Freund, M., Steinhoff, G. (2003) Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* **361**, 45–46.
11. Zimmet, H., Porapakham, P., Porapakham, P., Sata, Y., Haas, S. J., Itescu, S., Forbes, A., Krum, H. (2012) Short- and long-term outcomes of intracoronary and endogenously mobilized bone marrow stem cells in the treatment of ST-segment elevation myocardial infarction: a meta-analysis of randomized control trials. *Eur. J. Heart Fail.* **14**, 91–105.
12. Huntzinger, E., Izaurralde, E. (2011) Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 99–110.
13. Suarez, Y., Sessa, W. C. (2009) microRNAs as novel regulators of angiogenesis. *Circ. Res.* **104**, 442–454.
14. Fleissner, F., Jazbutyte, V., Fiedler, J., Gupta, S. K., Yin, X., Xu, Q., Galuppo, P., Kneitz, S., Mayr, M., Ertl, G., Bauersachs, J., Thum, T. (2010) Asymmetric dimethylarginine impairs angiogenic progenitor cell function in patients with coronary artery disease through a microRNA-21-dependent mechanism. *Circ. Res.* **107**, 138–143.
15. Zhao, T., Li, J., Chen, A. F. (2010) microRNA-34a induces endothelial progenitor cell senescence and impedes its angiogenesis via suppressing silent information regulator 1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **299**, E110–E116.
16. Urbich, C., Heeschen, C., Aicher, A., Dernbach, E., Zeiher, A. M., Dimmeler, S. (2003) Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* **108**, 2511–2516.
17. De Hoon, M. J., Imoto, S., Nolan, J., Miyano, S. (2004) Open source clustering software. *Bioinformatics* **20**, 1453–1454.
18. Saldanha, A. J. (2004) Java Treeview—extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics* **20**, 3246–3248.
19. Tusher, V. G., Tibshirani, R., Chu, G. (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 5116–5121.
20. Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D. S., Sander, C. (2008) The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res.* **36**, D149–D153.
21. Lewis, B. P., Burge, C. B., Bartel, D. P. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**, 15–20.
22. Krek, A., Grun, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K. C., Stoffel, M., Rajewsky, N. (2005) Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* **37**, 495–500.
23. Devaux, Y., Azuaje, F., Vausort, M., Yvorra, C., Wagner, D. R. (2010) Integrated protein network and microarray analysis to identify potential biomarkers after myocardial infarction. *Funct. Integr. Genomics* **10**, 329–337.
24. Devaux, Y., Bousquenaud, M., RADIUS, S., Marie, P.-Y., Maskali, F., Zhang, L., Azuaje, F., Wagner, D. (2011) Transforming growth factor β receptor 1 is a new candidate prognostic biomarker after acute myocardial infarction. *BMC Med. Genomics* **4**, 83.
25. Dennis Jr., G., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C., Lempicki, R. A. (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* **4**, P3.
26. Calin, G. A., Cimmino, A., Fabbri, M., Ferracin, M., Wojcik, S. E., Shimizu, M., Taccioli, C., Zanesi, N., Garzon, R., Aqeilan, R. I., Alder, H., Volinia, S., Rassenti, L., Liu, X., Liu, C.-g., Kipps, T. J., Negrini, M., Croce, C. M. (2008) miR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 5166–5171.
27. Bonci, D., Coppola, V., Musumeci, M., Addario, A., Giuffrida, R., Memeo, L., D’Urso, L., Pagliuca, A., Biffoni, M., Labbaye, C., Bartucci, M., Muto, G., Peschle, C., De Maria, R. (2008) The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat. Med.* **14**, 1271–1277.
28. Linsley, P. S., Schelter, J., Burchard, J., Kibukawa, M., Martin, M. M., Bartz, S. R., Johnson, J. M., Cummins, J. M., Raymond, C. K., Dai, H., Chau, N., Cleary, M., Jackson, A. L., Carleton, M., Lim, L. (2007) Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 2240–2252.
29. Li, T., Morgan, M. J., Choksi, S., Zhang, Y., Kim, Y. S., Liu, Z. G. (2010) microRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF- κ B pathway by regulating expression of the kinase IKK α during macrophage differentiation. *Nat. Immunol.* **11**, 799–805.
30. Timmermans, F., Plum, J., Yoder, M. C., Ingram, D. A., Vandekerckhove, B., Case, J. (2009) Endothelial progenitor cells: identity defined? *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 87–102.
31. Eggermann, J., Kliche, S., Jarmy, G., Hoffmann, K., Mayr-Beyrle, U., Debatin, K. M., Waltenberger, J., Beltinger, C. (2003) Endothelial progenitor cell culture and differentiation in vitro: a methodological comparison using human umbilical cord blood. *Cardiovasc. Res.* **58**, 478–486.
32. Gulati, R., Jevremovic, D., Peterson, T. E., Chatterjee, S., Shah, V., Vile, R. G., Simari, R. D. (2003) Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ. Res.* **93**, 1023–1025.
33. Yoder, M. C., Mead, L. E., Prater, D., Krier, T. R., Mroueh, K. N., Li, F., Krasich, R., Temm, C. J., Prchal, J. T., Ingram, D. A. (2007) Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* **109**, 1801–1809.
34. Gnecci, M., Zhang, Z., Ni, A., Dzau, V. J. (2008) Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ. Res.* **103**, 1204–1219.
35. Medina, R. J., O’Neill, C. L., Sweeney, M., Guduric-Fuchs, J., Gardiner, T. A., Simpson, D. A., Stitt, A. W. (2010) Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities. *BMC Med. Genomics* **3**, 18.
36. Liu, Q., Fu, H., Sun, F., Zhang, H., Tie, Y., Zhu, J., Xing, R., Sun, Z., Zheng, X. (2008) miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes. *Nucleic Acids Res.* **36**, 5391–5404.

KEY WORDS:
transcriptomic · microarrays · cell cycle · cell differentiation

Etude n°2: Implication du miR-150 dans l'effet de l'adénosine sur la migration des EPC par le CXCR4

La thérapie cellulaire à partir d'EPC précoces semble être une idée très prometteuse pour réparer le cœur après IM. Cependant, cette idée est limitée par la faible capacité de recrutement et d'attachement des EPC au cœur. Augmenter leur recrutement au site ischémique permettrait d'augmenter la réparation cardiaque. La mobilisation de la moelle osseuse, la migration et l'adhésion des EPC au cœur après IM est principalement contrôlée par l'axe SDF-1 α et son récepteur, le CXCR4^{154, 155}. Il a été montré que diminuer l'expression du CXCR4 réduit la capacité de revascularisation des EPC chez des patients avec cardiopathie coronarienne¹⁵⁸.

En parallèle à ces données, après un stress ischémique, l'expression du miR-150 est diminuée dans des cellules mononucléaires isolées de la moelle osseuse²⁵⁶. Il a également été prouvé que le miR-150 cible le CXCR4. Nous nous sommes donc intéressés à ce miARN car il pourrait être impliqué dans la régulation du recrutement des EPC après IM.

L'adénosine est une molécule cardioprotectrice produite par déphosphorylation de l'ATP. Cette molécule est impliquée dans de nombreux processus liés à la réparation cardiaque tels que l'angiogénèse¹⁷⁸ ou l'inflammation¹⁷⁹. De plus, il a été prouvé que l'adénosine augmente l'adhésion des EPC aux cellules endothéliales microvasculaires cardiaques¹⁸⁰.

A partir de ces éléments, nous avons étudié l'effet de l'adénosine sur le recrutement des EPC au cœur après IM.

Pour cela, nous avons isolé des EPC précoces comme précédemment et nous avons également effectué des puces à ARNm, de la cytométrie de flux, mais aussi des tests de migration. Des ligatures permanentes de l'artère coronaire antérieure descendante ont permis d'induire des IM chez des rats et ainsi de pouvoir y étudier le recrutement des EPC vers la zone infarctée après IM.

Nous avons montré que:

- L'adénosine module l'expression de différentes chimiokines et leurs récepteurs dans les EPC, en particulier elle augmente la transcription de l'ARNm du CXCR4 (vu sur puces à ARNm et confirmé par PCR quantitative).

- L'expression du CXCR4 est également augmentée à la surface de la cellule par l'adénosine (cytométrie de flux).

- Le récepteur A3 à l'adénosine est le plus exprimé à la surface des EPC, suivi du récepteur A2A puis A2B. Le récepteur A1 n'est pas détectable. Une fois traitées à l'adénosine, les EPC augmentent l'expression des récepteurs A2A et A2B à leur surface (augmentation de plus de 2 fois), alors qu'elles diminuent l'expression du récepteur A3.

- L'inhibition des voies de signalisation provenant des protéines Gi couplées aux récepteurs A1 et A3 n'a pas empêché l'augmentation du CXCR4 par l'adénosine, ce qui permet d'exclure ces récepteurs de l'effet de l'adénosine sur le CXCR4. Par contre, l'inhibition des voies PKC, appartenant à la voie de signalisation du récepteur A2B, a très fortement diminué cet effet (l'inhibition de ERK appartenant à la voie de signalisation du récepteur A2A, a très légèrement diminué). Ces données suggèrent que l'augmentation du CXCR4 par l'adénosine implique majoritairement le récepteur A2B à l'adénosine, ce qui est confirmé par l'utilisation d'un antagoniste de ce récepteur.

- Un prétraitement des EPC avec de l'adénosine stimule leur migration vers un gradient de SDF-1 α , le ligand du CXCR4, ou vers un milieu conditionné de fibroblastes. Ces effets sont bloqués par l'ajout d'un anticorps bloquant anti-CXCR4.

- En condition hypoxique, l'adénosine augmente le CXCR4 et en parallèle diminue le miR-150 ce qui suggère que le miR-150 a pour cible le CXCR4. Ceci a été démontré par un test luciférase.

- L'addition d'anti-miR-150 à l'adénosine augmente très fortement l'expression du CXCR4. L'addition de pré-miR-150 abolie les effets de l'adénosine sur l'expression du CXCR4. Cependant, aucun effet n'a été visible sur la migration des EPC. Chez des EPC soumises à des conditions hypoxiques, l'effet de l'adénosine sur le CXCR4 est donc contrôlé au moins en partie par le miR-150.

- Nous avons induit des IM à des rats par ligature coronaire. Traiter ces rats avec un analogue stable de l'adénosine, le CADO (2-chloroadénosine), a permis une augmentation du recrutement des EPC dans le cœur au niveau de la zone bordante de l'IM (vu par marquage CD31, CXCR4 et ALDH2 sur des sections cardiaques). Ce traitement a également permis de stimuler l'angiogenèse car nous avons observé un plus grand nombre de vaisseaux sanguins dans la zone bordante (+65% par rapport aux contrôles).

Nous avons pu démontrer que l'adénosine stimule la migration des EPC, en passant par son récepteur A2B, par une diminution du miR-150 et une augmentation du CXCR4. Nous avons

également prouvé que l'adénosine stimule le recrutement des EPC au cœur après IM et que cela s'accompagne d'une augmentation de la vascularisation. Ces résultats suggèrent que l'adénosine ainsi qu'une inhibition du miR-150 dans les EPC pourraient permettre d'augmenter leur recrutement et leur migration jusqu'au site ischémique, et ainsi stimuler les capacités régénératrices des EPC.

Adenosine Stimulates the Migration of Human Endothelial Progenitor Cells. Role of CXCR4 and MicroRNA-150

Magali Rolland-Turner¹, Emeline Goretti¹, Mélanie Bousquenaud¹, Frédérique Léonard¹, Christelle Nicolas¹, Lu Zhang¹, Fatiha Maskali², Pierre-Yves Marie², Yvan Devaux^{1*}, Daniel Wagner^{1,3}

1 Laboratory of Cardiovascular Research, Public Research Centre – Health (CRP – Santé), Luxembourg, Luxembourg, **2** Nancyclotep Experimental Imaging Platform, Vandoeuvre-les-Nancy, France, **3** Division of Cardiology, Centre Hospitalier, Luxembourg, Luxembourg

Abstract

Background: Administration of endothelial progenitor cells (EPC) represents a promising option to regenerate the heart after myocardial infarction, but is limited because of low recruitment and engraftment in the myocardium. Mobilization and migration of EPC are mainly controlled by stromal cell-derived factor 1 α (SDF-1 α) and its receptor CXCR4. We hypothesized that adenosine, a cardioprotective molecule, may improve the recruitment of EPC to the heart.

Methods: EPC were obtained from peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers. Expression of chemokines and their receptors was evaluated using microarrays, quantitative PCR, and flow cytometry. A Boyden chamber assay was used to assess chemotaxis. Recruitment of EPC to the infarcted heart was evaluated in rats after permanent occlusion of the left anterior descending coronary artery.

Results: Microarray analysis revealed that adenosine modulates the expression of several members of the chemokine family in EPC. Among these, CXCR4 was up-regulated by adenosine, and this result was confirmed by quantitative PCR (3-fold increase, $P < 0.001$). CXCR4 expression at the cell surface was also increased. This effect involved the A_{2B} receptor. Pretreatment of EPC with adenosine amplified their migration towards recombinant SDF-1 α or conditioned medium from cardiac fibroblasts. Both effects were abolished by CXCR4 blocking antibodies. Adenosine also increased CXCR4 under ischemic conditions, and decreased miR-150 expression. Binding of miR-150 to the 3' untranslated region of CXCR4 was verified by luciferase assay. Addition of pre-miR-150 blunted the effect of adenosine on CXCR4. Administration of adenosine to rats after induction of myocardial infarction stimulated EPC recruitment to the heart and enhanced angiogenesis.

Conclusion: Adenosine increases the migration of EPC. The mechanism involves A_{2B} receptor activation, decreased expression of miR-150 and increased expression of CXCR4. These results suggest that adenosine may be used to enhance the capacity of EPC to revascularize the ischemic heart.

Citation: Rolland-Turner M, Goretti E, Bousquenaud M, Léonard F, Nicolas C, et al. (2013) Adenosine Stimulates the Migration of Human Endothelial Progenitor Cells. Role of CXCR4 and MicroRNA-150. PLoS ONE 8(1): e54135. doi:10.1371/journal.pone.0054135

Editor: Maurizio Pesce, Centro Cardiologico Monzino, Italy

Received: May 16, 2012; **Accepted:** December 10, 2012; **Published:** January 9, 2013

Copyright: © 2013 Rolland-Turner et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by the Society for Research on Cardiovascular Diseases and the Ministry of Culture, Higher Education and Research of Luxembourg. FL is the recipient of a fellowship from the National Fund for Research of Luxembourg (grant # TR-PHF BFR07-132). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: yvan.devaux@crp-sante.lu

Introduction

Cardiovascular diseases are a major cause of mortality and their prevalence is expected to increase substantially [1]. Cell therapy with endothelial progenitor cells (EPC) has emerged as a promising strategy to revascularize the heart after acute myocardial infarction (MI) and thereby limit left ventricular remodeling and the incidence of heart failure (HF).

Some clinical studies [2–4] using EPC showed promising results, but the benefit was limited, in part, by a low retention of the injected cells in the myocardium. Improving EPC recruitment to the site of injury by increasing the expression of certain cell surface receptor has the potential to improve cardiac repair. The stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α)/CXCR4 axis is highly implicated

in EPC mobilization from the bone marrow and homing to vascular lesions [5–8]. Impaired CXCR4 signaling reduces the revascularization capacity of EPC in patients with coronary artery disease [9]. Moreover, the administration of endothelial colony forming cells that overexpress CXCR4 resulted in a significant increase in tissue healing and capillary density in the hindlimb ischemia model [10].

MicroRNAs (miRNAs) are short oligonucleotides able to regulate gene expression. Following ischemic stress, the expression of miR-150 in bone marrow derived mononuclear cells is inhibited [11]. Knowing that CXCR4 is a target of miR-150 [11], this raises the possibility that miR-150 may be involved in the regulation of EPC recruitment to the ischemic heart. In the infarcted heart, Adenosine (Ado) is produced by dephosphorylation of adenosine

Table 1. Quantitative PCR primers.

Gene	Accession number	Forward primer	Reverse primer	T°C
β -actin	NM_0011101	AGAAAATCTGGCACCACACC	GGGGTGTGAAGGTCTCAA	60
CXCR4	NM_001008540	TATCCTGCCTGGTATTGTC	GGAAATCATCAAGCAAGGG	50
A ₁	NM_000674	GACCTACTCCACACCTG	TCACCACCATCTTGATCC	58
A _{2A}	NM_000675	TCTTCAGTCTCTGGCCATC	GGGACCACATCTCAAAGAG	64
A _{2B}	NM_000676	TCCATCTTCAGCCTTCTG	GCACTGTCTTACTGTCC	55
A ₃	NM_000677	TCATCTGCGTGGTCAAGC	CTGTAGAAGTGGATTGTGATGC	62

Annealing temperatures are indicated.
doi:10.1371/journal.pone.0054135.t001

tri-phosphate (ATP) in a large amount. Ado exerts its effects through interaction with cell surface G protein-coupled receptors subdivided into four subtypes: A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃ receptors [12]. Cardioprotective properties of Ado have been described in the setting of reperfusion but the effect of Ado on cardiac repair has not been studied in detail. Recent studies have shown that Ado increases the adhesion of human EPC to cardiac microvascular endothelial cells [13]. We have previously reported that Ado affects several processes involved in cardiac repair, such as extracellular matrix turnover [14,15], angiogenesis [16–18] and inflammation [19–21]. Moreover, we recently characterized the EPC response to Ado using systems-based approaches [22].

In the present study, we determined whether Ado affects the migration of EPC.

Materials and Methods

Materials

All materials and reagents were from Sigma (Bornem, Belgium) unless specified. Ficoll was from ICN Flow (Asse-Relegem, Belgium). The A_{2B} Ado receptor antagonist was MRS 1754 (8-[4-[(4-Cyanophenyl)carbamoylmethyl]oxy]phenyl]-1,3-di(n-propyl)xanthine). EHNA (erythro-9-(2-Hydroxy-3-nonyl) adenosine hydrochloride) was used as Ado deaminase inhibitor and dipyrindamole (DIP) was used as inhibitor of Ado intracellular uptake. CADO (2-Chloroadenosine) and 8-SPT (8-(p-Sulfophenyl)theophylline hydrate) were used as non-specific agonist and antagonist of Ado receptors, respectively. The E-Toxate[®] reagent from *Limulus polyphemus* (LAL assay having a detection sensitivity of 0.05 EU/mL) was used to ensure the absence of endotoxin contamination in Ado and other drugs used in the study. SDF-1 α was purchased from Peprotech (London, UK). Anti CXCR4 neutralizing antibodies and SDF-1 α ELISA detection kit were from R&D System (Oxon, UK).

Cell culture

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll gradient using Leucosep tubes (Greiner Bio-One, Wemmel, Belgium). Early EPC were obtained as previously described by others [23]. Shortly, 8.10⁶ PBMCs were seeded onto human fibronectin (2.5 μ g/cm²) pre-coated 6-well plates and cultured in EBM medium supplemented with bovin brain extract, human recombinant endothelial growth factor, hydrocortisone, gentamicin, amphotericin B and 20% fetal calf serum (FCS) (Laboratoires Eurobio, Les Ulis, France). After 3 days of culture, non-adherent cells were discarded and adherent cells were cultured for another 24 hours prior to treatment. EPC were characterized by dual positive staining for 1,1_-dioctadecyl-3,3_,3_-tetramethylindocarbocyanine-labeled acetyl-low-density lipoprotein (DiIAcLDL)

(Invitrogen, Merelbeke, Belgium) and lectin from *Ulex europaeus*. By flow cytometry, early EPC were CD133+/CD34+/CD45+/CD14+/CD31+/vWF+/VEGFR2+/CD144-/CD105+. The cell population typically contained over 95% of CD14+/CD45+/CXCR4+ cells. Ischemic culture conditions were achieved by incubation of EPC with 0.1% BSA under 1% O₂ and 5% CO₂. Human primary cardiac fibroblasts purchased from TCS CellWorks Ltd were cultured in fibroblast medium supplemented with fibroblast growth supplement and 2% FCS (TCS CellWorks Ltd, Buckingham, UK). Prior to the experiments, fibroblasts were rendered quiescent in fibroblast medium supplemented with insulin (10 μ g/mL), transferrin (5.5 μ g/mL), sodium selenite (5 pg/mL), BSA (0.5 mg/mL) and linoleic acid (4.7 μ g/mL) for 5 hours. Cells were incubated with Ado and EHNA (10 μ mol/L). A_{2B} receptor antagonist was added 15 min prior to Ado treatment. Primary human monocytes were isolated from healthy volunteers, as described [14,15].

Flow cytometry

Cells were harvested using cell dissociation solution and washed twice in phosphate-buffered saline (PBS, Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 1% BSA. 200,000 cells were treated with the appropriate amount of Fc blocking reagent (Miltenyi, Utrecht, The Netherlands) and were then stained with specific antibodies or the corresponding isotype control in 50 μ L PBS-1% BSA for 30 min at 4°C. After washing, cells were fixed using the commercial BD FACS lysis solution according to manufacturer's instructions. All antibodies were purchased from Immunotools, except CD184-APC (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium). To eliminate dead cells from analysis, LIVE/DEAD[®] Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit was used according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). 20,000 to 40,000 events were acquired on a BD FACSCanto[™] flow cytometer and analysis was performed with the FACSDiva[™] software (BD Biosciences). Overlays were obtained using FlowJo 7.2.4 software.

RNA interference assay

Cells were transfected using INTERFERin[™] siRNA transfection reagent according to the manufacturer's instructions (Polyplus-transfection, Illkirch, France). Cells were transfected with 20 nM HS_ADORA2B_6_HP (Qjagen, Venlo, The Netherlands), pre-miR[™] miRNA precursor hsa-miR-150, anti-miR[™] miRNA inhibitor hsa-miR-150 or their respective negative controls (Applied Biosystems, Lennik, Belgium). INTERFERin-RNA complexes were allowed to form for 10 min at room temperature in a final volume of 100 μ L of serum free medium before addition to the cells. After 24 or 48 hours, cells were treated with 10 μ mol/L Ado for 4 or 6 hours prior harvesting.

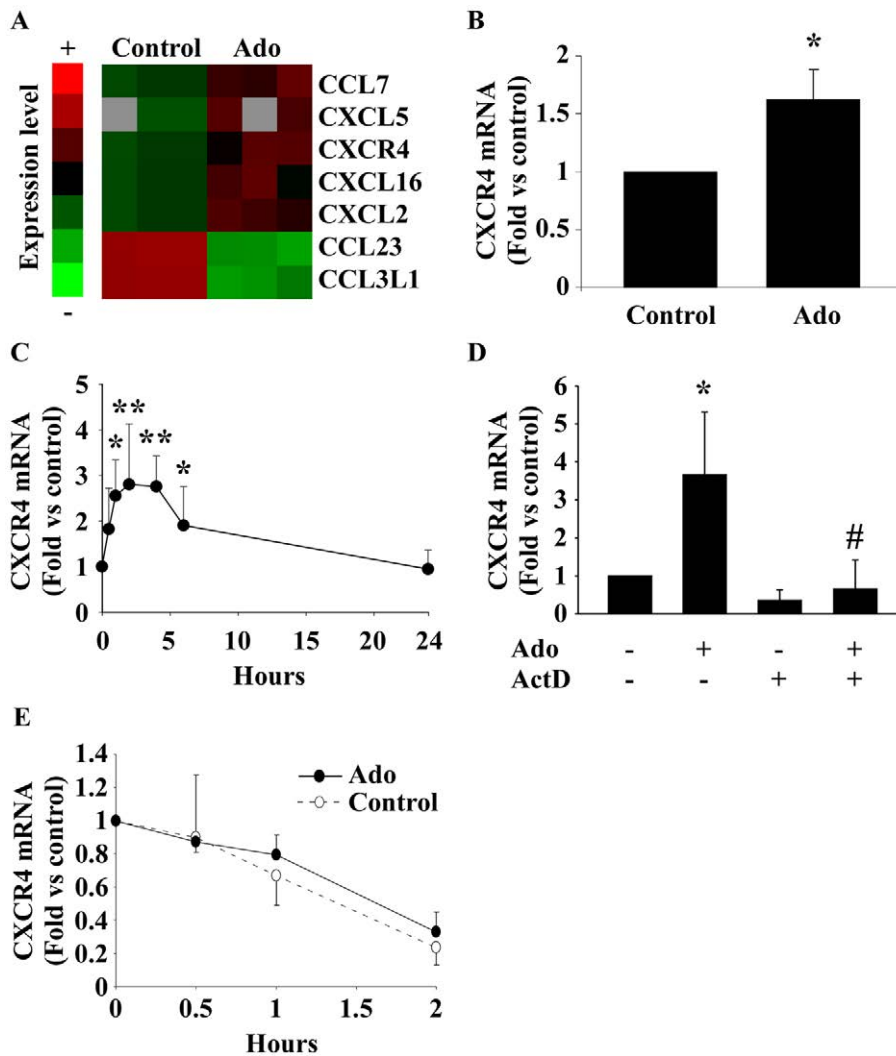


Figure 1. Adenosine increases CXCR4 mRNA expression. A. Transcriptomic analysis of EPC treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ Ado for 6 hours using microarrays. The heat map indicates chemokines and chemokine receptors differentially expressed following Ado treatment (all with q values ≤ 0.001). B. Confirmation of CXCR4 over-expression in EPC treated by 10 $\mu\text{mol/L}$ Ado for 6 hours using quantitative PCR. Expression values were normalized to β -actin and to untreated cells. * $P < 0.05$ vs control ($n = 3$). C. Kinetic of the effect of Ado on CXCR4 mRNA expression. * $P < 0.05$ vs control. ** $P < 0.001$ vs control. $P < 0.001$ using ANOVA ($n = 5$). D. Effect of actinomycin D (ActD). EPC were pre-treated by 5 $\mu\text{g/mL}$ ActD for 30 min before treatment with 10 $\mu\text{mol/L}$ Ado. CXCR4 mRNA expression was assessed after 2 hours. * $P < 0.01$ vs control. # $P < 0.01$ vs Ado ($n = 3$). E. EPC were pre-treated with ActD (5 $\mu\text{g/mL}$) for 30 min and were incubated with Ado for different time periods (30 min, 1 h and 2 h) before assessment of CXCR4 mRNA by PCR ($n = 4$). doi:10.1371/journal.pone.0054135.g001

Real-time quantitative PCR

For assessment of messenger RNA expression, total RNA was isolated using TriReagent[®] and the RNeasy[®] mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Potential contaminating genomic DNA was digested by DNase I treatment (Qiagen). One μg of total RNA was reverse-transcribed using the Superscript[®] II Reverse Transcriptase (Invitrogen). PCR primers were designed using the Beacon Designer software (Premier Biosoft, Palo Alto, USA) and were chosen to encompass an intron. Primer details are shown in Table 1. PCR was performed using the iCycler[®] and the IQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad, Nazareth Eke, Belgium). 1/10 dilution of cDNA was used. PCR conditions were as follows: 3 min at 95°C, 30 sec at 95°C and 1 min annealing (40-fold). Optimal annealing temperature was determined for each primer pair. Melting point analysis was obtained after 80 cycles for 10 sec from 55°C up to

95°C. Each run included negative reaction controls. β -actin was chosen as housekeeping gene for normalization. Expression levels were calculated by the relative quantification method ($\Delta\Delta\text{Ct}$) using the Genex software (Bio-Rad) which takes into account primer pair efficiency.

For assessment of miRNA expression, total RNA was extracted using the miRVana isolation kit (Applied Biosystems). Five hundred ng of total RNA were used for reverse transcription using miScript reverse transcription kit (Qiagen). PCR was performed using the miScript SYBR-green PCR kit and the Homo sapiens_miR-150miScript Primer Assay (MS00003577) according to manufacturer's instructions (Qiagen). U6 (Homo sapiens_RNU6-2_1 miScript Primer Assay, MS00033740, Qiagen) was used for normalisation. Expression levels were calculated by the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method.

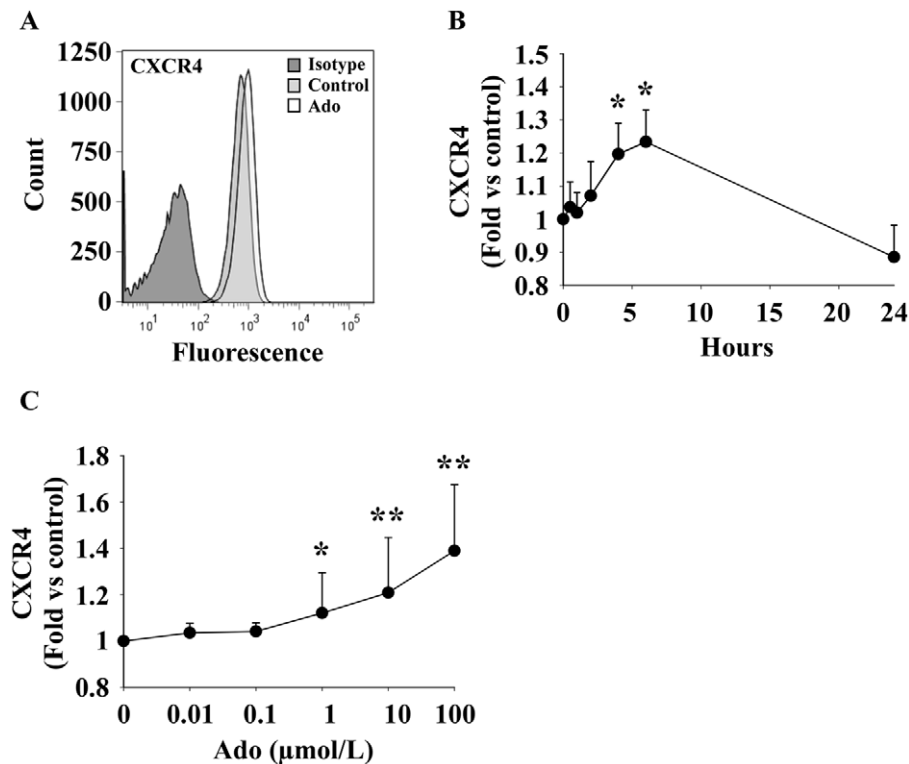


Figure 2. Adenosine enhances cell surface expression of CXCR4. EPC were treated with Ado and CXCR4 expression was assessed by flow cytometry. A. Representative histogram of EPC treated by 10 $\mu\text{mol/L}$ Ado for 6 hours. Dark grey: isotype control. Light grey: CXCR4 staining of control cells. White: CXCR4 staining of Ado-treated cells. B. Kinetic of CXCR4 expression on EPC treated by 10 $\mu\text{mol/L}$ Ado. * $P < 0.001$ vs control ($n = 10$). C. Dose-dependent effect of Ado on CXCR4 expression on EPC harvested 6 hours after treatment. * $P < 0.05$ vs control. ** $P < 0.01$ vs control ($n = 3$). doi:10.1371/journal.pone.0054135.g002

Microarray

Cellular mRNA was analyzed by microarray as described previously [24]. Briefly, total RNA was analyzed for quantity (Nanodrop, Nanodrop products, Wilmington, USA) and purity (Bio Analyser, Agilent Technologies, Santa-Clara, USA) before amplification using the Amino Allyl Message Amp[®] kit (Ambion, Austin, USA). cDNA obtained after retrotranscription was labelled with Cy3 or Cy5, and hybridized onto human microarrays covering 25,000 genes [25]. Microarrays were scanned using an Axon 3000 B scanner (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) and raw data were acquired with Genepix software (Molecular Devices). Data are available at the Gene Expression Omnibus database, accession number GSE26744. Expression levels were compared using Significance Analysis of Microarrays software and heat maps were drawn using TreeView software.

ELISA

Concentration of SDF-1 α in conditioned medium was measured using the Quantikine DSA00 ELISA kit (R&D Systems). Detection limit of the assay was 18 pg/mL.

In vitro migration assay

Chemotaxis experiments were performed using Costar[®] Transwell[™] Permeable Supports (Corning, Amsterdam, The Netherlands) with 5 μm pore size membrane. During the whole experiment, EPC medium containing no antibiotics and 5% FCS was used. Early EPC were treated for 6 hours with 10 μM Ado/EHNA or corresponding control treatment prior harvesting using cell dissociation solution. Cells were then incubated for

1 hour at 37°C with 10 $\mu\text{g/mL}$ of anti-CXCR4 neutralizing antibody or isotype control, and 175,000 cells were seeded in the upper chamber of the Transwell[™]. Transwells[™] were then placed into 24-wells plate containing SDF-1 α (0 to 100 ng/mL) or conditioned medium from fibroblasts. Cell migration was measured by DNA staining using CyQUANT[®] Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA). Fluorescence was measured at 492/520 nm using a POLARstar OPTIMA (BMG Labtech, Paris, France).

Luciferase reporter assay

Human embryonic kidney (HEK) 293T cells were used for luciferase assay and maintained in DMEM supplemented with 10%FBS, 1% L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin. HEK-293T cells were plated into 96-well plates and co-transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with 10 ng of a reporter plasmid containing the 3' untranslated region (UTR) of CXCR4 inserted downstream of the Gaussian luciferase secreted reporter gene and the secreted alkaline phosphatase tracking gene (pEZX-MT05, GeneCopoeia, Labomics, Nivells, Belgium) and 30 nmol/L of premiR[™] miRNA precursor hsa-miR-150 (Applied Biosystems) or negative control. Gaussian luciferase and alkaline phosphatase activities were measured by luminescence in conditioned medium 48 hours after transfection using the secreted-pair dual luminescence kit (GeneCopoeia). Gaussian luciferase activity was normalized to alkaline phosphatase activity.

In vivo experiments

This study was conducted in accordance with the regulations of the Animal Welfare Act of the National Institutes of Health Guide

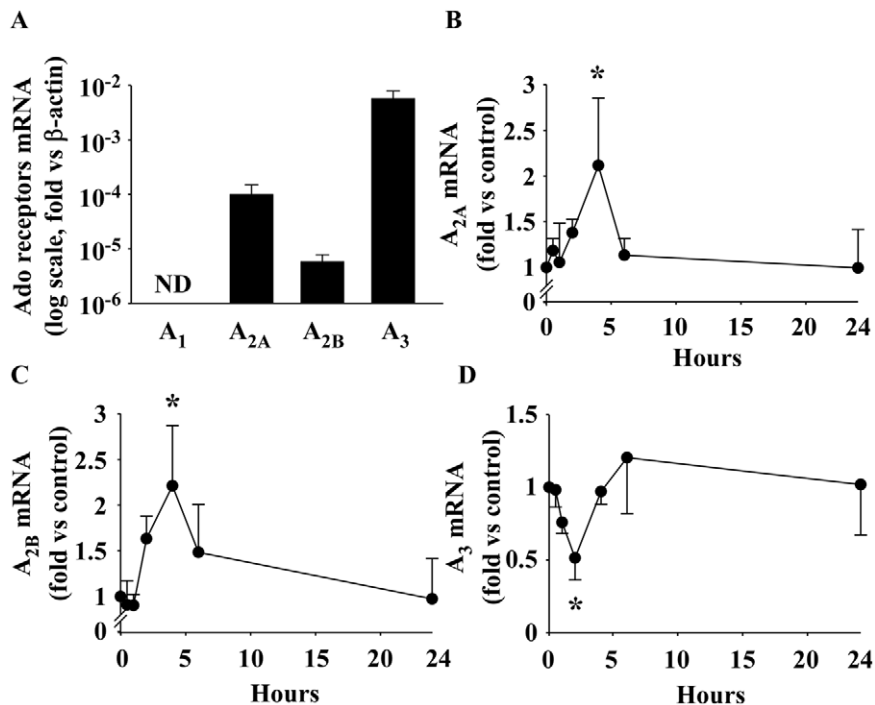


Figure 3. Expression of Ado receptors in EPC. A. mRNA expression profiles of the 4 Ado receptors in EPC were obtained by quantitative PCR. Significant differences were observed ($n=3$, $P=0.004$), the A₃ subtype being predominant and the A₁ subtype not detected (ND). Expression values were normalized to β -actin. B–D. Ado regulates the expression of its own receptors in EPC. mRNA expression was assessed by quantitative PCR at different times after treatment with 10 μ mol/L Ado ($n=3$). Ado transiently increased A_{2A} and A_{2B} expression ($P=0.003$ and $P=0.002$, respectively) and decreased A₃ expression ($P=0.01$). * $P\leq 0.01$ vs control. doi:10.1371/journal.pone.0054135.g003

for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85–23, revised 1996). Protocols were approved by local Ethics Committee and by the Regional Veterinary Department. 23 Wistar rats underwent permanent occlusion of the left anterior descending coronary artery (LAD) to induce MI [26–27]. 48 hours post surgery, 18F-Fluorodeoxyglucose (FDG) Positron Emission Tomography (PET) was performed to measure infarct size and myocardial damage as defined by cardiac segments showing 18F-FDG uptake $<50\%$. LAD-occluded animals were randomized according to infarct size into 3 groups: vehicle (NaCl, $n=7$), CADO (2 mg.kg⁻¹.d⁻¹, $n=8$) and CADO (2 mg.kg⁻¹.d⁻¹) with 8-SPT (10 mg.kg⁻¹.d⁻¹, $n=8$). These treatments were given intraperitoneally twice daily for 2 months, starting 7 days after LAD occlusion. After 2 months, rats were sacrificed and hearts were harvested to perform contiguous frozen sections (8 μ m), oriented along the vertical or horizontal long axis of the left ventricle depending on infarct location. Sections were fixed and permeabilized with methanol for 10 minutes, and blocked with BSA and serum for 1 hour. Polyclonal goat anti aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE), mouse monoclonal anti CD31 (clone P2B1, Abcam, Cambridge, UK) and polyclonal rabbit anti CXCR4 (Abcam) were used as primary antibodies. Alexa Fluor[®]488-coupled donkey anti-mouse antibody, Alexa Fluor[®]568-coupled donkey anti-goat antibody and Alexa Fluor[®]688-coupled donkey anti-rabbit antibody (Invitrogen) were used as secondary antibodies. Staining specificity was ensured by omission of primary antibodies. DAPI (blue) was used to stain nuclei. Hematoxylin and eosin staining was performed to assess vascularization in heart sections. The number of vessels was counted in the whole section of each animal. Images

were recorded with a confocal microscope (Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 510) and the LSM 510 META software.

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm SD. Comparisons between two groups of continuous data were performed with two-tailed t-test for data with a normal distribution and Mann-Whitney test for non-normally distributed data. Normality was determined using the Shapiro-Wilk test. Comparisons between multiple groups were performed with one-way ANOVA for normal data and Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks for non-normally distributed data. In case of significance, post-hoc tests (Dunn's or Holm-Sidak method) were run to isolate groups that differ from the others. Comparisons between multiple groups with two parameters were performed with two-way ANOVA. Statistical tests were performed with the SigmaPlot v11.0 software. A P value <0.05 was considered significant.

Results

Adenosine increases CXCR4 mRNA expression in EPC

Microarray experiments were performed to investigate whether Ado modulates the expression of members of the chemokine/receptor family. These experiments showed that a 6-hour treatment of EPC with 10 μ mol/L Ado modulates the expression of various chemokines and chemokine receptors. In particular, the chemokine receptor CXCR4 was up-regulated (Fig. 1A). Increased expression of CXCR4 by Ado was confirmed by PCR (Fig. 1B). Treating EPC with 10 μ mol/L Ado induced a transient increase of CXCR4 mRNA expression, reaching its maximum after 2 hours (3-fold, $P<0.001$) and declining after 4 hours

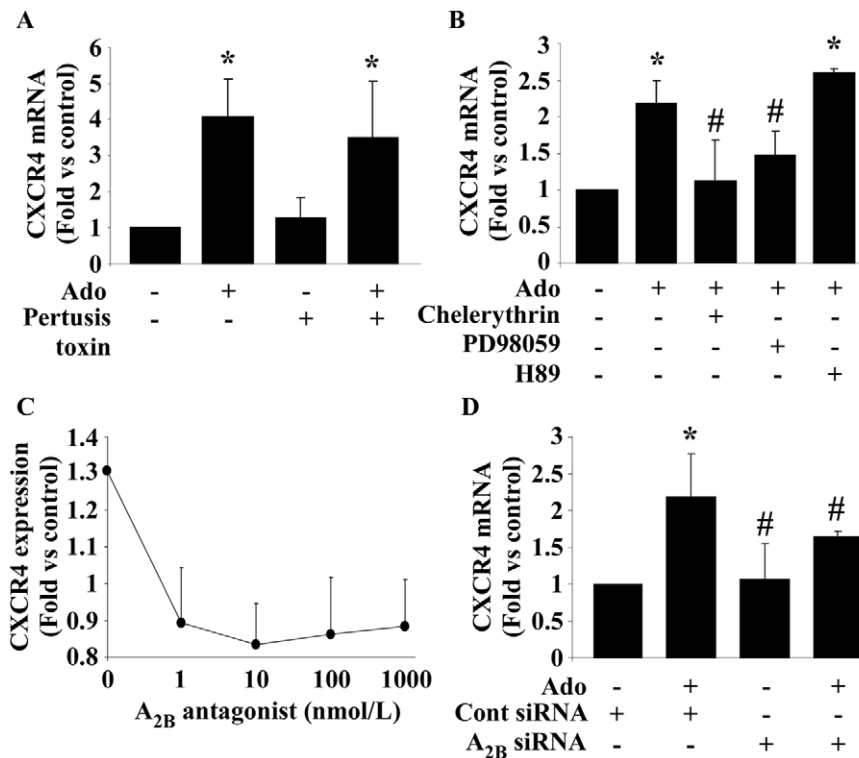


Figure 4. Identification of Ado receptors implicated in the effect of Ado on CXCR4. A. Pertussis toxin did not affect CXCR4 expression. Pertussis toxin (100 ng/mL) was added to the cells 30 min before Ado and CXCR4 expression was measured by PCR after 2 hours. * $P < 0.01$ vs control ($n = 5$). B. Chelerythrin blocked the increase of CXCR4 expression induced by Ado. EPC were pre-treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ H89, PD98059 or chelerythrin for 15 min before 10 $\mu\text{mol/L}$ Ado treatment for 4 hours. CXCR4 expression was measured by PCR. * $P < 0.001$ vs control. # $P < 0.01$ vs Ado ($n = 3$). C. A_{2B} antagonist inhibited CXCR4 over expression induced by Ado. EPC were pre-incubated for 15 min with increasing concentrations of the A_{2B} antagonist (MRS1754) or vehicle before incubation with 10 $\mu\text{mol/L}$ Ado for 6 hours. CXCR4 expression was measured by flow cytometry. $P = 0.02$ ($n = 3$). D. A_{2B} gene silencing inhibited CXCR4 expression. CXCR4 mRNA expression was measured in EPC transfected with A_{2B} siRNA or control siRNA for 24 to 48 hours and treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ Ado for 4 hours. A_{2B} siRNA inhibited the increase of CXCR4 expression induced by Ado. * $P < 0.01$ vs control. # $P < 0.05$ vs Ado + control siRNA ($n = 3$). doi:10.1371/journal.pone.0054135.g004

(Fig. 1C). Inhibition of de novo mRNA transcription with actinomycin D abolished this increase (Fig. 1D). Degradation over time of CXCR4 mRNA in actinomycin D pre-treated EPC was not modified by Ado treatment ($P = 0.44$, two-way ANOVA) suggesting that Ado does not affect CXCR4 mRNA stability (Fig. 1E). Together, these data show that Ado enhances CXCR4 mRNA expression in EPC through up-regulation of CXCR4 transcription.

Since EPC are derived from PBMCs and monocytes, we tested whether adenosine modified CXCR4 expression in primary human monocytes. No significant effect was found (data not show).

Adenosine increases CXCR4 expression at the cell surface

Cell surface expression of CXCR4 was assessed by flow cytometry. As shown in Figure 2A, we observed a clear shift between the isotype control and the specific anti-CXCR4 antibody, indicating that EPC express CXCR4. A moderate increase of staining was noticed after Ado treatment (Fig. 2A). Time-course experiments revealed a maximal effect of Ado after 6 hours (23% increase, $P < 0.001$) (Fig. 2B). This effect was dose-dependent and reached statistical significance at 1 $\mu\text{mol/L}$ (Fig. 2C). These results show that physiological concentrations of Ado induce a moderate increase of CXCR4 expression at the surface of EPC.

Characterization of Ado receptor expression in EPC

Expression of the 4 Ado receptors in EPC was as follows: $A_3 > A_{2A} > A_{2B}$. The A₁ receptor was not detected (Fig. 3A). Interestingly, expression of Ado receptors was regulated by Ado itself. A_{2A} and A_{2B} receptors were more than two-fold up-regulated by Ado whereas A₃ receptor was down-regulated. Maximal effects were observed 2–4 hours after administration of Ado (Fig. 3B–D).

The A_{2B} receptor mediates the effect of Ado on CXCR4

Several approaches were used to identify the subtype of Ado receptor(s) involved in the increase of CXCR4 expression. First, inhibition of G_i protein signaling was induced using pertussis toxin (Fig. 4A). This inhibition did not affect the increase of CXCR4 mRNA by Ado. Since A₁ and A₃ receptors are coupled to G_i proteins, this observation excludes the implication of these 2 receptors in the effect of Ado on CXCR4. Secondly, we used pharmaceutical inhibitors of downstream signaling pathways of the A_{2A} and A_{2B} receptors, ERK and PKC, respectively (Fig. 4B). The PKC inhibitor chelerythrin prevented the increase of CXCR4 induced by Ado, suggesting the involvement of the A_{2B} receptors. The partial effect of the MEK inhibitor PD98059 suggested some contribution of the A_{2A} receptor. This contribution might involve the ERK pathway and not the PKA pathway downstream the A_{2A}

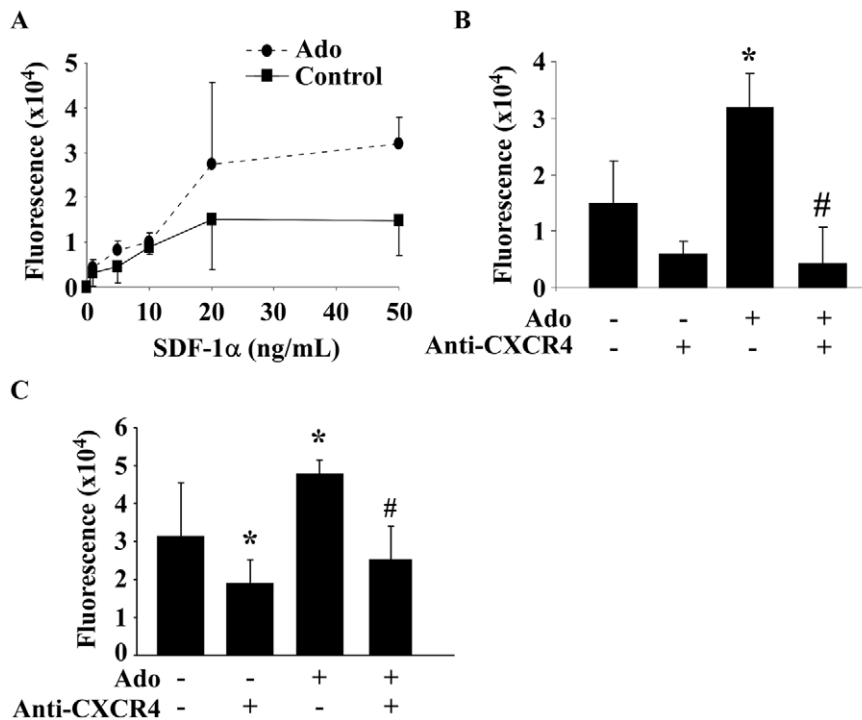


Figure 5. Adenosine enhances the migration of EPC. EPC were treated by 10 $\mu\text{mol/L}$ Ado for 6 hours before transfer to the top of a Boyden chamber. The bottom of the chamber was filled with culture medium containing either recombinant SDF-1 α (A and B) or conditioned medium from cardiac fibroblasts (C). The amount of cells that migrated through the membrane was assessed by fluorescence after 16 hours. A. SDF-1 α induced EPC migration and Ado enhanced this effect ($P=0.02$, two-way ANOVA, $n=3$). B. Blocking CXCR4 with a neutralizing antibody (10 $\mu\text{g/mL}$) for one hour before exposure to 50 ng/mL SDF-1 α for 16 hours in a Boyden chamber inhibited the migration in both untreated and Ado-treated cells. * $P<0.05$ vs control. # $P<0.01$ vs Ado ($n=3$). C. Ado enhances the migration of EPC induced by conditioned medium from cardiac fibroblasts. EPC were treated by 10 $\mu\text{mol/L}$ Ado or vehicle for 6 hours before transfer to the top of a Boyden chamber. The bottom of the chamber was filled with cell-free conditioned medium from fibroblasts. In some samples, EPC were pre-incubated for 1 hour with anti-CXCR4 blocking antibodies before transfer to the chambers. The amount of EPC that migrated through the membrane was assessed by fluorescence after 16 hours. * $P<0.01$ vs control. # $P<0.001$ vs Ado ($n=7$).

doi:10.1371/journal.pone.0054135.g005

receptor, since blockade of the latter pathway by H89 did not affect CXCR4 expression. Of note, none of the inhibitors used alone affected CXCR4 expression (not shown). To confirm these results, we blocked the A_{2B} receptor using the specific antagonist MRS1754 (Fig. 4C). A robust decrease of CXCR4 expression was observed. Finally, down-regulation of A_{2B} receptor using siRNA inhibited the effect of Ado on CXCR4 (Fig. 4D). A potential toxic effect of A_{2B} siRNA, which could be responsible for the lack of response of the cells to Ado, was ruled out using flow cytometry experiments (data not shown). Taken together, these results show that activation of the A_{2B} receptor up-regulates CXCR4 expression.

Adenosine stimulates EPC chemotaxis

To evaluate the effect of Ado on EPC migration, EPC were treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ Ado for 6 hours and exposed to recombinant SDF-1 α (0 to 100 ng/mL) in a Boyden chamber. SDF-1 α dose-dependently enhanced EPC migration and pre-treatment with Ado amplified this effect ($P=0.02$; Fig. 5A). The migration was inhibited by CXCR4 blocking antibodies in both untreated and Ado-treated cells (Fig. 5B).

Cardiac fibroblasts represent a major source of SDF1 α in the myocardium. We observed that treatment of EPC with 10 $\mu\text{mol/L}$ Ado enhanced their migration towards a conditioned medium from fibroblasts. This increase was abolished when cells were pre-incubated with anti-CXCR4 antibodies (Fig. 5C). These data

show that Ado improves the migration of EPC, at least through up-regulation of CXCR4 expression.

Role of miR-150 in the effect of adenosine on CXCR4

Following experiments were performed under serum starvation (0.1% BSA) and oxygen deprivation (1% O_2). As observed in normal conditions, Ado up-regulated CXCR4 mRNA expression (Fig. 6A). This was paralleled by decreased miR-150 (Fig. 6B). A luciferase assay was used to verify the ability of miR-150 to bind CXCR4. In HEK293T cells transfected with a reported plasmid containing the 3' UTR of the CXCR4 gene, we observed an inhibition of luciferase activity upon administration of pre-miR-150 (Fig. 6C).

Transfection of cells with anti-miR-150 to inhibit miR-150 expression had no effect on CXCR4 expression or migration towards SDF-1 α (Fig. 6D–E). Associating anti-miR-150 with Ado significantly increased CXCR4 expression, compared to either treatment alone (Fig. 6D). However, anti-miR-150 did not enhance the effect of Ado on cell migration (Fig. 6E). Increasing the expression of miR-150 by addition of pre-miR-150 did not affect CXCR4 expression, but blunted the increase of CXCR4 expression induced by Ado (Fig. 6F). In migration assay, pre-miR-150 had no significant effect (Fig. 6G). These results suggest that, in EPC subjected to ischemic conditions, the increase of CXCR4 expression by Ado is, at least in part, controlled by miR-150.

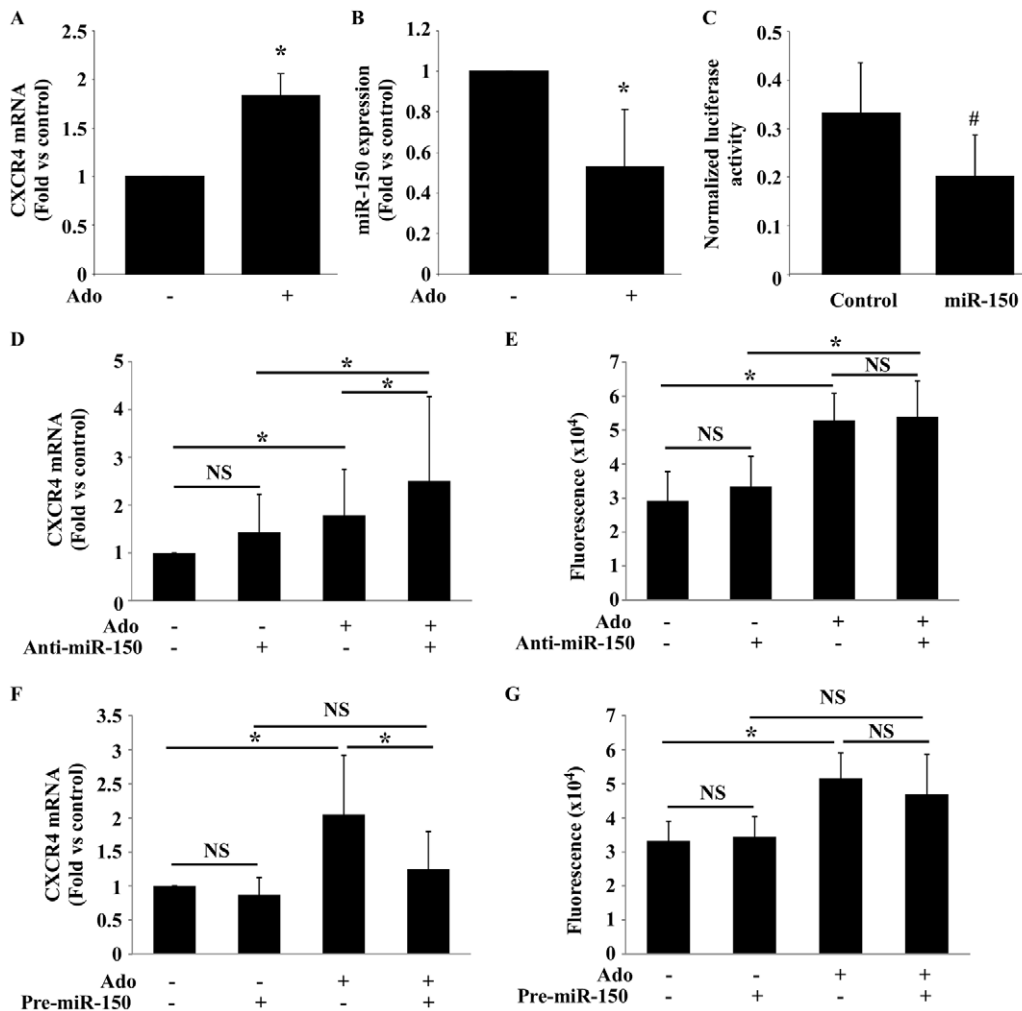


Figure 6. Role of miR-150 in the effect of adenosine on CXCR4. A–B. EPC were treated with 10 μ mol/L Ado before incubation for 4 hours in ischemic conditions (0.1% BSA instead of 20% SVF and 1% O₂). CXCR4 and miR-150 expression was evaluated by PCR. Results were normalized to β -actin and U6, respectively. Ado increased CXCR4 expression (A) and decreased miR-150 expression (B). * $P < 0.05$ vs control ($n = 5$). C. HEK-293T cells were co-transfected with 10 ng of a reporter plasmid containing the 3' UTR of CXCR4 and 30 nmol/L of either pre-miR control (control) or pre-miR-150 (miR-150). miR-150 decreased luciferase activity. # $P < 0.001$ vs control. Data are from 3 independent experiments performed in triplicate. D–G. EPC were transfected with 30 nmol/L of anti-miR-150 or pre-miR-150, or respective controls, during 24 hours, and then treated with 10 μ mol/L of adenosine during 6 hours in ischemic conditions. (D–F) CXCR4 expression was measured by PCR. (E–G) Cell migration towards recombinant SDF-1 α was assessed in a Boyden chamber after 16 hours. * $P < 0.05$ ($n = 5$). NS: not significant. doi:10.1371/journal.pone.0054135.g006

Adenosine improves EPC recruitment to the infarcted heart and angiogenesis

The effect of Ado on EPC recruitment to the heart was evaluated in rats. MI was induced in 23 rats through ligation of the LAD coronary artery. LAD-ligated rats received twice daily injections of NaCl (control group, $n = 7$), or the stable analog of Ado 2-Chloroadenosine (CADO, $n = 8$), or CADO with the non-selective antagonist of Ado receptor 8-SPT ($n = 8$). Treatments were given for 2 months, starting 7 days after coronary ligation. Cardiac sections were stained for CD31, CXCR4 and ALDH2. In CADO-treated rats, all 3 markers were markedly enhanced in the infarct border zone. This effect was blunted when the effect of Ado was blocked by 8-SPT (Fig. 7A).

Finally, we assessed whether this enhanced recruitment of EPC resulted in improved angiogenesis. CADO-treated rats exhibited an enhanced number of blood vessels within the border zone, indicating that EPC recruitment indeed favored revascularization

of the infarct border zone (+65% when compared to controls, $P = 0.03$) (Fig. 7B). This angiogenic effect was prevented by 8-SPT.

Therefore, our results clearly show that Ado stimulates EPC recruitment and angiogenesis in the infarcted heart.

Discussion

In the present study, the effect of Ado on the migration of EPC was investigated. First, we observed that Ado modulates the expression of several chemokines and chemokine receptors in EPC cultured in vitro. In particular, CXCR4 was up-regulated and this was associated with stimulation of cell migration. Then, we demonstrated that Ado improves the recruitment of EPC to the ischemic heart and this is accompanied by enhanced vascularization.

Microarrays were used to investigate the effects of Ado on EPC at a genome-wide level. Ado regulated the expression of several members of the chemokine family. Since CXCR4 was one of the

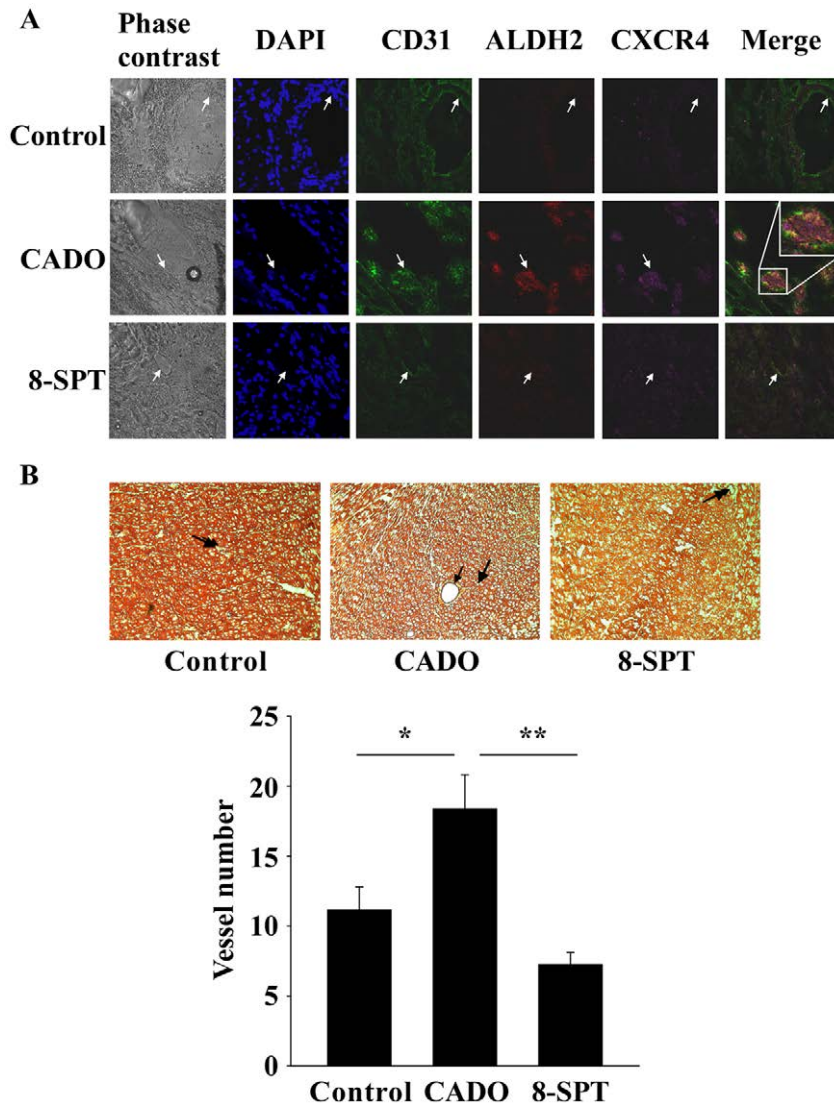


Figure 7. CADO treatment improves EPC recruitment to the heart and angiogenesis. LAD-occluded rats were treated with vehicle (n=7), CADO (n=8) or CADO +8-SPT (n=8) as described in details in Methods section. After sacrifice, cardiac sections were performed and used for histological stainings. A. Immunostainings of CD31 (green), ALDH2 (red) and CXCR4 (pink) in cardiac sections obtained in the border zone, 2 months after MI. Nuclei are stained in blue by DAPI. Merge: overlay of CD31, ALDH2 and CXCR4 stainings. Arrows indicate blood vessel membrane. Representative pictures are shown. Magnification: $\times 400$. B. Upper panel: representative cardiac sections 2 months after MI showing the border zone stained with hematoxylin and eosin. Arrows indicate blood vessels. Lower panel: quantitative analysis of the number of vessels in the border zone of the infarct. Magnification: $\times 100$. Results are mean \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0054135.g007

most affected and is the major regulator of EPC chemotaxis after binding of SDF-1 α , we focused our investigations on this receptor.

Up-regulation of CXCR4 mRNA expression by Ado was significant (3-fold increase). This up-regulation was absent in monocytes, suggesting that Ado does not induce an uncontrolled inflammatory response which could be consecutive to the recruitment of several hematopoietic cell types.

The increase of CXCR4 expression at the cell surface was modest, but highly reproducible ($P < 0.001$). This is probably a consequence of receptor internalization. Similar increases of CXCR4 at the cell surface have been shown to be sufficient to stimulate EPC migration [28]. Therefore, we were not surprised to observe that up-regulation of CXCR4 expression by Ado stimulates the migration of EPC, both towards recombinant

SDF-1 α and conditioned medium from fibroblasts. Fibroblasts are a major source of SDF-1 α in the heart.

In the current study, the increase of CXCR4 expression was significant at a dose of 1 $\mu\text{mol/L}$ of Ado, a dose that can easily be encountered extracellularly in the ischemic heart [29]. Indeed, in conditions of ischemia, Ado can accumulate in the heart to 100 $\mu\text{mol/L}$ [29]. Our results are therefore physiologically relevant.

We profiled the expression of Ado receptors on EPC, and observed significant regulation of their expression by Ado itself. Adenosine receptors appear to be tightly regulated. In inflammatory cells for instance, we and others have shown a high level of regulation following activation [14–16,30,31]. In addition to transcriptional control, Ado receptors are also regulated by internalization [32]. In EPC, Ado increased the expression of

A₂-type receptors. Mechanistic studies using pharmacological agents and RNA interference suggested that the A_{2B} receptor is responsible for the effect of Ado on CXCR4. This is consistent with the reported over-expression of CXCR4 through A_{2A} and A_{2B} receptors in human carcinoma cells [33]. Our findings suggest that drugs having high affinity for the A_{2B} receptor may have a significant effect on EPC recruitment. However, from our data, some contribution of the A_{2A} receptor on CXCR4 and EPC cannot totally be excluded. The A_{2A} receptor is involved in EPC mobilisation and angiogenesis in a wound model [34]. In contrast, knock-out mice for the A_{2B} receptor showed an over-expression of CXCR4 on leukocytes [35]. This discrepancy with our results and others' [33] may be related to species differences. Indeed, it is known that Ado receptors activity vary with species [36]. Our experiments were performed with human cells.

To validate our *in vitro* observations in an *in vivo* setting, we analysed EPC recruitment in rats subjected to MI and supplemented with CADO and/or 8-SPT. We observed an increase of CXCR4 staining in cardiac sections from CADO-treated rats. This increase was paralleled by an increase of ALDH2 staining. A high level of ALDH2 activity has been described in EPC [37]. Transplantation of bone marrow cells with high ALDH2 activity improves revascularisation of ischemic limbs and cord blood progenitors with high ALDH2 activity improve vascular density after acute MI [38,39]. The increased expression of ALDH2 in CADO-treated rats indicates a stimulation of the recruitment of EPC with high regenerative potential. In LAD-occluded control rats, we did not observe significant ALDH2 and CXCR4 stainings, suggesting that EPC recruitment is weak in these animals. In addition, administration of 8-SPT blunted the effect of CADO. Therefore, our data show that Ado is a potent stimulus of EPC recruitment to the heart.

The recruitment of EPC to the heart of CADO-treated rats was associated with an enhanced expression of CD31, an endothelial marker, and blood vessel number. This observation is consistent with a stimulation of the revascularization of the ischemic heart by CADO. However, whether this is a direct consequence of EPC recruitment following CADO administration is unclear. Indeed, Ado is pro-angiogenic and indirect effects, through stimulation of the production of vascular endothelial growth factor by inflammatory cells for instance [16], may also be involved. Of note, EPC failed to produce vascular endothelial growth factor, even upon treatment with Ado (not shown). Tano et al. [11] showed that ischemia inhibits the expression of miR-150 in bone marrow derived mononuclear cells and activates its target gene CXCR4. We therefore investigated whether Ado could regulate CXCR4 expression through modulation of miR-150. In these experiments, EPC were cultured under ischemic conditions (i.e. serum and oxygen deprivation) to mimic cardiac stress. In parallel to an increase of CXCR4 expression, we observed a decrease of miR-150 when cells were treated with Ado. Since CXCR4 is a known target of miR-150 [11], we sought to verify this mechanism in our system. Using a luciferase gene reporter assay, we were able to show that miR-150 indeed binds CXCR4 and thereby decreases

CXCR4 expression. In addition, in experiments with actinomycin D, which blocks RNA transcription, we were able to show that Ado up-regulates CXCR4 transcription. Overall, it appears that up-regulation of CXCR4 expression by Ado may be controlled by multiple pathways involving both transcription of CXCR4 and of miR-150.

Blocking endogenous miR-150 with anti-miR-150 or enhancing the pool of intracellular miR-150 by transfection of pre-miR-150 did not alter CXCR4 expression per se. Interestingly, down-regulation of miR-150 by anti-miR-150 potentiated the increase of CXCR4 expression by Ado, and, on the opposite, up-regulation of miR-150 by pre-miR-150 prevented the increase of CXCR4 expression by Ado. These data suggest that, under ischemic conditions, Ado enhances CXCR4 expression through down-regulation of miR-150. However, modulation of miR-150 expression by anti-miR-150 or pre-miR-150 did not affect cell migration. This may be related to our recent observation that EPC migration is controlled not only by CXCR4/SDF-1 α , but also by CCR1/MCP-3 [40].

So far, very few reports have studied miR-150 in stem cells. miRNA profiles have identified miR-150 in EPC, human umbilical vein endothelial cells, and human coronary artery endothelial cells [41]. Our results confirmed the expression of miR-150 in EPC and suggested that this miRNA may be a potential target to enhance the regenerative capacity of these cells. However, while miR-150 appears to slow EPC migration in our study, a previous study reported that miR-150, secreted by monocytes, enhances the migration of human microvascular endothelial cells [42]. Interrogation of web-accessible databases identified over 400 predicted targets of miR-150. Additional studies are required to test whether miR-150 affects the expression of other genes regulating the functionality of EPC. Ultimately, the usefulness of miR-150 as a target for cardiac repair will have to be determined in animal models.

In conclusion, we have shown that Ado stimulates the migration of EPC. *In vitro*, the mechanism involves A_{2B} receptor activation, up-regulation of CXCR4 expression and down-regulation of miR-150. This effect is associated with enhanced angiogenesis in the ischemic heart. These findings suggest that A_{2B} agonists should be tested in models of cardiac repair.

Acknowledgments

We thank Bernadette Leners, Laurent Quennery and Céline Jeanty for expert technical assistance. The help of Nicolaas Brons and Wim Ammerlaan with flow cytometry are acknowledged. The authors acknowledge the contribution of Isabelle Ernens.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MRT YD. Performed the experiments: MRT EG MB FM FL CN. Analyzed the data: MRT MB LZ PYM YD. Wrote the paper: MRT YD DW. Critically reviewed all sections of the text for important intellectual content: MRT EG MB FL CN LZ FM PYM YD DW.

References

- Heidenreich PA, Trogon JG, Khavjou OA, Butler J, Dracup K, et al. (2011) Forecasting the Future of Cardiovascular Disease in the United States. *Circulation* 123: 933–944.
- Siddique A, Shantsila E, Lip GY, Varma C (2010) Endothelial progenitor cells: what use for the cardiologist? *J Angiogenesis Res* 2: 6.
- Raffi S, Lyden D (2003) Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 9: 702–712.
- Tongers J, Losordo DW, Landmesser U (2011) Stem and progenitor cell-based therapy in ischaemic heart disease: promise, uncertainties, and challenges. *Eur Heart J* 32: 1197–1206.
- Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, et al. (2004) Stromal cell-derived factor-1 α plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* 110: 3300–3305.
- Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, et al. (1999) Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 283: 845–848.
- Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, et al. (2004) Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 10: 858–864.

8. Lapidot T, Dar A, Kollet O (2005) How do stem cells find their way home? *Blood* 106: 1901–1910.
9. Walter DH, Haendeler J, Reinhold J, Rochwalsky U, Seeger F, et al. (2005) Impaired CXCR4 signaling contributes to the reduced neovascularization capacity of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Circ Res* 97: 1142–1151.
10. Oh BJ, Kim DK, Kim BJ, Yoon KS, Park SG, et al. (2010) Differences in donor CXCR4 expression levels are correlated with functional capacity and therapeutic outcome of angiogenic treatment with endothelial colony forming cells. *Biochem Biophys Res Commun* 398: 627–633.
11. Tano N, Kim HW, Ashraf M (2011) microRNA-150 Regulates Mobilization and Migration of Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells by Targeting Cxcr4. *PLoS One* 6: e23114.
12. Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Muller CE (2011) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update. *Pharmacol Rev* 63: 1–34.
13. Ryzhov S, Solenkova NV, Goldstein AE, Lamparter M, Fleener T, et al. (2008) Adenosine receptor-mediated adhesion of endothelial progenitors to cardiac microvascular endothelial cells. *Circ Res* 102: 356–363.
14. Ernens I, Rouy D, Velot E, Devaux Y, Wagner DR (2006) Adenosine inhibits matrix metalloproteinase-9 secretion by neutrophils: implication of A2a receptor and cAMP/PKA/Ca2+ pathway. *Circ Res* 99: 590–597.
15. Velot E, Haas B, Leonard F, Ernens I, Rolland-Turner M, et al. (2008) Activation of the adenosine-A3 receptor stimulates matrix metalloproteinase-9 secretion by macrophages. *Cardiovasc Res* 80: 246–254.
16. Ernens I, Leonard F, Vausort M, Rolland-Turner M, Devaux Y, et al. (2010) Adenosine up-regulates vascular endothelial growth factor in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 392: 351–356.
17. Leonard F, Devaux Y, Vausort M, Ernens I, Rolland-Turner M, et al. (2011) Adenosine modifies the balance between membrane and soluble forms of Flt-1. *J Leukoc Biol* 90: 199–204.
18. Azuaje F, Leonard F, Rolland-Turner M, Devaux Y, Wagner DR (2011) Proof-of-principle investigation of an algorithmic model of adenosine-mediated angiogenesis. *Theor Biol Med Model* 8: 7.
19. Wagner DR, Combes A, McTiernan C, Sanders VJ, Lemster B, et al. (1998) Adenosine inhibits lipopolysaccharide-induced cardiac expression of tumor necrosis factor- α . *Circ Res* 82: 47–56.
20. Wagner DR, Kubota T, Sanders VJ, McTiernan CF, Feldman AM (1999) Differential regulation of cardiac expression of IL-6 and TNF- α by A2- and A3-adenosine receptors. *Am J Physiol* 276: H2141–2147.
21. Wagner DR, McTiernan C, Sanders VJ, Feldman AM (1998) Adenosine inhibits lipopolysaccharide-induced secretion of tumor necrosis factor- α in the failing human heart. *Circulation* 97: 521–524.
22. Azuaje FJ, Wang H, Zheng H, Leonard F, Rolland-Turner M, et al. (2011) Predictive integration of gene functional similarity and co-expression defines treatment response of endothelial progenitor cells. *BMC Syst Biol* 5: 46.
23. Chavakis E, Carmona G, Urbich C, Gottig S, Henschler R, et al. (2008) Phosphatidylinositol-3-Kinase- γ Is Integral to Homing Functions of Progenitor Cells. *Circ Res* 102: 942–949.
24. Devaux Y, Azuaje F, Vausort M, Yvorra C, Wagner DR (2010) Integrated protein network and microarray analysis to identify potential biomarkers after myocardial infarction. *Funct Integr Genomics* 10: 329–337.
25. Le Brigand K, Russell R, Moreillon C, Rouillard JM, Jost B, et al. (2006) An open-access long oligonucleotide microarray resource for analysis of the human and mouse transcriptomes. *Nucleic Acids Res* 34: e87.
26. Goldman S, Raya TE (1995) Rat infarct model of myocardial infarction and heart failure. *J Card Fail* 1: 169–177.
27. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, et al. (1979) Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 44: 503–512.
28. Mause SF, Ritzel E, Liehn EA, Hristov M, Bidzhekov K, et al. (2010) Platelet microparticles enhance the vasoregenerative potential of angiogenic early outgrowth cells after vascular injury. *Circulation* 122: 495–506.
29. Van Belle H, Goossens F, Wynants J (1987) Formation and release of purine catabolites during hypoperfusion, anoxia, and ischemia. *Am J Physiol* 252: H886–893.
30. Murphree LJ, Sullivan GW, Marshall MA, Linden J (2005) Lipopolysaccharide rapidly modifies adenosine receptor transcripts in murine and human macrophages: role of NF- κ B in A(2A) adenosine receptor induction. *Biochem J* 391: 575–580.
31. Ramanathan M, Luo W, Csoka B, Hasko G, Lukashev D, et al. (2009) Differential regulation of HIF-1 α isoforms in murine macrophages by TLR4 and adenosine A2A receptor agonists. *J Leukoc Biol* 86: 681–689.
32. Klaasse EC, Ijzerman AP, de Grip WJ, Beukers MW (2008) Internalization and desensitization of adenosine receptors. *Purinergic Signal* 4: 21–37.
33. Richard CL, Tan EY, Blay J (2006) Adenosine upregulates CXCR4 and enhances the proliferative and migratory responses of human carcinoma cells to CXCL12/SDF-1 α . *Int J Cancer* 119: 2044–2053.
34. Montesinos MC, Shaw JP, Yee H, Shamamian P, Cronstein BN (2004) Adenosine A(2A) receptor activation promotes wound neovascularization by stimulating angiogenesis and vasculogenesis. *Am J Pathol* 164: 1887–1892.
35. Yang D, Koupenova M, McCrann DJ, Kopeikina KJ, Kagan HM, et al. (2008) The A2b adenosine receptor protects against vascular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 792–796.
36. Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53: 527–552.
37. Povsic TJ, Zavodni KL, Kelly FL, Zhu S, Goldschmidt-Clermont PJ, et al. (2007) Circulating progenitor cells can be reliably identified on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *J Am Coll Cardiol* 50: 2243–2248.
38. Capoccia BJ, Robson DL, Levac KD, Maxwell DJ, Hohm SA, et al. (2009) Revascularization of ischemic limbs after transplantation of human bone marrow cells with high aldehyde dehydrogenase activity. *Blood* 113: 5340–5351.
39. Sondergaard CS, Hess DA, Maxwell DJ, Weinheimer C, Rosova I, et al. (2010) Human cord blood progenitors with high aldehyde dehydrogenase activity improve vascular density in a model of acute myocardial infarction. *J Transl Med* 8: 24.
40. Bousquenaud M, Schwartz C, Leonard F, Rolland-Turner M, Wagner D, et al. (2012) Monocyte chemotactic protein 3 is a homing factor for circulating angiogenic cells. *Cardiovasc Res* 94: 519–525.
41. Fleissner F, Jazbutyte V, Fiedler J, Gupta SK, Yin X, et al. (2010) Asymmetric Dimethylarginine Impairs Angiogenic Progenitor Cell Function in Patients With Coronary Artery Disease Through a MicroRNA-21-Dependent Mechanism. *Circ Res* 107: 138–143.
42. Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, et al. (2010) Secreted Monocytic miR-150 Enhances Targeted Endothelial Cell Migration. *Molecular Cell* 39: 133–144.

DISCUSSION

Axe 1: Intérêt des miARN comme biomarqueurs des MCV aiguës

Avant d'initier la discussion individuelle de chaque étude, il est important de mentionner que toutes nos études cherchant à mettre en évidence l'utilité des miARN circulants comme biomarqueurs diagnostiques ou pronostiques ont été réalisées grâce à la même technique. Une caractéristique importante de cette technique est la durée de mesure des miARN comparée aux techniques de mesure des marqueurs protéiques plasmatiques traditionnels. En effet, le temps nécessaire à mesurer les miARN circulants est une limite. Alors qu'une mesure de TnT prend moins de 60 minutes, mesurer les miARN se fait par PCR quantitative, technique fastidieuse et très longue qui nécessite une étape d'extraction d'ARN, une rétrotranscription ainsi qu'une étape d'amplification. De plus cette méthode, qui est pourtant la technique de référence pour mesurer efficacement et précisément la quantité de miARN, n'est pas encore standardisée. Une autre étape limitante est la normalisation effectuée pour mesurer les miARN, car actuellement il n'y a aucun « miARN de ménage » identifié dans le plasma. Il serait également utile de déterminer des valeurs limites d'expression des miARN dans les fluides biologiques, car il est difficile de déterminer une valeur seuil entre l'absence d'expression et une expression faible.

En dehors de la technique de mesure des miARN, un autre point important concerne la méthode de récolte et de stockage des échantillons, qui peut altérer l'expression des miARN, malgré que ceux-ci soient relativement stables.

Toutes ces étapes n'ont pas encore été standardisées et constituent des limites à l'utilisation des miARN pour le diagnostic ²⁵⁷. Ces éléments sont à prendre en compte au niveau clinique, lorsque le temps est très important et que le diagnostic doit se faire au plus vite. Ceux-ci peuvent remettre partiellement en question l'utilité des miARN au niveau clinique.

Le protocole que nous avons utilisé dans nos études a déjà été validé précédemment ¹⁰ et a fait ses preuves au cours de ces études.

Mais actuellement différentes nouvelles techniques de mesure des miARN sont en train d'être mises au point afin que le temps ne soit plus une limitation à l'utilité des miARN en clinique. Par exemple, un système de microarrays microfluidiques permettant une détection

ultrasensible des miARN a été mis au point ²⁵⁸. Effectué sous microscope optique, il ne nécessite pas d'étape d'amplification, ce qui réduit le temps de mesure à 1 heure. Au niveau commercial, Nanostring Technologies a développé un système de mesure des miARN automatisé qui ne contient pas d'étape d'amplification mais qui nécessite de l'ARN total purifié, le nCounter® miRNA Expression Assay. Son avantage est qu'il mesure 800 miARN simultanément, ce qui est intéressant pour des approches multimarqueurs.

Une autre compagnie, HTG Molecular Diagnostics Incorporation, a mis au point un système capable de mesurer l'expression de plusieurs miARN dans le plasma: le HTG Edge System. Ce système peut s'appliquer à des échantillons cellulaires et plasmatiques. Son avantage est qu'il ne nécessite pas d'étape d'extraction d'ARN, ni de rétrotranscription en ADNc ni de PCR quantitative. Son principe est basé sur une première étape de préparation des échantillons, dans laquelle l'ARN est mélangé avec des sondes spécifiques des miARN d'intérêt, qui sont biotinylées et protégées contre les nucléases. L'ajout de nucléases permet de conserver uniquement les sondes d'intérêts. Des bases sont alors ajoutées et le tout est transféré pour la deuxième étape dans un plaque qui va capturer cette sonde grâce à un oligonucléotide spécifique ancré à la plaque. L'ajout d'avidine-HRP (Peroxydase de raifort) permet finalement de détecter le miARN par chimiluminescence. Ce système permet de mesurer l'expression de 47 miARN par échantillon, en moins de 24 heures et de façon totalement automatisée.

Ces technologies sont en cours de développement dans les compagnies de biotechnologies pour que le temps ne soit plus une limite à l'utilisation des miARN en clinique.

Un autre point crucial, commun à toutes les études sur les miARN en tant que biomarqueurs des MCV, concerne l'influence des médicaments sur les taux de miARN circulants.

En effet, ces patients sont souvent sous médication à long terme avant et après l'évènement aigu. De plus, ils sont souvent traités avec de l'aspirine par exemple, avant leur arrivée à l'hôpital ou avant le prélèvement sanguin à partir duquel les miARN circulants seront mesurés.

Plusieurs études effectuées chez des rongeurs ont mis en évidence l'influence de l'isoproterenol ²⁵², d'un β -bloquant particulier, le propranolol ²⁵⁹ ou encore d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ²⁶⁰ sur le taux de certains miARN circulants.

Chez l'humain, une étude a montré que l'utilisation de statine n'affecte pas le taux de miR-126 dans une cohorte de patients avec IC ⁸⁶, alors qu'une autre étude a démontré que les

statines, les inhibiteurs du système rénine-angiotensine, et l'aspirine affectent le taux de miR-17/-145/-155 dans 2 cohortes de patients avec syndrome coronarien ⁷⁹.

Plus récemment, il a été prouvé que l'utilisation d'une thérapie antiplaquettaire diminue les taux de miARN circulants spécifiques des plaquettes (miR-223 et miR-191) mais également d'autres miARN comme le miR-126 ou miR-150 ²⁶¹. Cette étude met en évidence que l'origine des miARN circulant est variable, et que les cellules circulantes sanguines, en particulier les plaquettes, influencent et contribuent aux miARN circulants.

Un point important concerne deux traitements communément utilisés et dont l'influence sur les taux de miARN circulant a été démontré:

- L'aspirine, qui est communément utilisée lors de problèmes cardiaques et souvent administrée avant même l'émission du diagnostic, a été montrée capable d'influencer le taux circulant du miR-126 ²⁶².

- L'héparine, dont l'utilisation est aussi commune chez des patients suspectés de MCV ou lors de prélèvement sanguin, interfère fortement avec la PCR quantitative et donc avec la mesure des miARN circulants ²⁶³. Ceci représente également un obstacle technique majeur. Il faut compter au moins 6h après injection pour que l'héparine n'interfère plus avec la PCR quantitative.

Nous allons donc maintenant discuter séparément chacune de nos études.

Etude n°1: Détermination de la capacité diagnostique des miARN circulants chez des patients arrivés aux urgences avec une douleur thoracique (cohorte APACE)

Le but de cette 1^{ère} étude était de déterminer la capacité diagnostique de 6 miARN circulants (miR-133a/-208b/-223/-320a/-451/-499) chez 1155 patients arrivés aux urgences pour une douleur thoracique, afin d'être au plus proche de la situation clinique à laquelle font face les cliniciens de manière quotidienne.

Il est important de préciser que les patients avec maladie rénale ont été éliminés de la cohorte (afin d'éliminer toute influence de cette comorbidité).

Une première limitation évidente de notre étude est la sélection des miARN que nous avons mesurés. Cela n'exclut pas la possibilité que d'autres miARN puissent avoir une forte valeur diagnostique ou une valeur additive aux marqueurs conventionnels. Plusieurs candidats pourraient être testés ²⁶⁴.

Notre étude est la seule connue pour avoir étudié la capacité diagnostique/pronostique de miARN circulants dans une aussi grande cohorte de patients (plus de 1000 patients). De plus, cette cohorte a été effectuée pour être la plus proche possible de la situation clinique quotidienne, c'est-à-dire avec des patients arrivant aux urgences avec une douleur thoracique et sans diagnostic établi. De rares études ont également suivi cette même méthodologie ^{89, 90} mais ces études étaient effectuées sur un plus petit nombre de patients (n<500) et surtout ces études étaient unicentriques, contrairement à l'étude multicentrique internationale APACE.

Nous avons donc tout d'abord mesuré les miARN sélectionnés et nous avons montré que les miR-208b et miR-499 étaient surexprimés dans le plasma des patients avec IM aigu comparés aux patients avec les autres diagnostics finaux, avec plus particulièrement des taux de miR-133a/-208b/-499/-45 supérieurs chez les STEMI comparés aux NSTEMI. Concernant le diagnostic, nous avons identifié le miR-208b comme le miARN ayant la plus grande capacité diagnostique pour l'IM suivi du miR-499. Cela n'est pas étonnant pour le miR-208b car parmi tous les miARN surexprimés chez les patients avec IM, c'est le seul miARN exclusivement lié à une lésion et non pas à d'autres muscles ²⁶⁵. De plus, ces miARN ont été les plus étudiés et identifiés pour leur capacité diagnostique dans la littérature.

Nous avons également montré qu'aucun de ces miARN ne surpasse la cTnT ni la hs-cTnT, avec des AUC de 0,84 et 0,94 respectivement et qu'aucun des miARN mesurés n'a eu de valeur additive au diagnostic, quand il était combiné à la cTnT ou la hs-cTnT. Ces résultats, même s'ils sont assez décevants, sont malgré tout importants pour les potentielles utilisations cliniques des miARN.

L'étude de Gidlöf et coll. corrobore nos résultats avec le miR-208b ayant la plus forte valeur diagnostique ⁹⁰. Cependant, encore une fois, ce miARN n'était pas capable de battre la TnT. Dans l'étude de Oerlemans et coll., le miR-499 avait la plus grande valeur diagnostique car ils ont étudié le miR-208a et non le miR-208b ⁸⁹. Ces données corroborent également nos résultats vu que le miR-499 avait la 2^{ème} valeur diagnostique la plus forte dans notre étude après le miR-208b. Ils ont en plus été capables de battre la valeur diagnostique de la hs-cTnT grâce à une combinaison des miR-1/-21/-499, qui a également montré une valeur additive à la hs-cTnT (atteignant une AUC maximale de 0,94). Dans notre étude, les combinaisons n'ont pas permis de dépasser la hs-cTnT qui avait déjà une capacité diagnostique très forte (AUC de 0,94).

De plus, la difficulté, voir même l'incapacité à battre la valeur diagnostique de la hs-cTnT peut partiellement s'expliquer par le fait que dans cette étude comme dans beaucoup d'autres ont été appliqués les critères définis par la définition universelle de l'IM pour émettre le diagnostic de l'IM ³. En effet, cette définition prend en compte très fortement le dosage de la cTnT, et se base sur ses valeurs, ce qui met forcément la cTnT en position de force. Tout nouveau biomarqueur aura donc des difficultés à avoir une valeur diagnostique supérieure à la cTnT.

Concernant la capacité pronostique des miARN circulants, dans notre étude, bien que le taux de miR-208b était supérieur chez les patients décédés comparés aux survivants, aucun autre miARN n'était statistiquement significatif entre les décédés et les survivants. Seul le miR-208b avait une capacité pronostique modeste mais significative pour la mortalité à court terme avec une AUC de 0,67, et aucun miARN n'était capable de prédire la mortalité à long terme. Une observation intéressante est que la survie des patients avec douleur à la poitrine était meilleure chez les patients ayant peu de miR-208b circulants. L'étude de Gidlöf et coll. a cherché à évaluer la capacité pronostique des miARN circulants chez des patients avec suspicion de syndrome coronarien aigu, et une association entre les taux de miR-208b et miR-499 et le risque de mort ou IC chez les patients avec IM à 30 jours a été mise en

évidence⁹⁰. Ils ont cependant démontré une capacité pronostique modeste pour ces deux miARN, avec des AUC de 0,64. Ces résultats corroborent encore une fois nos résultats.

On peut donc conclure que cette étude est la première à mimer les conditions cliniques avec autant de patients et de façon multicentrique. Cependant, nos résultats tempèrent l'utilisation clinique des miARN circulants pour le diagnostic/pronostic des patients avec douleur thoracique, car aucun des miARN testés ne surpasse la hs-cTnT.

Etude n°2: Détermination de la capacité diagnostique et pronostique des miARN circulants chez des patients après IM (cohorte LUCKY) et association potentielle avec les facteurs de risque CV.

- Détermination de la capacité diagnostique de certains miARN circulants lors d'un IM

Le but de cette étude était de déterminer si certains miARN circulants pouvaient être utilisés comme biomarqueurs diagnostiques de l'IM dans une grande cohorte de patients (n=510). Pour cela, nous avons donc sélectionné les miR-208b et miR-499 déjà connus pour leur potentiel diagnostique dans de plus petites cohortes de patients avec IM ¹⁰.

Nous avons démontré que nos deux miARN circulants avaient un très fort potentiel diagnostique, particulièrement le miR-499, dont l'AUC était comparable à celle de la hs-cTnT. De plus, le miR-499 avait une AUC légèrement supérieure à la hs-cTnT chez les patients NSTEMI. Ceci pourrait être important au niveau clinique. En effet, chez ces patients, il faut souvent plusieurs dosages des cTnT pour émettre le diagnostic de l'IM, car l'atteinte cardiaque est réduite et les tests de dosage des cTnT en général ne sont pas assez sensibles ou spécifiques. Une seule mesure des miARN circulants pourrait permettre de diagnostiquer plus vite ces patients. Notre étude est cependant limitée par le faible nombre de patients NSTEMI. En effet, cette cohorte contient des patients diagnostiqués pour un IM dans les 12h heures après arrivée aux urgences et ayant tous subi une angioplastie coronaire. Cette procédure est généralement pratiquée chez des patients STEMI.

Le miR-499 semble clairement supérieur au miR-208b pour détecter les lésions myocardiques. Ces deux miARN sont enrichis dans le cœur, et sont tous deux situés dans les gènes codant les chaînes lourdes de la myosine dans le muscle cardiaque ou squelettique ²⁶⁶. Ces deux miARN partagent donc beaucoup de cibles mais ils ne semblent pas avoir le même rôle durant l'IM. Par exemple, le miR-208b est augmenté dans la circulation chez les patients avec cardiopathie coronarienne, ce qui n'est pas le cas du miR-499 ⁷⁹. De plus, le miR-208 est considéré comme cardiaque-spécifique, alors que le miR-499 est fortement exprimé dans le cœur et son expression diminue dans le cœur alors qu'elle augmente dans la circulation après IM ^{101, 203}.

Dans cette étude, les patients LUCKY ont tous des signes cliniques d'IM très marqués (atteintes myocardiques et changement dans l'ECG), et les angines de poitrines instables ou arythmies ont été exclues. De plus, il s'agit ici de contrôles sains. Tous ces éléments peuvent expliquer la très forte capacité diagnostique de la hs-cTnT (des AUC similaires ont déjà été publiées ¹⁹).

Concernant le potentiel pronostique après IM du miR-208b et du miR-499, ces miARN étaient corrélés avec la FE durant le suivi des patients mais n'ont montré qu'une capacité pronostique modeste, avec des AUC inférieures à 0,70. Cela démontre que même s'ils sont fonctionnellement impliqués dans le remodelage post-IM et l'IC, ces deux miARN ne sont pas de bons biomarqueurs pronostiques post-IM. Cela n'exclut pas la possibilité que d'autres miARN puissent servir de biomarqueurs pronostiques post-IM. Par exemple, le miR-423-5p qui a été mis en évidence comme biomarqueur diagnostique de l'ICA, pourrait être testé comme biomarqueur pronostique chez ces patients avec IM ¹¹⁶.

Un autre point important est la présence de comorbidités, qui reste un facteur pouvant influencer les résultats. Plus particulièrement, nous nous sommes intéressés à la fonction rénale (notre étude contient 3 patients sous hémodialyse chronique). Il semble cependant que la fonction rénale ne semble pas affecter le taux de miARN circulants chez des patients ne nécessitant pas d'hémodialyse et nous avons démontré au laboratoire ultérieurement que les concentrations de miARN sont très faibles dans l'urine ¹⁰. Il faudrait pourtant vérifier si ces miARN sont modifiés ou élevés comme la cTnT chez ces patients sous hémodialyse, ce que nous avons cherché à démontrer dans l'étude n°5.

Une des limites très importante de cette étude est l'utilisation de 2 miARN uniquement. Même si ces miARN enrichis dans le cœur ont été très étudiés pour leur capacité diagnostique dans l'IM, ils ont rarement montré une capacité diagnostique supérieure à la cTnT. Les recherches actuelles vont donc plutôt vers l'identification d'autres miARN, pour le diagnostic de l'IM ²⁶⁷.

Cette étude a donc mis en évidence un potentiel diagnostique du miR-208b et surtout du miR-499. Cependant, à part une légère amélioration de la capacité diagnostique du miR-499 chez les NSTEMI, ces miARN ont été incapables de surpasser la hs-cTnT pour le diagnostic de l'IM.

- Association entre les miARN circulants, les facteurs de risque CV et le pronostic après IM

Dans cette étude, nous nous sommes basés sur les données recueillies sur les 510 patients LUCKY ainsi que sur les résultats obtenus précédemment sur cette cohorte. Nous avons étudié l'impact des facteurs de risque CV sur les taux des miR-208b et miR-499 circulants, et nous avons déterminé si ces 2 miARN peuvent prédire la mortalité après IM.

Nous avons tout d'abord observé des associations significatives multivariées et univariées entre le taux de miR-208b et 2 facteurs de risque CV, l'âge et l'IMC. Ces données démontrent bien une influence des facteurs de risque CV sur le taux de miARN circulants, comme le miR-208b ici.

Dans l'introduction de ce rapport nous avons vu que les facteurs de risque CV peuvent influencer les taux de miARN circulants, chez des patients sains et surtout chez des patients atteints de MCV. Nos données sont donc cohérentes avec la bibliographie. Par contre, très peu d'études se sont intéressées à l'impact des facteurs de risque CV sur le taux de miARN circulants chez des patients avec IM.

Concernant le miR-208b, une seule étude sur des patients avec syndrome coronarien aigu a mis en évidence une association significative entre le miR-208b et l'âge⁷⁴. Cependant, leur association est opposée à celle que nous montrons: les patients plus âgés avaient moins de miR-208b que les plus jeunes. Une des explications possibles vient du fait que dans cette étude, il y a également des patients avec angine de poitrine instable et non pas que des patients avec IM comme dans notre étude.

Nous avons aussi montré que le taux de hs-cTnT était également associé avec l'âge. Cela corrobore la corrélation que nous avons reportée dans la première partie de l'étude n°2 entre le taux de hs-cTnT et le miR-208b. De plus, il a été fréquemment mis en évidence que le taux de hs-cTnT est augmenté chez les personnes âgées, ce qui implique plusieurs séries de mesure³¹.

Nous avons également observé des associations multivariées significatives entre les taux de miR-208b et de miR-499 avec l'hypertension. Ces associations étaient perdues en analyses univariées. La pertinence biologique de ces données est inconnue. Concernant l'association positive entre le miR-208b et l'IMC, elle n'a pas été mise en évidence chez des patients avec dysfonction diastolique¹⁰.

Par contre dans notre étude nous n'avons pas trouvé d'associations entre les taux de miARN et d'autres facteurs de risque comme le genre ou l'hypercholestérolémie alors que par exemple, le miR-499 a été trouvé associé avec le genre dans l'étude de Widera et coll.⁷⁴. Toutes ces différences peuvent s'expliquer par les différentes caractéristiques des cohortes de patients.

Nous avons ensuite par des analyses de sous-groupes étudié l'effet cumulatif des facteurs de risque et nous avons observé que les patients obèses et âgés avaient plus de miR-208b circulants que les patients non obèses et jeunes. Ces données doivent toutefois être interprétées avec précaution et nécessitent une validation.

Concernant la mortalité, nous avons observé que l'âge, l'hypercholestérolémie et le taux de hs-cTnT sont des prédicteurs de la mortalité à l'hôpital. Seulement l'âge restait prédicteur de mortalité à 1 et 6 ans. Aucun de nos deux miARN n'était prédicteur de mortalité, ce qui est cohérent avec la modeste valeur pronostique de ces miARN observée dans la première partie de l'étude n°2. Cela est également cohérent avec l'étude de Widera et coll. qui a rapporté que le miR-499 n'était pas prédicteur de mortalité à 6 mois chez des patients avec syndrome coronarien aiguë⁷⁴, même si le miR-208b était un modeste prédicteur de mortalité. Toutes ces données ne montrent pas une forte capacité pronostique des miARN enrichis dans le cœur après IM. Il faut tout de même préciser que comme dans l'étude de Widera et coll., la hs-cTnT avait une valeur pronostique proche de la significativité⁷⁴.

En conclusion, les miARN circulants sont donc influencés par les facteurs de risque CV. Cela est à prendre en compte lors des analyses de leur capacité de biomarqueur cardiaque. En effet, il faut donc inclure ces facteurs dans des modèles multivariés d'analyse de prédiction. Concernant la capacité pronostique post-IM des miR-208b et miR-499, elle reste modeste.

Etude n°3: Détermination de la capacité diagnostique et pronostique des miARN circulants chez des patients avec ICA (cohorte LARIBOISIERE)

Le but de cette étude était d'évaluer la capacité diagnostique/pronostique de 5 miARN (miR-1/-21/-23/-126/-423-5p) impliqués dans l'IC, dans une grande cohorte de patients avec ICA.

Tout d'abord il est évident que le nombre et le choix des miARN testés sont une limitation de notre étude. D'autres miARN pourraient être impliqués dans le diagnostic ou le pronostic de l'ICA, et auraient pu être mesurés. De plus, le choix de ces miARN, bien qu'impliqués dans l'IC et pertinents dans le domaine CV, peut également limiter cette étude.

Nous avons évalué la valeur diagnostique de ces miARN pour l'ICA. Aucun des 5 miARN n'a eu de valeur diagnostique supérieurs au BNP (AUC <0,7 pour les 5 miARN, alors que le BNP a eu une AUC de 0,97).

Cela est étonnant, surtout pour le miR-423-5p. En effet, il a été montré capable de différencier les patients avec IC de contrôles dans plusieurs études^{75, 114, 116}, alors que sa valeur diagnostique dans notre étude était faible (AUC de 0,61). Ceci pourrait s'expliquer par les différentes caractéristiques des sujets contrôles utilisés (nos contrôles sont dyspnéiques alors que les contrôles utilisés dans les autres études sont sains). Une étude est cependant en accord avec nos résultats et a démontré que ce miARN n'est pas associé avec le diagnostic de l'IC¹¹³. Cependant, dans cette étude, le miR-423-5p augmentait légèrement mais significativement la valeur diagnostique du BNP, alors que nous n'avons montré aucune valeur additive du miR-423-5p sur la valeur diagnostique du BNP: cela peut s'expliquer par le fait que le BNP a déjà une très forte valeur diagnostique dans notre étude (AUC de 0,97) alors que son AUC passe de 0,89 à 0,93 grâce à l'ajout du miARN dans l'étude de Ellis et coll.¹¹³.

De plus, nous avons montré une diminution de ce miARN dans notre étude comme dans celle de Ellis et coll.¹¹³, alors que les autres études ont tendance à montrer une augmentation de ce miARN chez les patients avec IC^{114, 116}.

Les miR-21 et le miR-23 que nous avons trouvés stables entre nos groupes ont également été trouvés associés au diagnostic de l'IC dans d'autres études: le miR-21 a été trouvé différenciellement exprimé chez des patients ICA comparés à des contrôles dans l'étude de Olivieri et coll.⁷⁵. Le miR-23 a été associé au diagnostic de l'IC dans l'étude d'Ellis et coll.

¹¹³.

Un paramètre important à prendre en compte est le phénotype de la pathologie. L'étude de Tijssen et coll. portait sur des patients ICA¹¹⁶ et celle de Olivieri et coll. sur des patients âgés avec ICA⁷⁵, alors que les études de Goren et coll. ou Ellis et coll. utilisaient des patients avec IC, sans précision sur le caractère aigu ou chronique de l'IC^{113, 114}. Les résultats obtenus peuvent donc être influencés par ces manques de précision.

De plus, les miARN peuvent être régulés par des causes cardiaques comme des causes non cardiaques, comme le miR-423-5p dont la différence d'expression dans un gradient transcoronaire chez des patients avec IC suggère une origine cardiaque²⁶⁸ mais dont la modulation a également été mise en évidence lors de cancer²⁶⁹.

Nous avons ensuite recherché s'il existait une association entre les taux de miARN circulants à l'admission et une potentielle réadmission à l'hôpital dans l'année suivante, chez ces patients avec ICA. Tout d'abord nous avons mis en évidence qu'1 an après, 17% des patients avec ICA sont décédés et 75% ont été réadmis à l'hôpital, en majorité pour des MCV. Dans la littérature, il est connu que le taux de réadmission à 30 jours est supérieur à 20% et que le risque de réadmission n'a pas évolué ces dernières années, même si la survie a augmenté ces 30 dernières années^{39, 40}. De nombreux biomarqueurs plasmatiques sont déjà connus pour prédire la mortalité à long terme⁴². Il est donc plus intéressant cliniquement d'identifier les patients à risque de réhospitalisation, car les patients pourraient bénéficier d'un meilleur suivi après sortie de l'hôpital, à domicile et surtout une meilleure éducation.

Nous avons donc mis en évidence que parmi tous les marqueurs biologiques classiques et les taux de miARN circulants, seul le miR-423-5p a une capacité pronostique significative, avec un OR ajusté à de multiples paramètres cliniques de 0,7. Aucun de ces miARN n'était associé avec la mortalité.

Dans la littérature, seul le miR-126 parmi les miARN testés était connu pour son association avec la sévérité de la maladie mais chez des patients avec IC congestif et non pas ICA, ce qui peut expliquer pourquoi nous ne le retrouvons pas dans nos analyses multivariées⁸⁶.

On peut donc conclure que même si ces miARN sont activement régulés chez les patients avec ICA, aucun d'entre eux n'a de valeur diagnostique et seul un faible taux de miR-423-5p à l'admission chez ces patients est associé avec une réadmission dans l'année qui suit. Cette étude suggère que le miR-423-5p est un potentiel biomarqueur pronostique de l'ICA.

Etude n°4: Détermination de la capacité pronostique des miARN circulants chez des patients après arrêt cardiaque (cohorte NORTH POLE)

Cette étude a pour but d'étudier la capacité pronostique des miARN circulants chez des patients après AC et de la comparer avec celle de la NSE et de la PCT, utilisées en clinique.

Nous avons premièrement divisé nos patients en 2 groupes en fonction de leur pronostic neurologique après AC, l'âge et le sexe et nous avons donc ensuite caractérisé le profil d'expression des miARN plasmatiques chez des patients après AC par microarrays.

Pour cela, nous avons décidé à partir d'un même volume de plasma des 2 groupes de patients de pooler ces échantillons. Bien que l'efficacité de cette stratégie ait déjà été démontrée⁹, il vaut mieux ne pas s'en servir pour des analyses statistiques afin d'identifier des miARN différentiellement exprimés, car cela augmente le risque de fausser les résultats par la présence d'échantillons hors normes et cela implique un simplicité expérimental répliqué techniquement. Cependant, une étape de validation par PCR quantitative chez chaque patient individuellement permet de surpasser cette limitation. Ces données de PCR quantitative sont utilisées pour toutes les analyses suivant ces microarrays.

Une biosignature des miARN était associée avec le pronostic neurologique de ces patients. Nous n'avons sélectionné qu'un miARN, ce qui est une limite de cette étude. D'autres miARN pourraient être analysés et étudiés. Dans les plasmas individuels des patients, nous avons confirmé l'élévation du miR-122 chez les patients à mauvais pronostic neurologique et identifié le miR-21, également surexprimé chez les patients à mauvais pronostic neurologique. Une autre limite de notre étude est l'absence de validation de nos résultats dans une autre cohorte de patients traités par hypothermie après AC.

Notre hypothèse initiale était basée sur le fait que des biomarqueurs prédictifs des dommages neurologiques seraient libérés dans le sang des patients après AC, à partir de la mort des neurones. Nous avons donc vérifié si ces miARN étaient produits par des cellules neuronales, ce qui est le cas. Ces données sont cohérentes avec notre hypothèse et suggèrent que ces miARN peuvent refléter les dommages cérébraux.

Nous avons voulu ensuite vérifier la capacité pronostique au niveau neurologique de nos 2 miARN candidats à 6 mois. Tout d'abord nous avons démontré que ces 2 miARN permettent de prévenir le devenir clinique des patients après AC avec une AUC de 0,73 pour le miR-122

et 0,77 pour le miR-21. La combinaison des 2 miARN n'a pas amélioré le pronostic à 6 mois. Nous avons ensuite montré que seul le miR-122 est corrélé à la NSE et la PCT. La NSE a montré la meilleure valeur pronostique avec une AUC de 0,98 et la PCT une AUC de 0,81.

Nous avons ensuite voulu mettre en évidence un lien entre la mortalité et les taux de miARN. La NSE a encore une fois eu la valeur pronostique la plus significative, alors que la PCT n'a aucune valeur prédictive de la mortalité. Les miR-21 et miR-122 sont des prédicteurs significatifs de la mortalité mais ne surpassent pas la NSE.

La NSE a donc montré les meilleures valeurs prédictives. La NSE a déjà été rapportée comme très bon prédicteur du devenir de patients⁵⁰. La PCT quant à elle n'a montré de capacité prédictive que pour le mauvais pronostic neurologique, ce qui a déjà été démontré et reliée à la sévérité de la phase de post-ressuscitation⁴⁸.

Il serait intéressant cliniquement de pouvoir prédire la survie des patients. Ici, la NSE était capable de prédire la survie avec une sensibilité de 94%, cependant, le faible nombre de patients n'a pas permis de déterminer de façon sûre les valeurs seuils et la sensibilité-spécificité de la NSE pour la prédiction de la survie.

Très récemment, un article a étudié le potentiel des miARN dans une cohorte de 65 patients ayant subi un AC et traités par hypothermie¹¹⁷. Ils ont également étudiés les miR-21/-122 mais ceux-ci n'étaient pas différentiellement exprimés entre les deux groupes de patients en fonction du pronostic neurologique. Il n'existe pas de différences majeures à part le nombre de patients, entre ces deux études pour expliquer l'absence de capacité pronostique des miR-21 et miR-122. Tous les échantillons sanguins ont été prélevés 48 heures après AC, les groupes ont été formés de la même façon, la seule légère différence est le nombre de miARN synthétiques utilisés mais nous ne pensons pas que cela puisse influencer les résultats. Nous ne pouvons donc que supposer que ces deux études unicentriques diffèrent par les caractéristiques des patients ou la présence de comorbidités.

Nous pouvons donc conclure de notre étude que les miR-122 et miR-21 sont associés avec un mauvais pronostic neurologique des patients après AC. L'augmentation de ces miARN dans le plasma après AC pourrait être due aux dommages cérébraux lors de l'AC. Cependant d'autres études sont nécessaires afin de vérifier chez d'autres patients et en plus grand nombre l'utilité de ces miARN pour le pronostic neurologique après AC.

Etude n°5: Intérêt des miARN circulants chez les patients hémodialysés (cohorte MINOS)

Le but de cette étude était de mesurer le taux de miR-499 chez des patients en insuffisance rénale terminale traités par hémodialyse, et de voir s'il pourrait servir au diagnostic de l'IM chez ces patients, comparé à la hs-cTnT.

Nous avons d'abord mesuré le taux de miR-499 et de hs-cTnT chez ces patients. Ces 2 marqueurs étaient surexprimés chez les patients comparés aux contrôles. L'élévation de la hs-cTnT est connue chez ces patients ²⁴. Concernant le miR-499, cela est intéressant surtout qu'aucun de ces patients n'a de signe échographique d'IM. Il est important de préciser que les taux de miR-499 étaient malgré tout plus faibles que chez des patients avec IM comme dans notre étude n°2, ce qui n'affecte pas la capacité diagnostique de ce miARN pour l'IM. Cependant dans le cas de patients en insuffisance rénale terminale traités par hémodialyse, le miR-499 ne semble pas être optimal pour juger de la présence d'une ischémie myocardique.

Certains de nos contrôles (6/41) avaient des taux de miR-499 détectables. L'origine de l'élévation de ce miARN reste inconnue vu qu'ils avaient des valeurs de hs-cTnT négatives. Mais sachant que le miR-499 est lié au muscle squelettique, et qu'il a été prouvé que les muscles squelettiques souffrant peuvent libérer des cTn, il se pourrait que le miR-499 chez ces contrôles provienne d'une souffrance des muscles squelettiques ²⁷⁰.

Après hémodialyse, le taux de hs-cTnT n'était pas modifié alors que le miR-499 était diminué. Cela suggère que la TnT n'est pas éliminée par l'hémodialyse contrairement au miR-499. Concernant la TnT, ceci est déjà connu et il n'y a pas actuellement d'explications définies, seulement des hypothèses non validées ²⁸. Mais pour le miR-499, cela suggère que les miARN peuvent être éliminés par hémodialyse ce qui est nouveau. Récemment, il a été démontré que certains miARN circulants ne semblent pas affectés par l'hémodialyse chez des patients en insuffisance rénale de stade terminale, comme les miR-155/-126 ⁹¹, le miR15b ⁹² ou encore les miR-21/-210 ⁹³.

Pour répondre à la possible élimination des miARN par hémodialyse, nous avons mesuré le taux de certains miARN dans les dialysats. Cependant, le miR-499 n'a pas été détecté dans ces dialysats de 4 patients alors que d'autres miARN testés comme le miR-16 et miR-451 y

étaient présents. Cela semble cohérent avec l'étude de Gidlöf et coll., qui a démontré que les miR-1 et miR-133a, mais pas les miR-208b et miR-499 sont éliminés par les reins et détectés dans l'urine ²⁷¹. Cependant, nous sommes limités par le faible nombre de dialysats utilisés. Une étude avec un plus grand nombre de miARN et chez un plus grand nombre de patients avec plus de prélèvements serait pertinente.

Ces données sont à prendre avec précaution car nos groupes de patients et de contrôles diffèrent par de nombreux paramètres, comme l'âge ou les précédents CV. Les différences observées pourraient partiellement s'expliquer par certains de ces paramètres. Concernant l'influence des facteurs de risque CV, nous n'avons trouvé aucune association entre le taux de miR-499 et l'hypertension ou un précédent d'IM chez nos patients et contrôles.

Nous pouvons conclure que le miR-499 et la hs-cTnT sont augmentés chez des patients en insuffisance rénale terminale, traités par hémodialyse. Il est important de mentionner que le miR-499, contrairement à la hs-cTnT, est affecté et diminué par l'hémodialyse. Nos données démontrent que le miR-499 ne semble pas être adéquat comme biomarqueur diagnostique de l'IM chez ces patients. Toutefois, il serait intéressant d'étudier d'autres miARN identifiés comme potentiels miARN diagnostiques de l'IM afin de vérifier s'ils sont libérés dans les dialysats chez ces patients, le but final étant d'identifier un ou plusieurs miARN non modifiés par l'hémodialyse pouvant servir de biomarqueur diagnostique de l'IM chez des patients en insuffisance rénale terminale traités par hémodialyse.

Axe 2: Intérêt des miARN pour la réparation cardiaque post infarctus

Les deux études de l'axe 2 ont eu pour but de mettre en évidence l'intérêt des miARN comme outils thérapeutique, lors de la réparation cardiaque post-infarctus. En effet, il est question de moduler l'expression du miR-16 ou du miR-150 à l'aide d'antimiRs ou de prémiRs.

Une des premières limitations de ces études est liée directement à la modulation d'un miARN spécifique, qui peut avoir des effets indésirables, car il est connu qu'un miARN cible de nombreux ARNm appartenant à des voies biologiques différentes. Une possibilité pour éviter cette limitation est de cibler des miARN spécifiques d'une maladie ou d'un tissu. D'un autre côté, il est également possible que ces effets inattendus soit bénéfiques, comme démontré avec l'inhibition du miR-208a ²²⁷.

Une seconde limitation est due aux paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des antimiRs et prémiRs utilisés qui sont encore peu caractérisés, comme par exemple les concentrations optimales à utiliser ou leur toxicité. Mais cette limitation technique va surement disparaître au cours du temps, car ces paramètres seront certainement déterminés dans des études futures.

En effet, beaucoup de compagnies pharmaceutiques montrent un grand intérêt dans l'utilisation thérapeutique des antimiRs et prémiRs, depuis ces 10 dernières années. Ces compagnies s'associent souvent avec de grands groupes pharmaceutiques et parfois développent le même antimiR avec des chimies différentes. Par exemple, Regulus Therapeutics et Santaris Pharma développent tous deux un antimiR-122 anti-hépatite C. Le premier antimiR à entrer en essai clinique est l'antimiR-122 de Santaris Pharma, Miravirsén, contre l'hépatite C ²²⁶. L'émergence de ces compagnies est encourageante et stimule l'utilisation des miARN pour traiter les MCV, comme par exemple miRagen Therapeutics qui développe actuellement un antimiR ciblant la famille du miR-15 pour le traitement du remodelage post-IM.

Tous ces éléments sont en faveur de l'utilisation des antimiRs ou prémiRs, ou d'une combinaison de ces molécules, dans un cadre thérapeutique, comme pour la réparation cardiaque post-IM.

Nous allons maintenant discuter séparément nos 2 études de l'axe 2.

Etude n°1: Implication du miR-16 dans les fonctions principales des EPC

Le but de cette étude était d'étudier le potentiel des miARN à augmenter les capacités régénératives des EPC.

Nous avons démarré notre étude par la caractérisation des 2 types d'EPC. En effet, il existe énormément de controverses concernant leurs phénotypes et leurs définitions¹³, cela étant en partie dû au fait qu'elles sont très peu nombreuses dans la circulation et qu'il existe beaucoup de techniques différentes pour les isoler. Deux populations principales ressortent, les EPC précoces et tardives¹⁴². Nous avons cultivé ces 2 types cellulaires distincts: les EPC tardives, qui ont un phénotype plus endothélial, prolifèrent et forment spontanément des réseaux de microtubules¹⁴⁶ et les EPC précoces, qui ont un phénotype plus monocyttaire, ne peuvent se renouveler et sécrètent des cytokines pro-angiogéniques¹⁴⁷.

Nous avons comparé le profil d'expression de miARN de ces 2 types cellulaires et nous avons mis en évidence un profil d'expression des miARN caractéristique de chaque type d'EPC, ce qui a permis d'identifier des miARN différentiellement exprimés entre nos deux types cellulaires ou exclusivement exprimés par un de nos types cellulaires. Une seule étude a publié des analyses de microarrays de miARN à partir d'EPC précoces mais effectuées sur des puces à miARN présentant des sondes de 312 miARN²³¹. Nos données sont cohérentes avec leurs résultats, et plus complètes (nos puces contenaient des sondes de 695 miARN différents).

A partir de ces analyses, 5 membres de la famille du miR-16 (miR-15a/15b/16/-103/-107) ont été mis en évidence par leur surexpression dans les EPC précoces. La famille du miR-16 est connue pour son rôle dans la prolifération cellulaire et l'apoptose dans le cancer²⁷² et également pour leur surexpression dans les cardiomyocytes durant l'IC²⁷³. Par contre, séparément, ces membres sont connus pour divers rôles: par exemple, une inhibition du miR-15 permet de diminuer la taille de l'IM et le remodelage, chez des souris soumises à un IM²¹⁶, alors que le miR-16 permet d'augmenter la différenciation des monocytes en macrophages²⁷⁴ et intervient dans les capacités angiogéniques des cellules endothéliales²⁷⁵. Ces données suggèrent que le miR-16 pourrait avoir un rôle très important dans la biologie ou dans les capacités réparatrices des EPC.

L'originalité de notre approche a été de combiner les analyses d'expression de miARN et d'ARNm, afin de découvrir des éléments à forte implication dans la régulation de la biologie des EPC.

Nous avons identifié des gènes cibles du miR-16, 3 membres de la famille des cyclines impliqués dans la progression du cycle cellulaire. Nous avons validé l'interaction du miR-16 sur ces gènes par un test luciférase, qui est le test de référence pour valider ce type d'interaction miARN-ARNm.

Nous avons observé que l'ajout d'antimiR-16 chez des EPC précoces permettait une entrée dans le cycle cellulaire. Cet effet, bien que modéré malgré des fortes doses d'antimiR-16, s'est montré très reproductible. Ceci peut s'expliquer par le fait que ce sont des cellules primaires obtenues de différents donneurs répondant différemment aux traitements et également par l'absence d'effet de l'antimiR-16 sur CCNE1. La phase de transition G1-S dépendant de CCNE1, l'inhibition du miR-16 n'est peut-être pas suffisante pour augmenter son expression et d'autres miARN pourraient intervenir, comme d'autres membres de la famille du miR-16.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux effets du miR-16 sur la différenciation des EPC. Dans la littérature, il est connu que le miR-16 intervient dans la différenciation des monocytes en macrophages²⁷⁴. Nous avons identifié 4 gènes cibles impliqués dans la différenciation qui étaient très faiblement exprimés dans les EPC précoces mais très fortement par les EPC tardives. L'inhibition du miR-16 a donc permis de stimuler la différenciation des EPC précoces vers un phénotype plus endothélial, en augmentant les marqueurs de surface VEGFR2, CD144, CD54 et CD105.

De plus, l'antagonisme du miR-16 a entraîné une augmentation de la sécrétion d'IL-8, un facteur pro-angiogénique, ce qui suggère qu'inhiber le miR-16 stimule les capacités paracrines des EPC précoces. Cependant, l'IL-8 n'est pas une cible du miR-16 ce qui suggère qu'il s'agit plutôt d'un effet indirect du miR-16.

Enfin, inhiber le miR-16 a surtout permis de stimuler la formation de tube de cellules endothéliales, comme démontré lors d'une coculture d'HUVECs avec des EPC précoces transfectées par de l'antimiR-16 et leurs milieux conditionnés, sur matrigel. Cela suggère qu'inhiber le miR-16 stimule les capacités pro-angiogéniques de ces cellules.

Lors de cette étude, nous avons donc tout d'abord caractérisé des transcriptômes de miARN différents entre les EPC précoces et tardives. Puis nous avons mis en évidence le rôle du miR-16 dans plusieurs voies biologiques clés des EPC précoces telles que la progression du cycle cellulaire et leur différenciation. Nos résultats suggèrent qu'inhiber le miR-16 dans les EPC précoces pourrait permettre d'augmenter leurs capacités réparatrices après IM.

Il ne restait donc plus qu'à effectuer des expériences in vivo pour montrer l'action de l'inhibition du miR-16. Sauf que peu de temps après publication de notre article, un article similaire est paru, dans lequel ont été étudiés les miR-15a et miR-16 dans des cellules circulantes angiogéniques (ou EPC précoces)²³⁰. Ces miARN étaient surexprimés dans des EPC précoces issues de patients atteints d'ischémie des membres inférieurs, comparés à des contrôles. Une diminution de ces miARN dans des EPC précoces de patients atteints d'ischémie des membres inférieurs permettait de stimuler la migration. Les auteurs ont été plus loin et ont montré qu'in vivo des EPC de patients sains, transfectées avec de l'antimiR-15a/-16 et transplantées dans des souris avec ischémie des membres inférieurs ont permis de stimuler l'angiogenèse, d'augmenter la densité musculaire d'artériole mais aussi d'induire une reprise de la circulation sanguine. Cela était très similaire à la suite envisagée de notre étude. La différence majeure entre ces études est que nous n'avons utilisé qu'un seul miARN, le miR-16 ce qui montrait des effets parfois faibles, alors qu'ici, la double inhibition du miR-15a et du miR-16 donnait des effets plus forts.

Cela démontre donc en plus l'utilité de tester au niveau thérapeutique un groupe de miARN, et non pas un miARN unique. Il serait intéressant toutefois de reproduire la même expérience mais chez des souris soumises à IM, afin de voir l'effet sur la fonction et réparation cardiaque, et non pas juste sur l'angiogenèse.

Etude n°2: Implication du miR-150 dans l'effet de l'adénosine sur la migration des EPC par le CXCR4

Le but de cette étude était d'étudier les effets de l'adénosine sur le recrutement des EPC jusqu'au cœur après IM, et de mettre en évidence le rôle du miR-150 dans ces effets.

Nous avons tout d'abord montré que l'adénosine module l'expression de plusieurs chimiokines et de leurs récepteurs dans les EPC par microarrays. Au vu des résultats, nous avons décidé de nous focaliser sur le CXCR4, très fortement modulé par l'adénosine sur les puces et un des majeurs régulateurs de la chimioattraction des EPC par sa liaison au SDF-1 α .

Nous avons caractérisé l'effet de l'adénosine sur le CXCR4: l'adénosine augmente fortement le CXCR4 au niveau messager alors qu'à la surface des cellules, l'augmentation était modeste mais très reproductible. Cela peut être dû à une internalisation du récepteur ou au fait que cette légère augmentation a déjà été montrée suffisante pour stimuler la migration des EPC¹⁵⁷. Une dose de 1 μ M d'adénosine était suffisante pour induire une augmentation du CXCR4. Cette dose est facilement atteignable dans le cœur ischémiq, sachant qu'elle peut atteindre 100 μ M dans le cœur durant un IM¹⁷¹. Ces résultats sont physiologiquement applicables et probables. Nous avons ensuite établi le profil d'expression des récepteurs à l'adénosine chez les EPC et leur régulation par l'adénosine. Le récepteur A3 à l'adénosine était le plus exprimé à la surface des EPC, suivi du récepteur A2A puis A2B, alors que le récepteur A1 n'était pas détectable. L'ajout d'adénosine a induit une augmentation de l'expression des récepteurs A2A et A2B à la surface cellulaire, alors qu'il diminuait l'expression du récepteur A3. Il avait déjà été prouvé dans des cellules inflammatoires que l'adénosine régula ses récepteurs après activation^{176, 276} et que les récepteurs à l'adénosine sont régulés par internalisation²⁷⁷. Par inhibition pharmacologique et par l'utilisation d'antagonistes, nous avons montré que l'augmentation du CXCR4 par l'adénosine implique majoritairement le récepteur A2B et partiellement le récepteur A2A.

Au niveau fonctionnel, nous avons montré qu'un prétraitement des EPC avec de l'adénosine stimulait leur migration vers un gradient de SDF-1 α , le ligand du CXCR4, ou vers un milieu conditionné de fibroblastes (ces cellules sont connues pour être la source majeure de SDF-1 α dans le cœur).

In vivo, nous avons observé une augmentation du marquage CXCR4 et ALDH2 chez des rats soumis à une ligature coronaire et traités par du CADO, un analogue stable de l'adénosine alors que chez les rats traités 8-SPT ou contrôles, ces marquages n'étaient pas significatifs (le marquage ALDH2 a été utilisé pour marquer les EPC¹⁴⁸). Cela indique une augmentation du recrutement des EPC dans le cœur au niveau de la zone bordante de l'IM, ce qui suggère que l'adénosine serait un stimulateur du recrutement des EPC jusqu'au cœur ischémique.

Le recrutement des EPC dans les rats traités CADO était accompagné d'une augmentation du marquage CD31, marqueur endothélial et du nombre de vaisseau, ce qui suggère que ce traitement a stimulé l'angiogenèse. Cet effet n'est pourtant pas clairement défini: provient-il des EPC recrutées après traitement CADO ou du CADO lui-même ? Il est connu que l'adénosine est pro-angiogénique et qu'un de ses effets indirects consiste à stimuler la production de VEGF par les cellules inflammatoires, par exemple²⁷⁸. Cependant, nos EPC sont incapables de produire du VEGF, stimulées ou pas par de l'adénosine. Au vu de ces résultats, il serait intéressant de tester in vivo les effets d'un agoniste du récepteur A2B dans un modèle de réparation cardiaque, ou encore de stimuler des EPC à l'adénosine et de les injecter à un rat après ligature pour voir si elles s'attachent au cœur et agissent sur l'angiogenèse.

Le miR-150 est un miARN très intéressant, dont l'implication dans les MCV a été mise en évidence récemment. Son expression dans le plasma serait prédictive d'un remodelage ventriculaire post-IM^{111, 112} et il est également lié à la fonction endothéliale^{68, 279}. Il est exprimé par différents types cellulaires tels que des cellules endothéliales d'artères coronaires humaines, des cellules endothéliales de veines ombilicales humaines et les EPC²³¹. Une publication récente a mis en évidence que l'ischémie inhibe l'expression du miR-150 dans des cellules mononucléaires issues de la moelle osseuse et active son gène cible: le CXCR4²⁵⁶. Nous avons donc décidé de tester si l'adénosine pouvait réguler le CXCR4 en modulant le miR-150. Nous avons montré qu'en condition hypoxique et en privation de sérum (pour mimer l'ischémie), l'adénosine augmente le CXCR4 et en parallèle diminue le miR-150. Nous avons également vérifié par test luciférase que le miR-150 cible le CXCR4. Au cours de cette étude, nous avons également prouvé par l'utilisation de l'actinomycine D qui bloque la transcription, que l'adénosine augmentait la transcription du CXCR4. Toutes ces données suggèrent que l'augmentation du CXCR4 par l'adénosine serait contrôlée par différentes voies impliquant à la fois la transcription du CXCR4 et le miR-150.

Nous avons ensuite modulé l'expression du miR-150 mais cela n'a pas affecté l'expression du CXCR4. Par contre, nous avons montré qu'inhiber le miR-150 a potentialisé l'augmentation du CXCR4 par l'adénosine et qu'augmenter le miR-150 a empêché l'augmentation du CXCR4 par l'adénosine. Ces données suggèrent qu'en ischémie, l'adénosine augmenterait le CXCR4 en diminuant le miR-150. Cependant, moduler le miR-150 n'a eu aucun effet sur la migration des EPC. Ce manque d'effet peut s'expliquer par le fait qu'il n'y a pas que l'axe CXCR4/SDF-1 α qui régule la migration des EPC, mais d'autres axes également tel que l'axe CCR1/MCP3¹⁶⁰.

Notre étude a pu confirmer l'expression du miR-150 dans les EPC et suggère un rôle d'inhibiteur de la migration au miR-150. Une autre étude a démontré que le miR-150 est sécrété par les monocytes et augmente la migration des cellules endothéliales microvasculaires⁶⁸, ce qui est opposé aux effets que nous avons démontrés. Cependant, il est connu que les miARN sont différentiellement exprimés entre types cellulaires et qu'ils ciblent énormément d'ARN différents, pouvant être impliqués dans le fonctionnement des EPC. Il faudrait pouvoir tester in vivo la capacité du miR-150 à réguler la réparation cardiaque.

En conclusion, nous avons pu démontrer que l'adénosine stimule la migration des EPC, en impliquant son récepteur A2B, une diminution du miR-150 et une augmentation du CXCR4. Ces effets sont accompagnés par une augmentation du recrutement des EPC et une augmentation de l'angiogenèse dans le cœur. Il serait intéressant de tester in vivo l'effet de l'inhibition du miR-150 couplée ou non à l'adénosine sur l'angiogenèse.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a contribué à la caractérisation de l'utilité des miARN à des fins diagnostiques/pronostiques mais également à des fins thérapeutiques dans la réparation post-IM.

Dans un premier axe, nous avons étudié dans plusieurs cohortes de patients le potentiel des miARN circulants comme biomarqueurs de différentes MCV:

- L'étude n°1 sur la cohorte APACE, qui est une étude multicentrique sur plus de 1000 patients à douleur thoracique, a démontré une très bonne capacité diagnostique du miR-208b, mais qui cependant ne dépassait pas celle de la hs-cTnT.

- L'étude n°2 sur la cohorte LUCKY, contenant plus de 500 patients avec IM, a permis de révéler une bonne capacité diagnostique du miR-499 chez les patients avec IM, mais qui ne dépassait encore une fois pas la hs-cTnT, et une capacité pronostique modeste des miR-208b et miR-499. De plus, cette étude a permis la mise en évidence d'associations entre les taux de miARN circulants et les facteurs de risque CV, en particulier entre le miR-208b et l'âge ou l'IMC.

- L'étude n°3 sur la cohorte LARIBOISIERE, contenant plus de 200 patients avec ICA, a montré une faible capacité diagnostique des miARN testés mais une bonne capacité du miR-423-5p à prédire la réhospitalisation des patients après ICA.

- L'étude n°4 sur la cohorte NORTHPOLE, contenant des patients traités par hypothermie après AC, a mis en évidence une capacité pronostique modeste des miR-21 et miR-122.

- L'étude n°5 sur la cohorte MINOS, contenant des patients en insuffisance rénale terminale traités par hémodialyse, a démontré que l'hémodialyse affecte le taux de miR-499 et que le miR-499 ne peut pas servir comme biomarqueur diagnostique de l'IM chez ces patients. Il s'agit ici d'une étude préliminaire et des études complémentaires sur plus de patients et d'autres miARN sont nécessaires pour permettre d'identifier un miARN pouvant servir au diagnostic de l'IM chez ces patients.

Pour l'axe 1, au terme de ce travail de thèse, il semble donc que:

- La capacité des miARN circulants pour le diagnostic des MCV semble limitée et n'arrive pas à dépasser les biomarqueurs classiquement utilisés en clinique. Elle semble actuellement encore limitée par le choix des miARN testés et par le temps de mesure des miARN.

Il semblerait que seule une approche multi-miARN pourrait surpasser les biomarqueurs classiques.

- La capacité pronostique des miARN circulants est moins étudiée mais semble être plus prometteuse.

Il reste cependant à mettre en place des études prospectives sur de grandes cohortes de patients afin de valider ces propos.

Pour l'axe 2, au terme de ce travail de thèse, nous avons mis en évidence que les profils d'expression des miARN permettent de différencier les EPC précoces des EPC tardives et nous avons identifié 2 cibles thérapeutiques potentielles, pour la réparation cardiaque post-IM:

- le miR-16 dont l'inhibition dans les EPC précoces augmentent les capacités régénératives de ces cellules (capacités paracrines et angiogéniques).

- le miR-150, qui intervient dans la migration et le recrutement de ces cellules lors d'un IM et qui pourrait être lié à l'augmentation du recrutement des EPC et de l'angiogenèse dans le cœur observée après traitement à l'adénosine.

Il serait intéressant d'étudier les effets du miR-16 et du miR-150, seuls ou en combinaison, sur le remodelage ventriculaire gauche post-IM chez l'animal.

BIBLIOGRAPHIE

1. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 2006;3:e442.
2. Erhardt L, Herlitz J, Bossaert L, Halinen M, Keltai M, Koster R, Marcassa C, Quinn T, van Weert H, Task Force on the management of chest p. Task force on the management of chest pain. *Eur Heart J.* 2002;23:1153-1176.
3. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, the Writing Group on behalf of the Joint ESCAAHAWHFTFFtUDoMI, Authors/Task Force Members C, Thygesen K, Alpert JS, White HD, Biomarker S, Jaffe AS, Katus HA, Apple FS, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2012;33:2551-2567.
4. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Kober L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, et al. Esc guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012 of the european society of cardiology. Developed in collaboration with the heart failure association (hfa) of the esc. *Eur Heart J.* 2012;33:1787-1847.
5. Zipes DP, Camm AJ, Borggrefe M, Buxton AE, Chaitman B, Fromer M, Gregoratos G, Klein G, Moss AJ, Myerburg RJ, Priori SG, Quinones MA, Roden DM, Silka MJ, Tracy C, et al. Acc/aha/esc 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: A report of the american college of cardiology/american heart association task force and the european society of cardiology committee for practice guidelines (writing committee to develop guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death): Developed in collaboration with the european heart rhythm association and the heart rhythm society. *Circulation.* 2006;114:e385-484.
6. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The c. *Elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small rnas with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75:843-854.
7. Bartel DP. Micrnas: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116:281-297.
8. Cheng Y, Wang X, Yang J, Duan X, Yao Y, Shi X, Chen Z, Fan Z, Liu X, Qin S, Tang X, Zhang C. A translational study of urine mirnas in acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;53:668-676.
9. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, et al. Circulating micrnas as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:10513-10518.
10. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen JA, Heymans S, Schroen B. Circulating microrna-208b and microrna-

- 499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010;3:499-506.
11. van Rooij E, Olson EN. MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: Opportunities and obstacles. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11:860-872.
 12. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-967.
 13. Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ Res*. 2012;110:624-637.
 14. Tongers J, Losordo DW, Landmesser U. Stem and progenitor cell-based therapy in ischaemic heart disease: Promise, uncertainties, and challenges. *Eur Heart J*. 2011;32:1197-1206.
 15. Siddique A, Shantsila E, Lip GY, Varma C. Endothelial progenitor cells: What use for the cardiologist? *J Angiogenes Res*. 2010;2:6.
 16. Hein S, Scheffold T, Schaper J. Ischemia induces early changes to cytoskeletal and contractile proteins in diseased human myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1995;110:89-98.
 17. Mendis S, Puska P, Norrving B, World Health Organization., World Heart Federation., World Stroke Organization. *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*. Geneva: World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization; 2011.
 18. Thygesen K, Mair J, Katus H, Plebani M, Venge P, Collinson P, Lindahl B, Giannitsis E, Hasin Y, Galvani M, Tubaro M, Alpert JS, Biasucci LM, Koenig W, Mueller C, et al. Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. *Eur Heart J*. 2010;31:2197-2204.
 19. Reichlin T, Hochholzer W, Bassetti S, Steuer S, Stelzig C, Hartwiger S, Biedert S, Schaub N, Buerge C, Potocki M, Noveanu M, Breidthardt T, Twerenbold R, Winkler K, Bingisser R, et al. Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. *N Engl J Med*. 2009;361:858-867.
 20. Keller T, Zeller T, Peetz D, Tzikas S, Roth A, Czyz E, Bickel C, Baldus S, Warnholtz A, Frohlich M, Sinning CR, Eleftheriadis MS, Wild PS, Schnabel RB, Lubos E, et al. Sensitive troponin i assay in early diagnosis of acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2009;361:868-877.
 21. Haaf P, Drexler B, Reichlin T, Twerenbold R, Reiter M, Meissner J, Schaub N, Stelzig C, Freese M, Heinzelmann A, Meune C, Balmelli C, Freidank H, Winkler K, Denhaerynck K, et al. High-sensitivity cardiac troponin in the distinction of acute myocardial infarction from acute cardiac noncoronary artery disease. *Circulation*. 2012;126:31-40.
 22. Twerenbold R, Jaffe A, Reichlin T, Reiter M, Mueller C. High-sensitive troponin t measurements: What do we gain and what are the challenges? *Eur Heart J*. 2012;33:579-586.
 23. Reiter M, Twerenbold R, Reichlin T, Haaf P, Peter F, Meissner J, Hochholzer W, Stelzig C, Freese M, Heinisch C, Breidthardt T, Freidank H, Winkler K, Campodarve

- I, Gea J, et al. Early diagnosis of acute myocardial infarction in the elderly using more sensitive cardiac troponin assays. *Eur Heart J*. 2011;32:1379-1389.
24. Dierkes J, Domrose U, Westphal S, Ambrosch A, Bosselmann HP, Neumann KH, Luley C. Cardiac troponin t predicts mortality in patients with end-stage renal disease. *Circulation*. 2000;102:1964-1969.
 25. McLaurin MD, Apple FS, Voss EM, Herzog CA, Sharkey SW. Cardiac troponin i, cardiac troponin t, and creatine kinase mb in dialysis patients without ischemic heart disease: Evidence of cardiac troponin t expression in skeletal muscle. *Clin Chem*. 1997;43:976-982.
 26. Wang AY, Lai KN. Use of cardiac biomarkers in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:1643-1652.
 27. Hamm CW, Giannitsis E, Katus HA. Cardiac troponin elevations in patients without acute coronary syndrome. *Circulation*. 2002;106:2871-2872.
 28. Freda BJ, Tang WH, Van Lente F, Peacock WF, Francis GS. Cardiac troponins in renal insufficiency: Review and clinical implications. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:2065-2071.
 29. Fredericks S, Chang R, Gregson H, Bewick M, Collinson PO, Gaze D, Carter ND, Holt DW. Circulating cardiac troponin-t in patients before and after renal transplantation. *Clin Chim Acta*. 2001;310:199-203.
 30. Thygesen K, Alpert JS, White HD, Jaffe AS, Apple FS, Galvani M, Katus HA, Newby LK, Ravkilde J, Chaitman B, Clemmensen PM, Dellborg M, Hod H, Porela P, Underwood R, et al. Universal definition of myocardial infarction. *Circulation*. 2007;116:2634-2653.
 31. Normann J, Mueller M, Biener M, Vafaie M, Katus HA, Giannitsis E. Effect of older age on diagnostic and prognostic performance of high-sensitivity troponin t in patients presenting to an emergency department. *Am Heart J*. 2012;164:698-705.
 32. Talwar S, Squire IB, Downie PF, McCullough AM, Campton MC, Davies JE, Barnett DB, Ng LL. Profile of plasma n-terminal proBNP following acute myocardial infarction; correlation with left ventricular systolic dysfunction. *Eur Heart J*. 2000;21:1514-1521.
 33. Authors/Task Force M, Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP, Lundqvist CB, Borger MA, Di Mario C, Dickstein K, Ducrocq G, Fernandez-Aviles F, Gershlick AH, Giannuzzi P, Halvorsen S, Huber K, et al. Esc guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with st-segment elevation: The task force on the management of st-segment elevation acute myocardial infarction of the european society of cardiology (esc). *Eur Heart J*. 2012;33:2569-2619.
 34. Mebazaa A, Gheorghide M, Pina IL, Harjola VP, Hollenberg SM, Follath F, Rhodes A, Plaisance P, Roland E, Nieminen M, Komajda M, Parkhomenko A, Masip J, Zannad F, Filippatos G. Practical recommendations for prehospital and early in-hospital management of patients presenting with acute heart failure syndromes. *Crit Care Med*. 2008;36:S129-139.
 35. Kelder JC, Cramer MJ, van Wijngaarden J, van Tooren R, Mosterd A, Moons KG, Lammers JW, Cowie MR, Grobbee DE, Hoes AW. The diagnostic value of physical

- examination and additional testing in primary care patients with suspected heart failure. *Circulation*. 2011;124:2865-2873.
36. Daniels LB, Clopton P, Bhalla V, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, Omland T, Storrow AB, Abraham WT, Wu AH, Steg PG, Westheim A, Knudsen CW, et al. How obesity affects the cut-points for b-type natriuretic peptide in the diagnosis of acute heart failure. Results from the breathing not properly multinational study. *Am Heart J*. 2006;151:999-1005.
 37. Rutten FH, Moons KG, Cramer MJ, Grobbee DE, Zuithoff NP, Lammers JW, Hoes AW. Recognising heart failure in elderly patients with stable chronic obstructive pulmonary disease in primary care: Cross sectional diagnostic study. *BMJ*. 2005;331:1379.
 38. Hawkins NM, Petrie MC, Jhund PS, Chalmers GW, Dunn FG, McMurray JJ. Heart failure and chronic obstructive pulmonary disease: Diagnostic pitfalls and epidemiology. *Eur J Heart Fail*. 2009;11:130-139.
 39. Ross JS, Chen J, Lin Z, Bueno H, Curtis JP, Keenan PS, Normand SL, Schreiner G, Spertus JA, Vidan MT, Wang Y, Wang Y, Krumholz HM. Recent national trends in readmission rates after heart failure hospitalization. *Circ Heart Fail*. 2010;3:97-103.
 40. Heidenreich PA, Sahay A, Kapoor JR, Pham MX, Massie B. Divergent trends in survival and readmission following a hospitalization for heart failure in the veterans affairs health care system 2002 to 2006. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56:362-368.
 41. Ketchum ES, Levy WC. Establishing prognosis in heart failure: A multimarker approach. *Prog Cardiovasc Dis*. 2011;54:86-96.
 42. Lassus J, Gayat E, Mueller C, Peacock WF, Spinar J, Harjola VP, van Kimmenade R, Pathak A, Mueller T, Disomma S, Metra M, Pascual-Figal D, Laribi S, Logeart D, Nouira S, et al. Incremental value of biomarkers to clinical variables for mortality prediction in acutely decompensated heart failure: The multinational observational cohort on acute heart failure (moca) study. *Int J Cardiol*. 2013
 43. Atwood C, Eisenberg MS, Herlitz J, Rea TD. Incidence of ems-treated out-of-hospital cardiac arrest in europe. *Resuscitation*. 2005;67:75-80.
 44. Meaney PA, Nadkarni VM, Kern KB, Indik JH, Halperin HR, Berg RA. Rhythms and outcomes of adult in-hospital cardiac arrest. *Crit Care Med*. 2010;38:101-108.
 45. Nielsen N, Hovdenes J, Nilsson F, Rubertsson S, Stammet P, Sunde K, Valsson F, Wanscher M, Friberg H. Outcome, timing and adverse events in therapeutic hypothermia after out-of-hospital cardiac arrest. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2009;53:926-934.
 46. Nolan JP, Soar J, Zideman DA, Biarent D, Bossaert LL, Deakin C, Koster RW, Wyllie J, Bottiger B. European resuscitation council guidelines for resuscitation 2010 section 1. Executive summary. *Resuscitation*. 2010;81:1219-1276.
 47. Mayer SA. Outcome prediction after cardiac arrest: New game, new rules. *Neurology*. 2011;77:614-615.
 48. Stammet P, Devaux Y, Azuaje F, Werer C, Lorang C, Gilson G, Max M. Assessment of procalcitonin to predict outcome in hypothermia-treated patients after cardiac arrest. *Crit Care Res Pract*. 2011;2011:631062.

49. Hayashida H, Kaneko T, Kasaoka S, Oshima C, Miyauchi T, Fujita M, Oda Y, Tsuruta R, Maekawa T. Comparison of the predictability of neurological outcome by serum procalcitonin and glial fibrillary acidic protein in postcardiac-arrest patients. *Neurocrit Care*. 2010;12:252-257.
50. Reisinger J, Hollinger K, Lang W, Steiner C, Winter T, Zeindlhofer E, Mori M, Schiller A, Lindorfer A, Wiesinger K, Siostrzonek P. Prediction of neurological outcome after cardiopulmonary resuscitation by serial determination of serum neuron-specific enolase. *Eur Heart J*. 2007;28:52-58.
51. Latronico MV, Condorelli G. Rna silencing: Small rna-mediated posttranscriptional regulation of mrna and the implications for heart electrophysiology. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2009;20:230-237.
52. Sibley CR, Seow Y, Saayman S, Dijkstra KK, El Andaloussi S, Weinberg MS, Wood MJ. The biogenesis and characterization of mammalian micrnas of mirtron origin. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:438-448.
53. Orom UA, Nielsen FC, Lund AH. Microrna-10a binds the 5'utr of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell*. 2008;30:460-471.
54. Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. Micrnas to nanog, oct4 and sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*. 2008;455:1124-1128.
55. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: Micrnas can up-regulate translation. *Science*. 2007;318:1931-1934.
56. Hwang HW, Wentzel EA, Mendell JT. A hexanucleotide element directs microrna nuclear import. *Science*. 2007;315:97-100.
57. Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholakh H, Melamed N, Bentwich Z, Hod M, Goren Y, Chajut A. Serum micrnas are promising novel biomarkers. *PLoS One*. 2008;3:e3148.
58. Gupta SK, Bang C, Thum T. Circulating micrnas as biomarkers and potential paracrine mediators of cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010;3:484-488.
59. Zhu H, Fan GC. Extracellular/circulating micrnas and their potential role in cardiovascular disease. *Am J Cardiovasc Dis*. 2011;1:138-149.
60. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB. Detection of microrna expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS ONE*. 2008;3:e3694.
61. Akao Y, Iio A, Itoh T, Noguchi S, Itoh Y, Ohtsuki Y, Naoe T. Microvesicle-mediated rna molecule delivery system using monocytes/macrophages. *Mol Ther*. 2011;19:395-399.
62. Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan ML, Karlsson JM, Baty CJ, Gibson GA, Erdos G, Wang Z, Milosevic J, Tkacheva OA, Divito SJ, Jordan R, Lyons-Weiler J, et al. Mechanism of transfer of functional micrnas between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*. 2012;119:756-766.

63. Meckes DG, Jr., Shair KH, Marquitz AR, Kung CP, Edwards RH, Raab-Traub N. Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:20370-20375.
64. Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, Hristov M, Koppel T, Jahantigh MN, Lutgens E, Wang S, Olson EN, Schober A, Weber C. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces cxcl12-dependent vascular protection. *Sci Signal*. 2009;2:ra81.
65. Gibbins DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol*. 2009;11:1143-1149.
66. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:5003-5008.
67. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*. 2011;13:423-433.
68. Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, Sun F, Lu J, Yin Y, Cai X, Sun Q, Wang K, Ba Y, Wang Q, Wang D, et al. Secreted monocytic mir-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell*. 2010;39:133-144.
69. Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL, de Gruijl TD, Wurdinger T, Middeldorp JM. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:6328-6333.
70. Kumarswamy R, Thum T. Non-coding RNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Circ Res*. 2013;113:676-689.
71. Whitworth JA, World Health Organization ISoHWG. 2003 world health organization (who)/international society of hypertension (ish) statement on management of hypertension. *J Hypertens*. 2003;21:1983-1992.
72. Li S, Zhu J, Zhang W, Chen Y, Zhang K, Popescu LM, Ma X, Lau WB, Rong R, Yu X, Wang B, Li Y, Xiao C, Zhang M, Wang S, et al. Signature microRNA expression profile of essential hypertension and its novel link to human cytomegalovirus infection. *Circulation*. 2011;124:175-184.
73. Karolina DS, Tavintharan S, Armugam A, Sepramaniam S, Pek SL, Wong MT, Lim SC, Sum CF, Jeyaseelan K. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:E2271-2276.
74. Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM, Bang C, Bauersachs J, Bethmann K, Kempf T, Wollert KC, Thum T. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51:872-875.
75. Olivieri F, Antonicelli R, Lorenzi M, D'Alessandra Y, Lazzarini R, Santini G, Spazzafumo L, Lisa R, La Sala L, Galeazzi R, Recchioni R, Testa R, Pompilio G, Capogrossi MC, Procopio AD. Diagnostic potential of circulating mir-499-5p in elderly patients with acute non ST-elevation myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2013;167:531-536.

76. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Bonora E, Shah A, Willeit J, Mayr M. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial mir-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res*. 2010;107:810-817.
77. Kong L, Zhu J, Han W, Jiang X, Xu M, Zhao Y, Dong Q, Pang Z, Guan Q, Gao L, Zhao J, Zhao L. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: A clinical study. *Acta Diabetol*. 2011;48:61-69.
78. Caporali A, Meloni M, Vollenkle C, Bonci D, Sala-Newby GB, Addis R, Spinetti G, Losa S, Masson R, Baker AH, Agami R, le Sage C, Condorelli G, Madeddu P, Martelli F, et al. Deregulation of microRNA-503 contributes to diabetes mellitus-induced impairment of endothelial function and reparative angiogenesis after limb ischemia. *Circulation*. 2011;123:282-291.
79. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, Weber M, Hamm CW, Roxel T, Muller-Ardogan M, Bonauer A, Zeiher AM, Dimmeler S. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res*. 2010;107:677-684.
80. Gao W, He HW, Wang ZM, Zhao H, Lian XQ, Wang YS, Zhu J, Yan JJ, Zhang DG, Yang ZJ, Wang LS. Plasma levels of lipometabolism-related mir-122 and mir-370 are increased in patients with hyperlipidemia and associated with coronary artery disease. *Lipids Health Dis*. 2012;11:55.
81. Sun X, Zhang M, Sanagawa A, Mori C, Ito S, Iwaki S, Satoh H, Fujii S. Circulating microRNA-126 in patients with coronary artery disease: Correlation with ldl cholesterol. *Thromb J*. 2012;10:16.
82. Baggish AL, Hale A, Weiner RB, Lewis GD, Systrom D, Wang F, Wang TJ, Chan SY. Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *J Physiol*. 2011;589:3983-3994.
83. Bye A, Rosjo H, Aspenes ST, Condorelli G, Omland T, Wisloff U. Circulating microRNAs and aerobic fitness--the hunt-study. *PLoS ONE*. 2013;8:e57496.
84. Banzet S, Chennaoui M, Girard O, Racinais S, Drogou C, Chalabi H, Koulmann N. Changes in circulating microRNAs levels with exercise modality. *J Appl Physiol (1985)*. 2013;115:1237-1244.
85. Takahashi K, Yokota S, Tatsumi N, Fukami T, Yokoi T, Nakajima M. Cigarette smoking substantially alters plasma microRNA profiles in healthy subjects. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;272:154-160.
86. Fukushima Y, Nakanishi M, Nonogi H, Goto Y, Iwai N. Assessment of plasma miRNAs in congestive heart failure. *Circ J*. 2011;75:336-340.
87. Duttagupta R, Jiang R, Gollub J, Getts RC, Jones KW. Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PLoS ONE*. 2011;6:e20769.
88. Zampetaki A, Willeit P, Tilling L, Drozdov I, Prokopi M, Renard JM, Mayr A, Weger S, Schett G, Shah A, Boulanger CM, Willeit J, Chowienczyk PJ, Kiechl S, Mayr M. Prospective study on circulating microRNAs and risk of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60:290-299.

89. Oerlemans MI, Mosterd A, Dekker MS, de Vrey EA, van Mil A, Pasterkamp G, Doevendans PA, Hoes AW, Sluijter JP. Early assessment of acute coronary syndromes in the emergency department: The potential diagnostic value of circulating micrnas. *EMBO Mol Med*. 2012;4:1176-1185.
90. Gidlof O, Smith JG, Miyazu K, Gilje P, Spencer A, Blomquist S, Erlinge D. Circulating cardio-enriched micrnas are associated with long-term prognosis following myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord*. 2013;13:12.
91. Wang H, Peng W, Shen X, Huang Y, Ouyang X, Dai Y. Circulating levels of inflammation-associated mir-155 and endothelial-enriched mir-126 in patients with end-stage renal disease. *Braz J Med Biol Res*. 2012;45:1308-1314.
92. Wang H, Peng W, Ouyang X, Dai Y. Reduced circulating mir-15b is correlated with phosphate metabolism in patients with end-stage renal disease on maintenance hemodialysis. *Ren Fail*. 2012;34:685-690.
93. Martino F, Lorenzen J, Schmidt J, Schmidt M, Broll M, Gorzig Y, Kielstein JT, Thum T. Circulating micrnas are not eliminated by hemodialysis. *PLoS One*. 2012;7:e38269.
94. Roy S, Khanna S, Hussain SR, Biswas S, Azad A, Rink C, Gnyawali S, Shilo S, Nuovo GJ, Sen CK. Micrna expression in response to murine myocardial infarction: Mir-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovasc Res*. 2009;82:21-29.
95. Shi B, Guo Y, Wang J, Gao W. Altered expression of micrnas in the myocardium of rats with acute myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord*. 2010;10:11.
96. Kuwabara Y, Ono K, Horie T, Nishi H, Nagao K, Kinoshita M, Watanabe S, Baba O, Kojima Y, Shizuta S, Imai M, Tamura T, Kita T, Kimura T. Increased micrna-1 and micrna-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4:446-454.
97. Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, Qin YW, Jing Q. Circulating micrna: A novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J*. 2010;31:659-666.
98. Liebetrau C, Mollmann H, Dorr O, Szardien S, Troidl C, Willmer M, Voss S, Gaede L, Rixe J, Rolf A, Hamm C, Nef H. Release kinetics of circulating muscle-enriched micrnas in patients undergoing transcatheter ablation of septal hypertrophy. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:992-998.
99. Cheng Y, Tan N, Yang J, Liu X, Cao X, He P, Dong X, Qin S, Zhang C. A translational study of circulating cell-free micrna-1 in acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)*. 2010;119:87-95.
100. D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, Rubino M, Carena MC, Spazzafumo L, De Simone M, Micheli B, Biglioli P, Achilli F, Martelli F, Maggiolini S, et al. Circulating micrnas are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2010;31:2765-2773.
101. Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, Nishimura K, Hirokawa G, Goto Y, Nonogi H, Iwai N. Plasma micrna 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin Chem*. 2010;56:1183-1185.

102. Wang R, Li N, Zhang Y, Ran Y, Pu J. Circulating micrnas are promising novel biomarkers of acute myocardial infarction. *Intern Med.* 2011;50:1789-1795.
103. Li YQ, Zhang MF, Wen HY, Hu CL, Liu R, Wei HY, Ai CM, Wang G, Liao XX, Li X. Comparing the diagnostic values of circulating micrnas and cardiac troponin t in patients with acute myocardial infarction. *Clinics (Sao Paulo).* 2013;68:75-80.
104. Tijssen AJ, Pinto YM, Creemers EE. Circulating micrnas as diagnostic biomarkers for cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;303:H1085-1095.
105. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating micrnas: Novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res.* 2012;110:483-495.
106. Eitel I, Adams V, Dieterich P, Fuernau G, de Waha S, Desch S, Schuler G, Thiele H. Relation of circulating micrna-133a concentrations with myocardial damage and clinical prognosis in st-elevation myocardial infarction. *Am Heart J.* 2012;164:706-714.
107. Matsumoto S, Sakata Y, Nakatani D, Suna S, Mizuno H, Shimizu M, Usami M, Sasaki T, Sato H, Kawahara Y, Hamasaki T, Nanto S, Hori M, Komuro I. A subset of circulating micrnas are predictive for cardiac death after discharge for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;427:280-284.
108. Zile MR, Mehurg SM, Arroyo JE, Stroud RE, Desantis SM, Spinale FG. Relationship between the temporal profile of plasma micrna and left ventricular remodeling in patients following myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Genet.* 2011;4:614-619.
109. Matsumoto S, Sakata Y, Suna S, Nakatani D, Usami M, Hara M, Kitamura T, Hamasaki T, Nanto S, Kawahara Y, Komuro I. Circulating p53-responsive micrnas are predictive indicators of heart failure after acute myocardial infarction. *Circ Res.* 2013;113:322-326.
110. He F, Lv P, Zhao X, Wang X, Ma X, Meng W, Meng X, Dong S. Predictive value of circulating mir-328 and mir-134 for acute myocardial infarction. *Mol Cell Biochem.* 2014
111. Devaux Y, Vausort M, McCann GP, Zangrando J, Kelly D, Razvi N, Zhang L, Ng LL, Wagner DR, Squire IB. Micrna-150: A novel marker of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Genet.* 2013;6:290-298.
112. Devaux Y, Vausort M, McCann GP, Kelly D, Collignon O, Ng LL, Wagner DR, Squire IB. A panel of 4 micrnas facilitates the prediction of left ventricular contractility after acute myocardial infarction. *PLoS ONE.* 2013;8:e70644.
113. Ellis KL, Cameron VA, Troughton RW, Frampton CM, Ellmers LJ, Richards AM. Circulating micrnas as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients. *Eur J Heart Fail.* 2013;15:1138-1147.
114. Goren Y, Kushnir M, Zafrir B, Tabak S, Lewis BS, Amir O. Serum levels of micrnas in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2012;14:147-154.
115. Endo K, Naito Y, Ji X, Nakanishi M, Noguchi T, Goto Y, Nonogi H, Ma X, Weng H, Hirokawa G, Asada T, Kakinoki S, Yamaoka T, Fukushima Y, Iwai N. Micrna 210 as a biomarker for congestive heart failure. *Biol Pharm Bull.* 2013;36:48-54.

116. Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, Pinto YM. Mir423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res*. 2010;106:1035-1039.
117. Gilje P, Gidlof O, Rundgren M, Cronberg T, Al-Mashat M, Olde B, Friberg H, Erlinge D. The brain-enriched microRNA mir-124 in plasma predicts neurological outcome after cardiac arrest. *Crit Care*. 2014;18:R40.
118. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473:317-325.
119. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*. 2011;145:341-355.
120. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: Current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 2011;17:1410-1422.
121. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2002;53:31-47.
122. Swynghedauw B. [is adult cardiac myocyte still able to proliferate?]. *Med Sci (Paris)*. 2004;20:710-714.
123. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2001;344:1750-1757.
124. Matsumura K, Jeremy RW, Schaper J, Becker LC. Progression of myocardial necrosis during reperfusion of ischemic myocardium. *Circulation*. 1998;97:795-804.
125. Cohn JN. Critical review of heart failure: The role of left ventricular remodeling in the therapeutic response. *Clin Cardiol*. 1995;18:IV4-12.
126. Rutschow S, Li J, Schultheiss HP, Pauschinger M. Myocardial proteases and matrix remodeling in inflammatory heart disease. *Cardiovasc Res*. 2006;69:646-656.
127. Roussel L, Houle F, Chan C, Yao Y, Berube J, Olivenstein R, Martin JG, Huot J, Hamid Q, Ferri L, Rousseau S. Il-17 promotes p38 mapk-dependent endothelial activation enhancing neutrophil recruitment to sites of inflammation. *J Immunol*. 2010;184:4531-4537.
128. Zarpelon AC, Pinto LG, Cunha TM, Vieira SM, Carregaro V, Souza GR, Silva JS, Ferreira SH, Cunha FQ, Verri WA, Jr. Endothelin-1 induces neutrophil recruitment in adaptive inflammation via tnfa and cxcl1/cxcr2 in mice. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012;90:187-199.
129. Lindsey M, Wedin K, Brown MD, Keller C, Evans AJ, Smolen J, Burns AR, Rossen RD, Michael L, Entman M. Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation*. 2001;103:2181-2187.
130. van Hinsbergh VW, Koolwijk P. Endothelial sprouting and angiogenesis: Matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc Res*. 2008;78:203-212.
131. Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, Heymans S. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: A temporal and spatial window. *Cardiovasc Res*. 2006;69:604-613.

132. Liehn EA, Postea O, Curaj A, Marx N. Repair after myocardial infarction, between fantasy and reality: The role of chemokines. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58:2357-2362.
133. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386:671-674.
134. Feige JJ. [tumor angiogenesis: Recent progress and remaining challenges]. *Bull Cancer*. 2010;97:1305-1310.
135. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011;146:873-887.
136. Cochain C, Channon KM, Silvestre JS. Angiogenesis in the infarcted myocardium. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18:1100-1113.
137. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res*. 2005;65:550-563.
138. Zachary I. Vegf signalling: Integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans*. 2003;31:1171-1177.
139. Hodivala-Dilke KM, McHugh KP, Tsakiris DA, Rayburn H, Crowley D, Ullman-Cullere M, Ross FP, Collier BS, Teitelbaum S, Hynes RO. Beta3-integrin-deficient mice are a model for glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J Clin Invest*. 1999;103:229-238.
140. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: The state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*. 2007;25:2896-2902.
141. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2003;108:2511-2516.
142. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004;104:2752-2760.
143. Eggermann J, Kliche S, Jarmy G, Hoffmann K, Mayr-Beyrle U, Debatin KM, Waltenberger J, Beltinger C. Endothelial progenitor cell culture and differentiation in vitro: A methodological comparison using human umbilical cord blood. *Cardiovasc Res*. 2003;58:478-486.
144. Shantsila E, Watson T, Tse HF, Lip GY. New insights on endothelial progenitor cell subpopulations and their angiogenic properties. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:669-671.
145. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich R, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 2007;109:1801-1809.
146. Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasclogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:288-293.
147. Gnecci M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008;103:1204-1219.

148. Povsic TJ, Zavodni KL, Kelly FL, Zhu S, Goldschmidt-Clermont PJ, Dong C, Peterson ED. Circulating progenitor cells can be reliably identified on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:2243-2248.
149. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (topcare-ami). *Circulation*. 2002;106:3009-3017.
150. Fadini GP, Agostini C, Avogaro A. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature. *Atherosclerosis*. 2010;209:10-17.
151. Capoccia BJ, Robson DL, Levac KD, Maxwell DJ, Hohm SA, Neelamkavil MJ, Bell GI, Xenocostas A, Link DC, Piwnica-Worms D, Nolte JA, Hess DA. Revascularization of ischemic limbs after transplantation of human bone marrow cells with high aldehyde dehydrogenase activity. *Blood*. 2009;113:5340-5351.
152. Sondergaard CS, Hess DA, Maxwell DJ, Weinheimer C, Rosova I, Creer MH, Piwnica-Worms D, Kovacs A, Pedersen L, Nolte JA. Human cord blood progenitors with high aldehyde dehydrogenase activity improve vascular density in a model of acute myocardial infarction. *J Transl Med*. 2010;8:24.
153. Sen S, McDonald SP, Coates PT, Bonder CS. Endothelial progenitor cells: Novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond)*. 2011;120:263-283.
154. Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation*. 2004;110:3300-3305.
155. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through hif-1 induction of sdf-1. *Nat Med*. 2004;10:858-864.
156. Jin DK, Shido K, Kopp HG, Petit I, Shmelkov SV, Young LM, Hooper AT, Amano H, Avezilla ST, Heissig B, Hattori K, Zhang F, Hicklin DJ, Wu Y, Zhu Z, et al. Cytokine-mediated deployment of sdf-1 induces revascularization through recruitment of cxcr4+ hemangiocytes. *Nat Med*. 2006;12:557-567.
157. Mause SF, Ritzel E, Liehn EA, Hristov M, Bidzhekov K, Muller-Newen G, Soehnlein O, Weber C. Platelet microparticles enhance the vasoregenerative potential of angiogenic early outgrowth cells after vascular injury. *Circulation*. 2010;122:495-506.
158. Walter DH, Haendeler J, Reinhold J, Rochwalsky U, Seeger F, Honold J, Hoffmann J, Urbich C, Lehmann R, Arenzana-Seisdesdos F, Aicher A, Heeschen C, Fichtlscherer S, Zeiher AM, Dimmeler S. Impaired cxcr4 signaling contributes to the reduced neovascularization capacity of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Circ Res*. 2005;97:1142-1151.

159. Oh BJ, Kim DK, Kim BJ, Yoon KS, Park SG, Park KS, Lee MS, Kim KW, Kim JH. Differences in donor cxcr4 expression levels are correlated with functional capacity and therapeutic outcome of angiogenic treatment with endothelial colony forming cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;398:627-633.
160. Bousquenaud M, Schwartz C, Leonard F, Rolland-Turner M, Wagner D, Devaux Y. Monocyte chemotactic protein 3 is a homing factor for circulating angiogenic cells. *Cardiovasc Res.* 2012;94:519-525.
161. Lavoie JR, Stewart DJ. Genetically modified endothelial progenitor cells in the therapy of cardiovascular disease and pulmonary hypertension. *Curr Vasc Pharmacol.* 2012;10:289-299.
162. Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, Bugli AM, Bragotti LZ, Francolini G, Mauro E, Castoldi G, Ferrari R. Cd34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation.* 2004;110:1209-1212.
163. Alba AC, Delgado DH, Rao V, Walter S, Guyatt G, Ross HJ. Are endothelial progenitor cells a prognostic factor in patients with heart failure? *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2012;10:167-175.
164. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation.* 2001;103:2885-2890.
165. Lloyd HG, Deussen A, Wuppermann H, Schrader J. The transmethylation pathway as a source for adenosine in the isolated guinea-pig heart. *Biochem J.* 1988;252:489-494.
166. Antonioli L, Fornai M, Colucci R, Ghisu N, Tuccori M, Del Tacca M, Blandizzi C. Pharmacological modulation of adenosine system: Novel options for treatment of inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14:566-574.
167. Kroll K, Decking UK, Dreikorn K, Schrader J. Rapid turnover of the amp-adenosine metabolic cycle in the guinea pig heart. *Circ Res.* 1993;73:846-856.
168. Kumar V, Sharma A. Adenosine: An endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *Eur J Pharmacol.* 2009;616:7-15.
169. Wardas J. Potential role of adenosine a2a receptors in the treatment of schizophrenia. *Front Biosci.* 2008;13:4071-4096.
170. Schulte G, Fredholm BB. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal.* 2003;15:813-827.
171. Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets. *Exp Cell Res.* 2010;316:1284-1288.
172. Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International union of pharmacology. Xxv. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 2001;53:527-552.
173. Headrick JP, Hack B, Ashton KJ. Acute adenosinergic cardioprotection in ischemic-reperfused hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H1797-1818.
174. Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Muller CE. International union of basic and clinical pharmacology. Lxxxii. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol Rev.* 2011;63:1-34.

175. Jacobson KA, Gao ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5:247-264.
176. Ernens I, Rouy D, Velot E, Devaux Y, Wagner DR. Adenosine inhibits matrix metalloproteinase-9 secretion by neutrophils: Implication of a2a receptor and camp/pka/ca2+ pathway. *Circ Res.* 2006;99:590-597.
177. Velot E, Haas B, Leonard F, Ernens I, Rolland-Turner M, Schwartz C, Longrois D, Devaux Y, Wagner DR. Activation of the adenosine-a3 receptor stimulates matrix metalloproteinase-9 secretion by macrophages. *Cardiovasc Res.* 2008;80:246-254.
178. Leonard F, Devaux Y, Vausort M, Ernens I, Rolland-Turner M, Wagner DR. Adenosine modifies the balance between membrane and soluble forms of flt-1. *J Leukoc Biol.* 2011;90:199-204.
179. Wagner DR, McTiernan C, Sanders VJ, Feldman AM. Adenosine inhibits lipopolysaccharide-induced secretion of tumor necrosis factor-alpha in the failing human heart. *Circulation.* 1998;97:521-524.
180. Ryzhov S, Solenkova NV, Goldstein AE, Lamparter M, Fleenor T, Young PP, Greelish JP, Byrne JG, Vaughan DE, Biaggioni I, Hatzopoulos AK, Feoktistov I. Adenosine receptor-mediated adhesion of endothelial progenitors to cardiac microvascular endothelial cells. *Circ Res.* 2008;102:356-363.
181. Azuaje FJ, Wang H, Zheng H, Leonard F, Rolland-Turner M, Zhang L, Devaux Y, Wagner DR. Predictive integration of gene functional similarity and co-expression defines treatment response of endothelial progenitor cells. *BMC Syst Biol.* 2011;5:46.
182. Cordes KR, Srivastava D. MicroRNA regulation of cardiovascular development. *Circ Res.* 2009;104:724-732.
183. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004;431:350-355.
184. Fiedler J, Thum T. MicroRNAs in myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:201-205.
185. Shan ZX, Lin QX, Deng CY, Zhu JN, Mai LP, Liu JL, Fu YH, Liu XY, Li YX, Zhang YY, Lin SG, Yu XY. Mir-1/mir-206 regulate hsp60 expression contributing to glucose-mediated apoptosis in cardiomyocytes. *FEBS Lett.* 2010;584:3592-3600.
186. Terentyev D, Belevych AE, Terentyeva R, Martin MM, Malana GE, Kuhn DE, Abdellatif M, Feldman DS, Elton TS, Gyorke S. Mir-1 overexpression enhances ca(2+) release and promotes cardiac arrhythmogenesis by targeting pp2a regulatory subunit b56alpha and causing camkii-dependent hyperphosphorylation of ryr2. *Circ Res.* 2009;104:514-521.
187. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:18255-18260.
188. van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of mir-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:13027-13032.
189. Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A,

- Basson MA, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating map kinase signalling in fibroblasts. *Nature*. 2008;456:980-984.
190. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, Ivey KN, Bruneau BG, Stainier DY, Srivastava D. Mir-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell*. 2008;15:272-284.
191. Bostjancic E, Zidar N, Glavac D. MicroRNA microarray expression profiling in human myocardial infarction. *Dis Markers*. 2009;27:255-268.
192. Pan Z, Sun X, Shan H, Wang N, Wang J, Ren J, Feng S, Xie L, Lu C, Yuan Y, Zhang Y, Wang Y, Lu Y, Yang B. MicroRNA-101 inhibited postinfarct cardiac fibrosis and improved left ventricular compliance via the fbj osteosarcoma oncogene/transforming growth factor-beta1 pathway. *Circulation*. 2012;126:840-850.
193. Montgomery RL, Hullinger TG, Semus HM, Dickinson BA, Seto AG, Lynch JM, Stack C, Latimer PA, Olson EN, van Rooij E. Therapeutic inhibition of mir-208a improves cardiac function and survival during heart failure / clinical perspective. *Circulation*. 2011;124:1537-1547.
194. Thum T, Chau N, Bhat B, Gupta SK, Linsley PS, Bauersachs J, Engelhardt S. Comparison of different mir-21 inhibitor chemistries in a cardiac disease model. *J Clin Invest*. 2011;121:461-462; author reply 462-463.
195. Chen J, Huang ZP, Seok HY, Ding J, Kataoka M, Zhang Z, Hu X, Wang G, Lin Z, Wang S, Pu WT, Liao R, Wang DZ. Mir-17-92 cluster is required for and sufficient to induce cardiomyocyte proliferation in postnatal and adult hearts. *Circ Res*. 2013;112:1557-1566.
196. Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: Competitive inhibitors of small rnas in mammalian cells. *Nat Methods*. 2007;4:721-726.
197. Wang J, Song Y, Zhang Y, Xiao H, Sun Q, Hou N, Guo S, Wang Y, Fan K, Zhan D, Zha L, Cao Y, Li Z, Cheng X, Zhang Y, et al. Cardiomyocyte overexpression of mir-27b induces cardiac hypertrophy and dysfunction in mice. *Cell Res*. 2012;22:516-527.
198. Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, Qi X, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. MicroRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev*. 2008;22:3242-3254.
199. Care A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, Bang ML, Segnalini P, Gu Y, Dalton ND, Elia L, Latronico MV, Hoydal M, Autore C, Russo MA, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med*. 2007;13:613-618.
200. Matkovich SJ, Wang W, Tu Y, Eschenbacher WH, Dorn LE, Condorelli G, Diwan A, Nerbonne JM, Dorn GW, 2nd. MicroRNA-133a protects against myocardial fibrosis and modulates electrical repolarization without affecting hypertrophy in pressure-overloaded adult hearts. *Circ Res*. 2010;106:166-175.
201. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*. 2007;316:575-579.
202. Callis TE, Pandya K, Seok HY, Tang RH, Tatsuguchi M, Huang ZP, Chen JF, Deng Z, Gunn B, Shumate J, Willis MS, Selzman CH, Wang DZ. MicroRNA-208a is a

- regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest*. 2009;119:2772-2786.
203. Wang JX, Jiao JQ, Li Q, Long B, Wang K, Liu JP, Li YR, Li PF. Mir-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nat Med*. 2011;17:71-78.
 204. Pan Z, Sun X, Ren J, Li X, Gao X, Lu C, Zhang Y, Sun H, Wang Y, Wang H, Wang J, Xie L, Lu Y, Yang B. Mir-1 exacerbates cardiac ischemia-reperfusion injury in mouse models. *PLoS ONE*. 2012;7:e50515.
 205. Karakikes I, Chanean AH, Kang S, Mukete BN, Jeong D, Zhang S, Hajjar RJ, Lebeche D. Therapeutic cardiac-targeted delivery of mir-1 reverses pressure overload-induced cardiac hypertrophy and attenuates pathological remodeling. *J Am Heart Assoc*. 2013;2:e000078.
 206. Cardin S, Guasch E, Luo X, Naud P, Le Quang K, Shi Y, Tardif JC, Comtois P, Nattel S. Role for microRNA-21 in atrial profibrillatory fibrotic remodeling associated with experimental postinfarction heart failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012;5:1027-1035.
 207. Adam O, Lohfelme B, Thum T, Gupta SK, Puhl SL, Schafers HJ, Bohm M, Laufs U. Role of mir-21 in the pathogenesis of atrial fibrosis. *Basic Res Cardiol*. 2012;107:278.
 208. Patrick DM, Montgomery RL, Qi X, Obad S, Kauppinen S, Hill JA, van Rooij E, Olson EN. Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in mice. *J Clin Invest*. 2010;120:3912-3916.
 209. Dong S, Cheng Y, Yang J, Li J, Liu X, Wang X, Wang D, Krall TJ, Delphin ES, Zhang C. MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction. *J Biol Chem*. 2009;284:29514-29525.
 210. Lin Z, Murtaza I, Wang K, Jiao J, Gao J, Li PF. Mir-23a functions downstream of nfatc3 to regulate cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:12103-12108.
 211. Boon RA, Iekushi K, Lechner S, Seeger T, Fischer A, Heydt S, Kaluza D, Treguer K, Carmona G, Bonauer A, Horrevoets AJ, Didier N, Girmatsion Z, Biliczki P, Ehrlich JR, et al. MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature*. 2013;495:107-110.
 212. Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, Burchfield J, Fox H, Doebele C, Ohtani K, Chavakis E, Potente M, Tjwa M, Urbich C, Zeiher AM, et al. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science*. 2009;324:1710-1713.
 213. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. The endothelial-specific microRNA mir-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell*. 2008;15:261-271.
 214. Hu S, Huang M, Li Z, Jia F, Ghosh Z, Lijkwan MA, Fasanaro P, Sun N, Wang X, Martelli F, Robbins RC, Wu JC. MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease. *Circulation*. 2010;122:S124-131.

215. Wang K, Liu F, Zhou LY, Ding SL, Long B, Liu CY, Sun T, Fan YY, Sun L, Li PF. Mir-874 regulates myocardial necrosis by targeting caspase-8. *Cell Death Dis.* 2013;4:e709.
216. Hullinger TG, Montgomery RL, Seto AG, Dickinson BA, Semus HM, Lynch JM, Dalby CM, Robinson K, Stack C, Latimer PA, Hare JM, Olson EN, van Rooij E. Inhibition of mir-15 protects against cardiac ischemic injury. *Circ Res.* 2012;110:71-81.
217. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Johnson BA, Grinsfelder D, Canseco D, Mammen PP, Rothermel BA, Olson EN, Sadek HA. Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the mir-15 family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:187-192.
218. Bernardo BC, Gao X-M, Winbanks CE, Boey EJH, Tham YK, Kiriazis H, Gregorevic P, Obad S, Kauppinen S, Du X-J, Lin RCY, McMullen JR. Therapeutic inhibition of the mir-34 family attenuates pathological cardiac remodeling and improves heart function. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012;109:17615-17620.
219. Ucar A, Gupta SK, Fiedler J, Erikci E, Kardasinski M, Batkai S, Dangwal S, Kumarswamy R, Bang C, Holzmann A, Remke J, Caprio M, Jentsch C, Engelhardt S, Geisendorf S, et al. The mirna-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy. *Nat Commun.* 2012;3:1078.
220. Xin M, Small EM, Sutherland LB, Qi X, McAnally J, Plato CF, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. MicroRNAs mir-143 and mir-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury. *Genes Dev.* 2009;23:2166-2178.
221. Wang X, Zhu H, Zhang X, Liu Y, Chen J, Medvedovic M, Li H, Weiss MJ, Ren X, Fan GC. Loss of the mir-144/451 cluster impairs ischaemic preconditioning-mediated cardioprotection by targeting rac-1. *Cardiovasc Res.* 2012;94:379-390.
222. Yin C, Salloum FN, Kukreja RC. A novel role of microRNA in late preconditioning: Upregulation of endothelial nitric oxide synthase and heat shock protein 70. *Circ Res.* 2009;104:572-575.
223. Fiedler J, Jazbutyte V, Kirchmaier BC, Gupta SK, Lorenzen J, Hartmann D, Galuppo P, Kneitz S, Pena JT, Sohn-Lee C, Loyer X, Soutschek J, Brand T, Tuschl T, Heineke J, et al. MicroRNA-24 regulates vascularity after myocardial infarction. *Circulation.* 2011;124:720-730.
224. Zou J, Li WQ, Li Q, Li XQ, Zhang JT, Liu GQ, Chen J, Qiu XX, Tian FJ, Wang ZZ, Zhu N, Qin YW, Shen B, Liu TX, Jing Q. Two functional microRNA-126s repress a novel target gene p21-activated kinase 1 to regulate vascular integrity in zebrafish. *Circ Res.* 2011;108:201-209.
225. Hinkel R, Penzkofer D, Zuhlke S, Fischer A, Husada W, Xu QF, Baloch E, van Rooij E, Zeiher AM, Kupatt C, Dimmeler S. Inhibition of microRNA-92a protects against ischemia/reperfusion injury in a large-animal model. *Circulation.* 2013;128:1066-1075.
226. Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, van der Meer AJ, Patick AK, Chen A, Zhou Y, Persson R, King BD, Kauppinen S, Levin

- AA, Hodges MR. Treatment of hec infection by targeting microrna. *N Engl J Med*. 2013;368:1685-1694.
227. Grueter CE, van Rooij E, Johnson BA, DeLeon SM, Sutherland LB, Qi X, Gautron L, Elmquist JK, Bassel-Duby R, Olson EN. A cardiac microrna governs systemic energy homeostasis by regulation of med13. *Cell*. 2012;149:671-683.
228. Heinrich EM, Dimmeler S. Micrnas and stem cells: Control of pluripotency, reprogramming, and lineage commitment. *Circ Res*. 2012;110:1014-1022.
229. Jakob P, Landmesser U. Role of micrnas in stem/progenitor cells and cardiovascular repair. *Cardiovasc Res*. 2012;93:614-622.
230. Spinetti G, Fortunato O, Caporali A, Shantikumar S, Marchetti M, Meloni M, Descamps B, Floris I, Sangalli E, Vono R, Faglia E, Specchia C, Pintus G, Madeddu P, Emanuelli C. Microrna-15a and microrna-16 impair human circulating proangiogenic cell functions and are increased in the proangiogenic cells and serum of patients with critical limb ischemia. *Circ Res*. 2013;112:335-346.
231. Fleissner F, Jazbutyte V, Fiedler J, Gupta SK, Yin X, Xu Q, Galuppo P, Kneitz S, Mayr M, Ertl G, Bauersachs J, Thum T. Asymmetric dimethylarginine impairs angiogenic progenitor cell function in patients with coronary artery disease through a microrna-21-dependent mechanism. *Circ Res*. 2010;107:138-143.
232. Cheng CC, Lo HH, Huang TS, Cheng YC, Chang ST, Chang SJ, Wang HW. Genetic module and mirnome trait analyses reflect the distinct biological features of endothelial progenitor cells from different anatomic locations. *BMC Genomics*. 2012;13:447.
233. Meng S, Cao J, Wang L, Zhou Q, Li Y, Shen C, Zhang X, Wang C. Microrna 107 partly inhibits endothelial progenitor cells differentiation via hif-1beta. *PLoS ONE*. 2012;7:e40323.
234. Zhang Q, Kandic I, Kutryk MJ. Dysregulation of angiogenesis-related micrnas in endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;405:42-46.
235. Qiang L, Hong L, Ningfu W, Huaihong C, Jing W. Expression of mir-126 and mir-508-5p in endothelial progenitor cells is associated with the prognosis of chronic heart failure patients. *Int J Cardiol*. 2013
236. Jakob P, Doerries C, Briand S, Mocharla P, Krankel N, Besler C, Mueller M, Manes C, Templin C, Baltes C, Rudin M, Adams H, Wolfrum M, Noll G, Ruschitzka F, et al. Loss of angiomiR-126 and 130a in angiogenic early outgrowth cells from patients with chronic heart failure: Role for impaired in vivo neovascularization and cardiac repair capacity. *Circulation*. 2012;126:2962-2975.
237. van Solingen C, de Boer HC, Bijkerk R, Monge M, van Oeveren-Rietdijk AM, Seghers L, de Vries MR, van der Veer EP, Quax PH, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ. Microrna-126 modulates endothelial sdf-1 expression and mobilization of sca-1(+)/lin(-) progenitor cells in ischaemia. *Cardiovasc Res*. 2011;92:449-455.
238. Mocharla P, Briand S, Giannotti G, Dorries C, Jakob P, Paneni F, Luscher T, Landmesser U. Angiomir-126 expression and secretion from circulating cd34(+) and

- cd14(+) pbmcs: Role for proangiogenic effects and alterations in type 2 diabetics. *Blood*. 2013;121:226-236.
239. Alaiti MA, Ishikawa M, Masuda H, Simon DI, Jain MK, Asahara T, Costa MA. Up-regulation of mir-210 by vascular endothelial growth factor in ex vivo expanded cd34+ cells enhances cell-mediated angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2012;16:2413-2421.
240. Minami Y, Satoh M, Maesawa C, Takahashi Y, Tabuchi T, Itoh T, Nakamura M. Effect of atorvastatin on microrna 221 / 222 expression in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest*. 2009;39:359-367.
241. Zhang X, Mao H, Chen JY, Wen S, Li D, Ye M, Lv Z. Increased expression of microrna-221 inhibits pak1 in endothelial progenitor cells and impairs its function via c-raf/mek/erk pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;431:404-408.
242. Zhao T, Li J, Chen AF. Microrna-34a induces endothelial progenitor cell senescence and impedes its angiogenesis via suppressing silent information regulator 1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299:E110-116.
243. Zhu S, Deng S, Ma Q, Zhang T, Jia C, Zhuo D, Yang F, Wei J, Wang L, Dykxhoorn DM, Hare JM, Goldschmidt-Clermont PJ, Dong C. Microrna-10a* and microrna-21 modulate endothelial progenitor cell senescence via suppressing high-mobility group a2. *Circ Res*. 2013;112:152-164.
244. Plummer PN, Freeman R, Taft RJ, Vider J, Sax M, Umer BA, Gao D, Johns C, Mattick JS, Wilton SD, Ferro V, McMillan NA, Swarbrick A, Mittal V, Mellick AS. Micrnas regulate tumor angiogenesis modulated by endothelial progenitor cells. *Cancer Res*. 2013;73:341-352.
245. Cantaluppi V, Biancone L, Figliolini F, Beltramo S, Medica D, Deregibus MC, Galimi F, Romagnoli R, Salizzoni M, Tetta C, Segoloni GP, Camussi G. Microvesicles derived from endothelial progenitor cells enhance neoangiogenesis of human pancreatic islets. *Cell Transplant*. 2012;21:1305-1320.
246. Cantaluppi V, Gatti S, Medica D, Figliolini F, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A, Biancone L, Tetta C, Camussi G. Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microrna-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int*. 2012;82:412-427.
247. Raghino A, Cantaluppi V, Grange C, Vitillo L, Fop F, Biancone L, Deregibus MC, Tetta C, Segoloni GP, Camussi G. Endothelial progenitor cell-derived microvesicles improve neovascularization in a murine model of hindlimb ischemia. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2012;25:75-85.
248. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: A nonparametric approach. *Biometrics*. 1988;44:837-845.
249. Pencina MJ, D'Agostino RB, Sr., D'Agostino RB, Jr., Vasan RS. Evaluating the added predictive ability of a new marker: From area under the roc curve to reclassification and beyond. *Stat Med*. 2008;27:157-172; discussion 207-112.

250. Pencina MJ, D'Agostino RB, Sr., Steyerberg EW. Extensions of net reclassification improvement calculations to measure usefulness of new biomarkers. *Stat Med*. 2011;30:11-21.
251. Omland T, de Lemos JA, Sabatine MS, Christophi CA, Rice MM, Jablonski KA, Tjora S, Domanski MJ, Gersh BJ, Rouleau JL, Pfeffer MA, Braunwald E. A sensitive cardiac troponin t assay in stable coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2009;361:2538-2547.
252. Ji X, Takahashi R, Hiura Y, Hirokawa G, Fukushima Y, Iwai N. Plasma mir-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem*. 2009;55:1944-1949.
253. Raffi S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*. 2003;9:702-712.
254. Lipinski MJ, Biondi-Zoccai GG, Abbate A, Khianey R, Sheiban I, Bartunek J, Vanderheyden M, Kim HS, Kang HJ, Strauer BE, Vetrovec GW. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: A collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:1761-1767.
255. Losordo DW, Schatz RA, White CJ, Udelson JE, Veereshwarayya V, Durgin M, Poh KK, Weinstein R, Kearney M, Chaudhry M, Burg A, Eaton L, Heyd L, Thorne T, Shturman L, et al. Intramyocardial transplantation of autologous cd34+ stem cells for intractable angina: A phase i/ii double-blind, randomized controlled trial. *Circulation*. 2007;115:3165-3172.
256. Tano N, Kim HW, Ashraf M. MicroRNA-150 regulates mobilization and migration of bone marrow-derived mononuclear cells by targeting cxcr4. *PLoS One*. 2011;6:e23114.
257. Olivieri F, Antonicelli R, Capogrossi MC, Procopio AD. Circulating micrornas (mirs) for diagnosing acute myocardial infarction: An exciting challenge. *Int J Cardiol*. 2013;167:3028-3029.
258. Roy S, Soh JH, Gao Z. A microfluidic-assisted microarray for ultrasensitive detection of mirna under an optical microscope. *Lab Chip*. 2011;11:1886-1894.
259. Zhu H, Fan GC. Role of micrornas in the reperfused myocardium towards post-infarct remodelling. *Cardiovasc Res*. 2012;94:284-292.
260. Dickinson BA, Semus HM, Montgomery RL, Stack C, Latimer PA, Lewton SM, Lynch JM, Hullinger TG, Seto AG, van Rooij E. Plasma micrornas serve as biomarkers of therapeutic efficacy and disease progression in hypertension-induced heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2013;15:650-659.
261. Willeit P, Zampetaki A, Dudek K, Kaudewitz D, King A, Kirkby NS, Crosby-Nwaobi R, Prokopi M, Drozdov I, Langley SR, Sivaprasad S, Markus HS, Mitchell JA, Warner TD, Kiechl S, et al. Circulating micrornas as novel biomarkers for platelet activation. *Circ Res*. 2013;112:595-600.
262. de Boer HC, van Solingen C, Prins J, Duijs JM, Huisman MV, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ. Aspirin treatment hampers the use of plasma microrna-126 as a biomarker for the progression of vascular disease. *Eur Heart J*. 2013;34:3451-3457.

263. Kaudewitz D, Lee R, Willeit P, McGregor R, Markus HS, Kiechl S, Zampetaki A, Storey RF, Channon KM, Mayr M. Impact of intravenous heparin on quantification of circulating micrnas in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 2013;110
264. Meder B, Keller A, Vogel B, Haas J, Sedaghat-Hamedani F, Kayvanpour E, Just S, Borries A, Rudloff J, Leidinger P, Meese E, Katus HA, Rottbauer W. Micrnas signatures in total peripheral blood as novel biomarkers for acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2011;106:13-23.
265. Fichtlscherer S, Zeiher AM, Dimmeler S. Circulating micrnas: Biomarkers or mediators of cardiovascular diseases? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:2383-2390.
266. van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Kelm RJ, Jr., Olson EN. A family of micrnas encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell.* 2009;17:662-673.
267. Hsu A, Chen SJ, Chang YS, Chen HC, Chu PH. Systemic approach to identify serum micrnas as potential biomarkers for acute myocardial infarction. *Biomed Res Int.* 2014;2014:418628.
268. Goldraich LA, Martinelli NC, Matte U, Cohen C, Andrades M, Pimentel M, Biolo A, Clausell N, Rohde LE. Transcoronary gradient of plasma micrnas 423-5p in heart failure: Evidence of altered myocardial expression. *Biomarkers.* 2014;19:135-141.
269. Liu R, Zhang C, Hu Z, Li G, Wang C, Yang C, Huang D, Chen X, Zhang H, Zhuang R, Deng T, Liu H, Yin J, Wang S, Zen K, et al. A five-micrnas signature identified from genome-wide serum micrnas expression profiling serves as a fingerprint for gastric cancer diagnosis. *Eur J Cancer.* 2011;47:784-791.
270. Jaffe AS, Vasile VC, Milone M, Saenger AK, Olson KN, Apple FS. Diseased skeletal muscle: A noncardiac source of increased circulating concentrations of cardiac troponin t. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58:1819-1824.
271. Gidlöf O, Andersson P, van der Pals J, Gotberg M, Erlinge D. Cardiospecific micrnas plasma levels correlate with troponin and cardiac function in patients with st elevation myocardial infarction, are selectively dependent on renal elimination, and can be detected in urine samples. *Cardiology.* 2011;118:217-226.
272. Bandi N, Zbinden S, Gugger M, Arnold M, Kocher V, Hasan L, Kappeler A, Brunner T, Vassella E. Mir-15a and mir-16 are implicated in cell cycle regulation in a rb-dependent manner and are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2009;69:5553-5559.
273. Small EM, Frost RJ, Olson EN. Micrnas add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation.* 2010;121:1022-1032.
274. Li T, Morgan MJ, Choksi S, Zhang Y, Kim YS, Liu ZG. Micrnas modulate the noncanonical transcription factor nf-kappaB pathway by regulating expression of the kinase ikkalpha during macrophage differentiation. *Nat Immunol.* 2010;11:799-805.
275. Chamorro-Jorganes A, Araldi E, Penalva LO, Sandhu D, Fernandez-Hernando C, Suarez Y. Micrnas-16 and micrnas-424 regulate cell-autonomous angiogenic functions in endothelial cells via targeting vascular endothelial growth factor receptor-

- 2 and fibroblast growth factor receptor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:2595-2606.
276. Murphree LJ, Sullivan GW, Marshall MA, Linden J. Lipopolysaccharide rapidly modifies adenosine receptor transcripts in murine and human macrophages: Role of nf-kappab in a(2a) adenosine receptor induction. *Biochem J.* 2005;391:575-580.
277. Klaasse EC, Ijzerman AP, de Grip WJ, Beukers MW. Internalization and desensitization of adenosine receptors. *Purinergic Signal.* 2008;4:21-37.
278. Ernens I, Leonard F, Vausort M, Rolland-Turner M, Devaux Y, Wagner DR. Adenosine up-regulates vascular endothelial growth factor in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;392:351-356.
279. Luo Z, Wen G, Wang G, Pu X, Ye S, Xu Q, Wang W, Xiao Q. MicroRNA-200c and -150 play an important role in endothelial cell differentiation and vasculogenesis by targeting transcription repressor zeb1. *Stem Cells.* 2013;31:1749-1762.

RESUME

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la première cause de décès dans le monde. Les problèmes majeurs dans la prise en charge des patients atteints de MCV résident dans l'émission du diagnostic, qui peut être difficile et prendre du temps, et dans la prédiction du pronostic de ces patients. De nouveaux biomarqueurs, découverts lors de ces quelques dernières années, ont considérablement permis d'améliorer le diagnostic et le pronostic des patients atteints de MCV. Les microARN (miARN) sont de petits ARN simple brin non codants qui inhibent l'expression des gènes et circulent dans le sang. Les miARN circulants sont apparus comme biomarqueurs potentiels des MCV. Les miARN sont impliqués dans la régulation de nombreux processus biologiques et des études récentes ont suggéré qu'ils pourraient être utiles pour stimuler la réparation cardiaque post infarctus.

Nous avons émis l'hypothèse que les miARN pourraient être utilisés comme biomarqueurs de différentes MCV et comme outils thérapeutiques dans la réparation cardiaque post-infarctus.

Dans un premier temps, nous avons évalué la capacité diagnostique des miARN chez des patients atteints de douleurs thoraciques. Puis nous avons montré que le miR-208b et le miR-499 sont de potentiels biomarqueurs diagnostiques chez les patients atteints d'infarctus du myocarde. En revanche, ces miARN n'améliorent pas la valeur diagnostique des biomarqueurs traditionnels. Nous avons également observé que le miR-423-5p est capable de prédire la réhospitalisation des patients souffrant d'insuffisance cardiaque aiguë. Nous avons identifié 2 miARN, le miR-21 et le miR-122, associés aux séquelles neurologiques de patients après arrêt cardiaque. Enfin, nous avons étudié la valeur de miARN en tant que biomarqueurs chez des patients atteints d'insuffisance rénale terminale. Ces résultats indiquent que les miARN circulants pourraient être utiles en tant que biomarqueurs diagnostiques et pronostiques de certaines MCV. Dans un second temps, nous avons montré que l'inhibition du miR-16 permet de stimuler la prolifération, la différenciation, la sécrétion d'IL-8 et la capacité pro-angiogénique des cellules endothéliales progénitrices (EPC). Nous avons également montré que le miR-150 est impliqué dans l'effet de l'adénosine sur le recrutement des EPC post-infarctus. Ces résultats suggèrent que les miARN pourraient être utilisés pour améliorer la revascularisation post-infarctus.

En conclusion, nos études contribuent à la caractérisation de plusieurs miARN dont l'utilité clinique dans le contexte cardiovasculaire reste à confirmer.

Mots-clés : maladies cardiovasculaires – microARN – thérapeutique – biomarqueur – revascularisation

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the leading cause of death around the world. Major issues in the management of patients with cardiovascular diseases lie on the establishment of the diagnostic, which can be difficult and time-consuming, and on the prediction of the clinical outcome of these patients. New biomarkers, discovered in the past few years, substantially improved the diagnostic and prognostic of patients with cardiovascular diseases. MicroRNAs (miRNAs) are small single-stranded non-coding RNAs that inhibit gene expression and circulate in the blood. Circulating miRNAs appeared as potential biomarkers of cardiovascular diseases. MicroRNAs are involved in the regulation of multiple biological pathways, and recent researches suggest that they could be useful to stimulate cardiac repair.

We hypothesized that miRNAs could be used as biomarkers of different cardiovascular diseases, and also as therapeutic tools to improve cardiac repair after myocardial infarction.

First, we evaluated the diagnostic capacity of miRNAs in patients with chest pain. Then, we showed that miR-208b and miR-499 were potential diagnostic biomarkers in patients with myocardial infarction. However, these miRNAs could not improve the diagnostic accuracy of traditional biomarkers. We also observed that miR-423-5p could predict the rehospitalization of patients with acute heart failure. We identified 2 miRNAs, miR-21 and miR-122, associated with neurological damage after cardiac arrest. Finally, we investigated the biomarker value of miRNAs in patients with advanced renal failure. Overall, our results indicate that circulating miRNAs could be useful diagnostic and prognostic biomarkers of cardiovascular diseases. Secondly, we showed that inhibiting miR-16 could stimulate the proliferation, differentiation, secretion of IL-8 and pro-angiogenic capacity of endothelial progenitor cells. We also showed that miR-150 is involved in the effect of adenosine on the recruitment of endothelial progenitor cells after myocardial infarction. These results suggest that miRNAs could be used to improve the revascularization after myocardial infarction.

In conclusion, our studies contributed to the characterization of several miRNAs, which clinical utility in the cardiovascular field remains to be confirmed.

Key words : cardiovascular diseases – microRNAs – therapeutic – biomarker – revascularization