



**HAL**  
open science

# Implication des ARNs non codants dans l'infarctus du myocarde et le remodelage ventriculaire post-infarctus

Jennifer Zangrando

► **To cite this version:**

Jennifer Zangrando. Implication des ARNs non codants dans l'infarctus du myocarde et le remodelage ventriculaire post-infarctus. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0109 . tel-01751813

**HAL Id: tel-01751813**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751813>**

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



## AVERTISSEMENT

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

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

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

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

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

## 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 **Jennifer ZANGRANDO**

## **Implication des ARNs non codants dans l'infarctus du myocarde et le remodelage ventriculaire post-infarctus**

**2 Octobre 2015**

### **Membres du jury :**

|                     |                    |   |
|---------------------|--------------------|---|
| <b>Rapporteurs:</b> | M. Philippe Rouet  | PhD, INSERM U-1048, Toulouse, France                                    |
|                     | M. Claude Delcayre | PhD, CNRS U-942, Paris, France  |
| <b>Examineurs:</b>  | M. Simon Thornton  | PU, Université de Lorraine, Nancy, France                               |
|                     | M. Damien Logeart  | PU-APHP, Hôpital Lariboisière, Paris, France                            |
|                     | M. Daniel Wagner   | MD, PhD, Centre hospitalier Luxembourg, Luxembourg                      |
|                     | M. Yvan Devaux     | PhD, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg<br>(Directeur de thèse) |
| <b>Invitée:</b>     | Mme Anne Pizard    | PhD, INSERM U-1116, Nancy, France                                       |

**Laboratoire de recherche cardiovasculaire, Luxembourg Institute of Health  
84, val Fleuri L-1526 Luxembourg**







# Remerciements

J'adresse tout d'abord mes remerciements au Docteur Daniel Wagner, directeur du Laboratoire de Recherche Cardiovasculaire de LIH (*Luxembourg Institute of Health*), pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de son équipe.

Je tiens ensuite à remercier en particulier le Docteur Yvan Devaux pour son encadrement et son soutien et lui adresse ma reconnaissance pour le temps et l'énergie qu'il a pu m'offrir pendant ces 3 années de thèse.

Toute ma sympathie et mes pensées vont bien entendu à mes collègues du Laboratoire de Recherche Cardiovasculaire du LIH qui m'ont fait vivre 3 années inoubliables à leurs côtés, qui m'ont soutenu et porté dans les moments difficiles et qui m'ont permis d'évoluer grâce à leurs expériences et leurs conseils. Un merci tout particulier à Christelle qui a eu le courage de relire ma thèse mais aussi à Mélanie, Emeline, LuLu, François, Justine, Isabelle, Andrew, Carine, Bernadette, Antonio et merci à tous les membres du LIH qui ont contribué de près ou de loin à mon projet de thèse.

Je remercie également toute l'équipe de la plateforme d'imagerie médicale Nancyclotep, qui m'a aidé, qui m'a permis de réaliser un bon nombre de travaux dans leurs locaux et qui m'a transmis beaucoup de leurs connaissances en imagerie médicale. Merci donc à Mickaël, Alexandra, Henri, Sylvain, Fatiha et Pierre-Yves.

Mes remerciements vont également à mes rapporteurs, le Docteur Philippe Rouet et le Docteur Claude Delcayre ainsi qu'à mon suivi de comité de thèse et examinateurs, le Professeur Simon Thornton, le Docteur Damien Logeart et le Docteur Anne Pizard.

Enfin, je remercie le Fond National de la Recherche et le Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche du Luxembourg qui a accepté de financer cette thèse et sans qui rien n'aurait été possible.

**Une page se tourne....**

**...Merci à mes parents et à l'amour de ma vie.**



# Liste des travaux

## Publications relatives à ce mémoire

### **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.* 2015; 277(2):260-71.

### **MicroRNA-150: a novel marker of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction.**

Devaux Y, Vausort M, McCann GP, Zangrando J, Kelly D, Razvi N, Zhang L, Ng LL, Wagner DR, Squire IB.  
*Circ Cardiovasc Genet.* 2013; 6(3):290-8.

### **Identification of candidate long non-coding RNAs in response to myocardial infarction.**

Zangrando J, Zhang L, Vausort M, Maskali F, Marie PY, Wagner DR, Devaux Y.  
*BMC Genomics.* 2014; 15:460.

### **Long noncoding RNAs in cardiac development and ageing.**

Devaux Y, Zangrando J, Schroen B, Creemers E, Pedrazzini T, Chang CP, Dorn II G, Thum T, Heymans S.  
*Nat Rev Cardiol.* 2015; (sous presse)

## Publications non présentées dans ce mémoire

### **Unity is strength - A panel of 4 microRNAs decreases cardiomyocyte hypertrophy.**

Goretti E, Zangrando J, Wagner DR, Devaux Y.

*Int J Cardiol.* 2015; 182C:62-64.

### **Cardioprotective effects of adenosine within the border and remote areas of myocardial infarction.**

Bousquenaud M, Maskali F, Poussier S, Zangrando J, Marie PY, Boutley H, Fay R, Karcher G, Wagner DR, Devaux Y.

*EJNMMI Res.* 2013; 12;3(1):65.

## Communications orales

### **Long non-coding RNAs in the infarcted heart**

Zangrado J, Zhang L, Vausort M, Maskali F, Marie PY, Wagner DR, Devaux Y.  
Heart Failure Congress from the European Society of Cardiology  
Athènes, Mai 2014

### **Long non-coding RNAs in the infarcted heart**

Zangrado J, Zhang L, Vausort M, Maskali F, Marie PY, Wagner DR, Devaux Y.  
International Society for Heart Research from the European Society of Cardiology  
Barcelone, Juillet 2014

### **Long non-coding RNAs in the infarcted heart**

Zangrado J, Zhang L, Vausort M, Maskali F, Marie PY, Wagner DR, Devaux Y.  
European Society of Cardiology Congress  
Barcelone, Septembre 2014

## Posters

### **Long non-coding RNA in the infarcted heart**

Zangrado J, Zhang L, Vausort M, Maskali F, Marie PY, Wagner DR, Devaux Y.  
Frontiers in CardioVascular Biology from the European Society of Cardiology  
Barcelone, Juillet 2014





# Liste des abréviations

|                |   |
|----------------|---|
| <b>18F</b>     | Fluor 18                                  |
| <b>ADN</b>     | Acide désoxyribonucléique                 |
| <b>ADNc</b>    | ADN complémentaire                        |
| <b>ADRB1</b>   | Récepteur adrénergique bêta 1             |
| <b>ARN</b>     | Acide ribonucléique                       |
| <b>ARNm</b>    | ARN messenger                             |
| <b>ARNr</b>    | ARN ribosomique                           |
| <b>ARNt</b>    | ARN de transfert                          |
| <b>AUC</b>     | Aire sous la courbe                       |
| <b>BNP</b>     | Brain natriuretic peptide                 |
| <b>CHRF</b>    | Cardiac hypertrophy related factor        |
| <b>CK-MB</b>   | Creatine kinase-MB                        |
| <b>CPK</b>     | Creatine phosphokinase                    |
| <b>CRP</b>     | Protéine C réactive                       |
| <b>Ct</b>      | Cycle threshold                           |
| <b>cTnT</b>    | Troponine T cardiaque                     |
| <b>DAPI</b>    | 4',6'-diamidino-2-phénylindole            |
| <b>ECG</b>     | Electrocardiogramme                       |
| <b>FA</b>      | Formaldéhyde                              |
| <b>FDG</b>     | Fluorodéoxyglucose                        |
| <b>FE</b>      | Fraction d'éjection                       |
| <b>GAPDH</b>   | Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase |
| <b>HDL</b>     | High-density lipoprotein                  |
| <b>hs-cTnT</b> | Troponine T cardiaque hypersensible       |
| <b>IC</b>      | Insuffisance cardiaque                    |
| <b>IDM</b>     | Infarctus du myocarde                     |

|                  |   |
|------------------|---|
| <b>IRM</b>       | Imagerie par résonance magnétique                           |
| <b>KI</b>        | Knock-in  |
| <b>KO</b>        | Knock-out   |
| <b>LDL</b>       | Low-density lipoprotein                                     |
| <b>lncARN</b>    | Long ARN non codant   |
| <b>MALAT1</b>    | Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1      |
| <b>MB</b>        | Myoglobine  |
| <b>MEC</b>       | Matrice extracellulaire                                     |
| <b>MIAT</b>      | Myocardial infarction associated transcript                 |
| <b>miARN</b>     | microARNs   |
| <b>MIRT</b>      | Myocardial related transcript                               |
| <b>MMP</b>       | Matrix metalloproteinase                                    |
| <b>NBT/BCIP</b>  | Nitro-blue-tetrazolium/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate |
| <b>Nt-proBNP</b> | N-terminal pro-brain natriuretic peptide                    |
| <b>OMS</b>       | Organisation mondiale de la santé                           |
| <b>PBS</b>       | Phosphate buffered saline                                   |
| <b>PCR</b>       | Polymerase chain reaction                                   |
| <b>PRC</b>       | Polycomb repressive complex                                 |
| <b>RISC</b>      | RNA-induced silencing complex                               |
| <b>ROC</b>       | Receiver operating characteristic                           |
| <b>RT</b>        | Transcription inverse                                       |
| <b>siARN</b>     | Petit ARN interférent                                       |
| <b>TEP</b>       | Tomographie par émission de positrons                       |
| <b>TRT</b>       | Tenascin related transcript                                 |
| <b>TrxG</b>      | Trithorax group   |
| <b>VES</b>       | Volume d'éjection systolique                                |
| <b>VTD</b>       | Volume télédiastolique                                      |
| <b>VTS</b>       | Volume télésystolique                                       |

# Table des illustrations

## Figures

**Figure 1** : Localisation du cœur dans le corps humain

**Figure 2** : Anatomie interne du cœur

**Figure 3** : Anatomie des 3 tuniques cardiaques

**Figure 4** : Réseau artériel coronarien

**Figure 5** : Schéma de la circulation sanguine

**Figure 6** : L'infarctus du myocarde

**Figure 7** : Représentation du cœur présentant un remodelage ventriculaire post-IDM

**Figure 8** : Les 4 phases du remodelage ventriculaire post-IDM

**Figure 9** : Amélioration de la sensibilité de la mesure de la troponine cardiaque T avec les nouvelles techniques de détection hypersensible et comparée à des marqueurs classiques comme la myoglobine (MB) et la créatine kinase MB (CK-MB)

**Figure 10** : Le dogme central de la biologie moléculaire émis par Francis Crick, en 1958

**Figure 11** : Biogenèse des miARNs

**Figure 12** : Classification des lncARNs par leur localisation génomique

**Figure 13** : Mécanismes d'action des lncARNs

**Figure 14** : Images représentatives d'un marquage immunofluorescent dans un cœur de souris montrant la prolifération des cardiomyocytes après injection du miR-590

**Figure 15**: Coupes histologiques de cœurs de souris contrôles (*sham*) ou ayant subi un rétrécissement de l'aorte thoracique (TAB), de type sauvage (WT) ou mutées pour le miR-208 (KO)

**Figure 16**: Niveau d'expression des lncARNs *aHIF*, *ANRIL*, *Kcnq1ot1*, *MIAT* et *MALAT1* dans les cellules sanguines de volontaires sains (n=86) et de patients atteints d'IDM (n=414)

**Figure 17:** Représentation schématique de la ligature coronaire

**Figure 18:** Processus d'annihilation entraînant l'émission de deux photons

**Figure 19:** Schéma représentant le principe de l'hybridation *in situ*

**Figure 20:** Schéma représentant le principe de l'immunofluorescence

**Figure 21:** Expressions des 6 miARNs sélectionnés et mesurées par RT-PCR à l'arrivée des patients dans la cohorte APACE comportant 931 patients sans IDM et 224 patients avec IDM

**Figure 22:** Courbes ROC montrant le pouvoir diagnostique des 6 miARNs sélectionnés pour l'IDM

**Figure 23:** Courbes ROC montrant le pouvoir diagnostique de l'IDM par les miR-208b et miR-499 et les marqueurs classiquement mesurés (cTnT4 et hs-TnT) ainsi que leurs combinaisons

**Figure 24:** Courbes de survie de Kaplan-Meier présentant le taux de survie sur le court terme (30 jours) ou long terme (730 jours) après admission

**Figure 25:** Réseau représentant les interactions entre les protéines connues pour être impliquées dans le remodelage ventriculaire et les 265 miARNs pouvant interagir avec ces protéines

**Figure 26:** Images représentatives de coupes de cœur d'une souris avec IDM ou d'une souris *sham*, 15 jours après l'opération

**Figure 27:** Résultats de la TEP 24 heures après l'opération chez les souris appartenant au groupe de dérivation

**Figure 28:** Paramètres cardiaques des souris *sham* et souris avec IDM du groupe de réplification évalués par TEP à 24 heures

**Figure 29 :** Analyse en composantes principales des données des puces à ARN montrant la discrimination entre les souris avec IDM et les souris *sham*, grâce à l'expression génique

**Figure 30:** Graphique M-A représentant la différence d'expression pour chaque gène par rapport à l'intensité d'expression du gène

**Figure 31:** Carte d'expression des lncARNs différenciellement exprimés entre souris *sham* et souris avec IDM

**Figure 32:** Quantification des lncARNs par PCR quantitative dans les cœurs de souris du groupe de dérivation (1.) et de validation (2.)

**Figure 33:** Expressions de *MIRT1* et *MIRT2* à différents temps après l'IDM (n=3 par temps)

**Figure 34:** Images représentatives de l'hybridation *in situ* révélant la localisation de *MIRT1* sur des coupes de cœurs de souris *sham* et souris avec IDM

**Figure 35:** Images représentatives de l'hybridation *in situ* couplée à l'immunofluorescence permettant d'identifier les cellules exprimant *MIRT1* dans les cœurs de souris *sham* et souris avec IDM

**Figure 36:** Réseau montrant les corrélations entre 38 gènes impliqués dans le remodelage ventriculaire post-IDM avec *MIRT1* et *MIRT2*

**Figure 37:** Expressions des gènes du remodelage mesurés au cours du temps par PCR quantitative dans le cœur de souris après IDM (n=3 par temps)

## Tableaux

**Tableau 1:** Données caractéristiques des 1 155 patients inclus dans l'étude APACE

**Tableau 2:** Données caractéristiques des patients inclus dans l'étude du miR-150

**Tableau 3:** Programme d'inclusion en paraffine de la Citadel

**Tableau 4:** Mode d'utilisation des différents anticorps dans le cadre de l'immunofluorescence couplée à l'hybridation *in situ*

**Tableau 5:** Caractéristiques des amorces de souris utilisées pour la PCR quantitative

**Tableau 6:** Paramètres cardiaques des souris avec IDM et des souris *sham*, 2 jours et 15 jours post-opération

**Tableau 7:** Corrélations entre *MIRT1*, *MIRT2* et les paramètres cardiaques obtenus par TEP 24 heures après l'IDM dans le groupe de dérivation



# Table des matières

|  |           |
|--|-----------|
| Remerciements.....   | 3         |
| Liste des travaux.....   | 6         |
| Liste des abréviations.....  | 10        |
| Table des illustrations.....   | 12        |
| Table des matières.....  | 16        |
| Introduction.....  | 20        |
| Présentation générale du manuscrit.....                                    | 26        |
| Laboratoire d'accueil et financement.....                                  | 28        |
| <br>   |           |
| Etude bibliographique.....   | 30        |
| <b>Chapitre 1. Les maladies cardiovasculaires.....</b>                     | <b>30</b> |
| 1.1. Le cœur.....  | 30        |
| 1.1.1. Anatomie cardiaque.....   | 30        |
| 1.1.2. Fonction cardiaque.....   | 33        |
| 1.2. Epidémiologie et étiologie.....                                       | 36        |
| 1.3. L'athérosclérose et l'infarctus du myocarde.....                      | 38        |
| 1.4. Le remodelage ventriculaire post-infarctus.....                       | 42        |
| 1.5. L'insuffisance cardiaque.....   | 45        |
| 1.6. Les biomarqueurs.....   | 47        |
| 1.7. Les cibles thérapeutiques.....  | 51        |
| <b>Chapitre 2. Les ARNs non codants.....</b>                               | <b>54</b> |
| 2.1. Le dogme central de la biologie moléculaire.....                      | 54        |
| 2.2. Histoire des ARNs non codants.....                                    | 57        |
| 2.3. Les miARNs.....   | 58        |
| 2.3.1. Biogénèse des miARNs et régulation des ARNm.....                    | 58        |
| 2.3.2. Circulation des miARNs : aspects pronostiques et diagnostiques..... | 61        |
| 2.3.3. Modulation des miARNs : aspects thérapeutiques.....                 | 62        |
| 2.4. Les lncARNs.....  | 64        |
| 2.4.1. Localisation génomique des lncARNs.....                             | 64        |

|  |            |
|--|------------|
| 2.4.2. Mécanismes d'actions des lncARNs.....   | 67         |
| 2.4.2.1. Mécanisme 1 : Signal.....   | 69         |
| 2.4.2.2. Mécanisme 2 : Piège.....  | 71         |
| 2.4.2.3. Mécanisme 3 : Guide.....  | 73         |
| 2.4.2.4. Mécanisme 4 : Support.....  | 74         |
| 2.4.2.5. Mécanisme 5 : Enhancer.....   | 75         |
| 2.4.3. Rôle structurel des lncARNs.....  | 76         |
| 2.4.4. Potentiels cliniques des lncARNs.....   | 77         |
| <b>Chapitre 3. Les ARNs non codants dans le cœur.....</b>  | <b>80</b>  |
| 3.1. Implication des miARNs dans la physiopathologie cardiaque.....  | 80         |
| 3.1.1. Les miARNs dans le développement cardiaque.....   | 80         |
| 3.1.2. Rôle des miARNs dans la régénération cardiaque.....   | 82         |
| 3.1.3. Implication des miARNs dans l'IDM.....  | 83         |
| 3.1.4. Rôle des miARNs dans le remodelage ventriculaire et dans l'IC.....  | 86         |
| 3.2. Implication des lncARNs dans la physiopathologie cardiaque.....   | 91         |
| 3.2.1. Les lncARNs dans le développement cardiaque.....  | 91         |
| 3.2.2. Implication des lncARNs dans l'IDM.....   | 93         |
| 3.2.3. Rôle des lncARNs dans le remodelage ventriculaire et l'IC.....  | 95         |
| <br>   |            |
| Matériel et méthodes.....  | 100        |
| <b>1. Cohorte de patients.....</b>   | <b>100</b> |
| 1.1. Cohorte APACE.....  | 100        |
| 1.2. Cohorte de patients avec IDM pour l'étude du miR-150.....   | 102        |
| <b>2. Protocoles expérimentaux.....</b>  | <b>104</b> |
| 2.1. Animaux.....  | 104        |
| 2.2. Ligature coronaire.....   | 105        |
| 2.3. Imagerie cardiaque par tomographie à émission de positrons.....   | 108        |
| 2.3.1. Principe.....   | 108        |
| 2.3.2. Protocole.....  | 110        |
| 2.4. Sacrifices et prélèvement d'organes.....  | 112        |
| <b>3. Analyses histologiques.....</b>  | <b>113</b> |
| 3.1. Coupes histologiques.....   | 113        |
| 3.2. Détection de la fibrose au trichrome de Masson.....   | 114        |
| 3.3. Détection de séquences nucléiques par hybridation <i>in situ</i> .....  | 115        |
| 3.4. Co-marquage de protéines et d'acides nucléiques par hybridation <i>in situ</i><br>couplée à l'immunofluorescence..... | 117        |



|   |            |
|---|------------|
| <b>4. Analyses biochimiques et moléculaires.....</b>  | <b>120</b> |
| 4.1 Extraction d'ARN total.....   | 120        |
| 4.2. Analyse quantitative et qualitative de l'ARN.....  | 121        |
| 4.3. Puces à ARN.....   | 122        |
| 4.4. Transcription inverse et PCR quantitative en temps réel.....   | 124        |
| <b>5. Analyses statistiques.....</b>  | <b>127</b> |
| <br>  |            |
| Résultats.....  | 130        |
| <b>Etude n°1</b> : Valeur diagnostique et pronostique des miARNs circulants chez les patients avec des douleurs thoraciques aiguës..... | 130        |
| ○ Relation entre l'expression des miARNs et le diagnostic final des patients.....   | 131        |
| ○ Utilisation des miARNs comme marqueurs diagnostiques précoces.....  | 133        |
| ○ Utilisation des miARNs comme marqueurs pronostiques.....  | 134        |
| <b>Etude n°2</b> : Le miR-150: Un nouveau marqueur du remodelage ventriculaire post-IDM.....  | 137        |
| ○ Identification de miARNs impliqués dans le remodelage ventriculaire.....  | 138        |
| ○ Sélection du miR-150.....   | 140        |
| ○ Etude du miR-150 dans le cœur de souris.....  | 142        |
| <b>Etude n°3</b> : Identification de lncARNs associés à l'IDM.....  | 145        |
| ○ Etude des paramètres cardiaques chez les souris après 24 heures d'IDM.....  | 146        |
| ○ Etude de l'expression des lncARNs dans le cœur de souris post-IDM.....  | 149        |
| ○ Etude de la localisation de <i>MIRT1</i> dans le cœur de souris après IDM.....  | 156        |
| ○ Association entre <i>MIRT1</i> , <i>MIRT2</i> et le remodelage ventriculaire post-IDM.....  | 159        |
| <br>  |            |
| Discussion.....   | 164        |
| ○ Valeur pronostique, diagnostique et thérapeutique des miARNs.....   | 165        |
| ○ Valeur pronostique, diagnostique et thérapeutique des lncARNs.....  | 174        |
| <br>  |            |
| Conclusion et perspectives.....   | 182        |
| Bibliographie.....  | 184        |
| Annexes.....  | 204        |



# Introduction

Ces dernières années, les progrès en termes de prévention, de prise en charge et de traitement concernant les maladies cardiovasculaires se sont considérablement améliorés augmentant l'espérance de vie des patients<sup>1</sup>. Cela-dit, les maladies cardiovasculaires restent la première cause de mortalité dans le monde, particulièrement dans les pays à faibles ou moyens revenus qui n'ont pas accès aux soins adéquats et qui sont les plus exposés aux facteurs de risque<sup>2</sup>. Les pathologies d'origine coronarienne sont prédominantes puisqu'elles représentent 40% des maladies cardiovasculaires<sup>3</sup>. L'infarctus du myocarde (IDM), appelé plus couramment crise cardiaque, appartient à cette catégorie.

L'IDM se produit suite à l'obstruction d'une artère coronaire par un thrombus qui conduit à l'arrêt de la circulation sanguine et donc à l'arrêt de l'apport en oxygène du muscle cardiaque. Cette zone atteinte par l'ischémie, appelée zone infarctée, va entrer dans une phase de mort cellulaire et perdre sa fonction contractile<sup>4</sup>. Pour pallier à cette perte, le cœur va subir un remodelage ventriculaire défini comme des changements de taille, de forme et de fonction<sup>5</sup>. Lorsque ce remodelage est délétère et incontrôlé, il entraîne l'apparition d'une insuffisance cardiaque (IC) caractérisée par le fait que le cœur n'est plus capable de maintenir une fonction suffisante pour subvenir aux besoins en sang de l'organisme<sup>6</sup>.

Les mécanismes impliqués dans le remodelage délétère ne sont pas encore très bien connus mais compte-tenu de la proportion de patients qui sont atteints par l'IC, il est indispensable de continuer la recherche dans cette voie. Découvrir des molécules impliquées dans ce remodelage permettrait d'obtenir de nouvelles cibles thérapeutiques pour remédier ou atténuer l'apparition de l'IC. Une fois l'IC installée, il apparaît comme difficilement envisageable de revenir vers une fonction cardiaque normale, ainsi l'un des objectifs est de découvrir des biomarqueurs qui permettraient de prédire la survenue d'un remodelage ventriculaire et de l'IC. Bien que les mécanismes responsables de l'apparition du remodelage ne soient que partiellement caractérisés, nous savons qu'ils impliquent des modifications de l'expression génique<sup>7</sup>.

Le séquençage du génome humain s'est achevé en 2001 mais ce n'est que 11 ans plus tard qu'il fût révélé que seulement 2% du génome humain est transcrit en acides ribonucléiques (ARN) codant pour des protéines. En effet, 98% du génome humain est transcrit en ARN ne codant pas pour des protéines<sup>8</sup>. Cette découverte a eu pour effet d'augmenter de façon conséquente les recherches concernant les ARNs non codants.

Les ARNs non codants sont répartis en 2 principaux groupes, les petits ARNs non codants contenant un nombre de nucléotides inférieur à 200 et parmi lesquels on trouve les microARNs (miARNs), et les longs ARNs non codants (lncARNs) possédant plus de 200 nucléotides. Compte-tenu de la forte proportion d'ARNs non codants dans l'organisme il parut insensé qu'ils soient dépourvus de fonctions cellulaires. En effet, il a été montré qu'ils sont impliqués dans de nombreux processus de régulation dans des conditions physiologiques et pathologiques<sup>9</sup>.

Il existe des outils permettant de réguler les miARNs de façon simple et efficace en culture cellulaire ou chez l'animal. Ceci leur confère la particularité d'être très attractifs en tant que cible thérapeutique<sup>10</sup>. De plus, il a été montré que les miARNs sont présents dans les fluides biologiques, ce qui confère l'avantage d'être aussi de potentiels biomarqueurs circulants<sup>11</sup>.

L'étude des lncARNs a débuté beaucoup plus récemment et ils sont donc bien moins caractérisés que les miARNs. Ils possèdent l'avantage, à la différence des miARNs, de pouvoir réguler leurs gènes cibles de façon positive ou négative et sont capables d'agir à différents niveaux de régulation avec de nombreux mécanismes d'action<sup>12</sup>. Ils agissent de façon très spécifique ce qui font d'eux des cibles thérapeutiques intéressantes<sup>13</sup>. De plus, suite aux découvertes récentes, ils pourraient être envisagés comme des biomarqueurs circulants<sup>14</sup>.

Ainsi, cette thèse est basée sur le postulat que les ARNs non codants, miARNs et lncARNs, pourraient être utilisés comme **biomarqueurs** ou **cibles thérapeutiques** dans le contexte de l'IDM et du remodelage ventriculaire.

La première étude présentée dans ce manuscrit est une étude portant sur la valeur diagnostique et pronostique des miARNs circulants chez des patients présentant des douleurs thoraciques aiguës appartenant à une cohorte nommée APACE.

Cette étude a donné lieu à la publication suivante :

**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.* 2015; 277(2):260-71.

Dans cette étude, ma contribution s'est portée sur les techniques de biologie moléculaire, à savoir les extractions d'ARN, les transcriptions inverses (RT) et les *polymerase chain reaction* (PCR) ainsi que sur l'analyse des données.

La seconde étude exposée dans ce mémoire est une étude ayant pour but initial d'identifier des miARNs associés avec le remodelage ventriculaire post-IDM.

Cette étude a donné lieu à la publication suivante :

**MicroRNA-150: a novel marker of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction.**

Devaux Y, Vausort M, McCann GP, Zangrando J, Kelly D, Razvi N, Zhang L, Ng LL, Wagner DR, Squire IB.

*Circ Cardiovasc Genet.* 2013; 6(3):290-8.

Dans ce travail, ma participation s'est portée essentiellement sur la partie *in vivo* consistant en l'induction d'IDM chez des souris ainsi que sur la partie histologique ayant pour but de révéler le miR-150 par hybridation *in situ*.

La troisième étude montrée dans ce manuscrit a eu pour but d'identifier et caractériser les lncARNs régulés dans le contexte de l'IDM et du remodelage ventriculaire post-IDM.

Cette étude a abouti à la publication suivante :

**Identification of candidate long non-coding RNAs in response to myocardial infarction.**

Zangrando J, Zhang L, Vausort M, Maskali F, Marie PY, Wagner DR, Devaux Y.

*BMC Genomics*. 2014; 15:460.

Cette publication a fait suite à mon principal sujet d'investigation durant ma thèse puisque j'ai principalement travaillé sur les lncARNs. Dans cette étude, j'ai participé à toutes les parties, des expérimentations animales aux analyses de biologie moléculaire et à la rédaction de l'article, à l'exception des analyses bio-informatiques.

J'ai également participé, à moindre échelle, à 2 articles non intégrés à ce mémoire, de part des contributions techniques :

**Unity is strength - A panel of 4 microRNAs decreases cardiomyocyte hypertrophy.**

Goretti E, Zangrando J, Wagner DR, Devaux Y.

*Int J Cardiol*. 2015; 182C:62-64.

**Cardioprotective effects of adenosine within the border and remote areas of myocardial infarction.**

Bousquenaud M, Maskali F, Poussier S, Zangrando J, Marie PY, Boutley H, Fay R, Karcher G, Wagner DR, Devaux Y.

*EJNMMI Res*. 2013; 12;3(1):65.

Enfin, j'ai eu la très grande chance de participer à une revue sur les lncARNs avec des chercheurs renommés appartenant au réseau Cardiolinc (<http://www.cardiolinc.org/>):

**Long noncoding RNAs in cardiac development and ageing.**

Devaux Y, Zangrando J, Schroen B, Creemers E, Pedrazzini T, Chang CP, Dorn II G, Thum T, Heymans S.

*Nat Rev Cardiol.* 2015; (sous presse)





# Présentation générale du manuscrit

Ce manuscrit s'articule en 5 parties.

- La première partie, divisée en 3 chapitres, est une revue de l'état de l'art du sujet de cette thèse.

- Le premier chapitre traite de généralités sur le cœur et les maladies cardiovasculaires afin de remettre le lecteur dans le contexte de l'étude et de bien définir chacun des points étudiés. Elle débute par des descriptions et définitions du cœur puis aborde l'épidémiologie des maladies cardiovasculaires. Elle définit ensuite l'IDM et les mécanismes conduisant à l'IC et présente finalement les biomarqueurs et les cibles thérapeutiques de ce domaine.

- Le second chapitre traite des ARNs non codants, en débutant par des généralités de biologie moléculaire puis en présentant l'histoire des ARNs non codants. Ensuite, un premier paragraphe est consacré aux microARNs et un second aux longs ARNs non codants.

- Enfin, le troisième chapitre traite de l'état d'avancement de la connaissance du rôle des ARNs non codants dans le contexte des maladies cardiovasculaires. Cette partie permet de comprendre l'enjeu de l'étude des ARNs non codants dans les maladies cardiovasculaires.

- La seconde partie porte sur les techniques utilisées dans ces études depuis les expérimentations *in vivo*, jusqu'aux analyses histologiques et aux techniques de biologie cellulaire et moléculaire.

- La troisième partie décrit les résultats obtenus suite aux différentes études.

- La quatrième partie discute des résultats précédemment décrits.

- La cinquième et dernière partie est consacrée aux conclusions et perspectives de ce travail de thèse.



# Laboratoire d'accueil et financement

Le laboratoire d'accueil au sein duquel s'est déroulé mon travail de thèse est le Laboratoire de Recherche Cardiovasculaire du LIH (Luxembourg Institute of Health) à Luxembourg sous la direction du Docteur Yvan Devaux.

Les expérimentations animales et plus particulièrement les examens de tomographie à émission de positrons ont été réalisés au sein de la plateforme d'imagerie médicale Nancyclotep à Nancy sous la direction du Professeur Pierre-Yves Marie.

Ces 3 années de recherche ont été financées par le Fond National de la Recherche (FNR) de Luxembourg ainsi que par le Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche du Luxembourg.



# Etude bibliographique

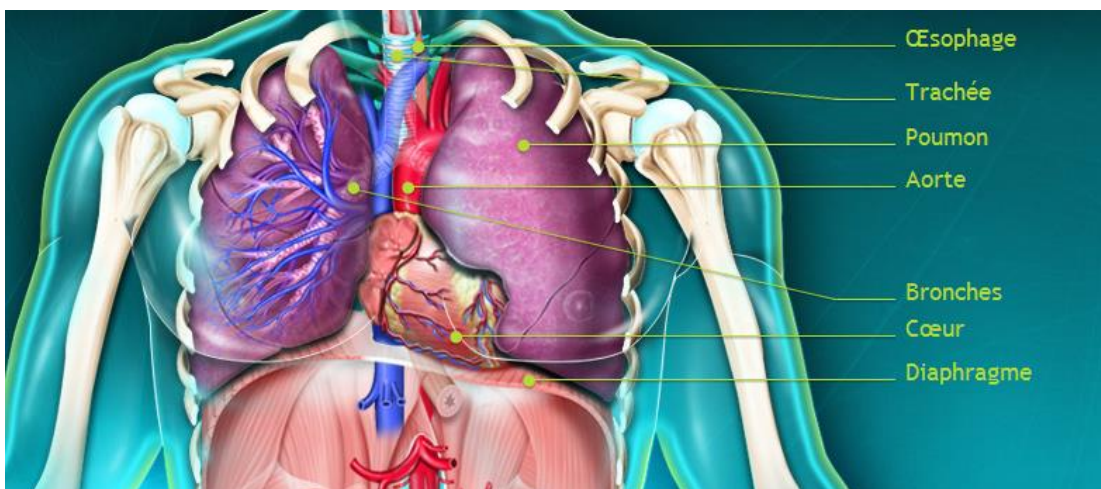
## Chapitre 1. Les maladies cardiovasculaires

### 1.1. Le cœur

Le cœur est un organe dit essentiel puisque le corps ne peut fonctionner sans lui. Permettant l'alimentation en apport sanguin au reste du corps, il est souvent nommé « moteur du système cardiovasculaire ». En effet, il a un rôle mécanique puisqu'il agit comme une pompe qui permet de véhiculer le sang dans tout l'organisme. Cette fonction de pompe est réalisable grâce aux contractions du cœur qui est un organe musculaire. C'est également un organe creux ce qui lui permet de se remplir d'une grande quantité de sang.

#### 1.1.1. Anatomie cardiaque

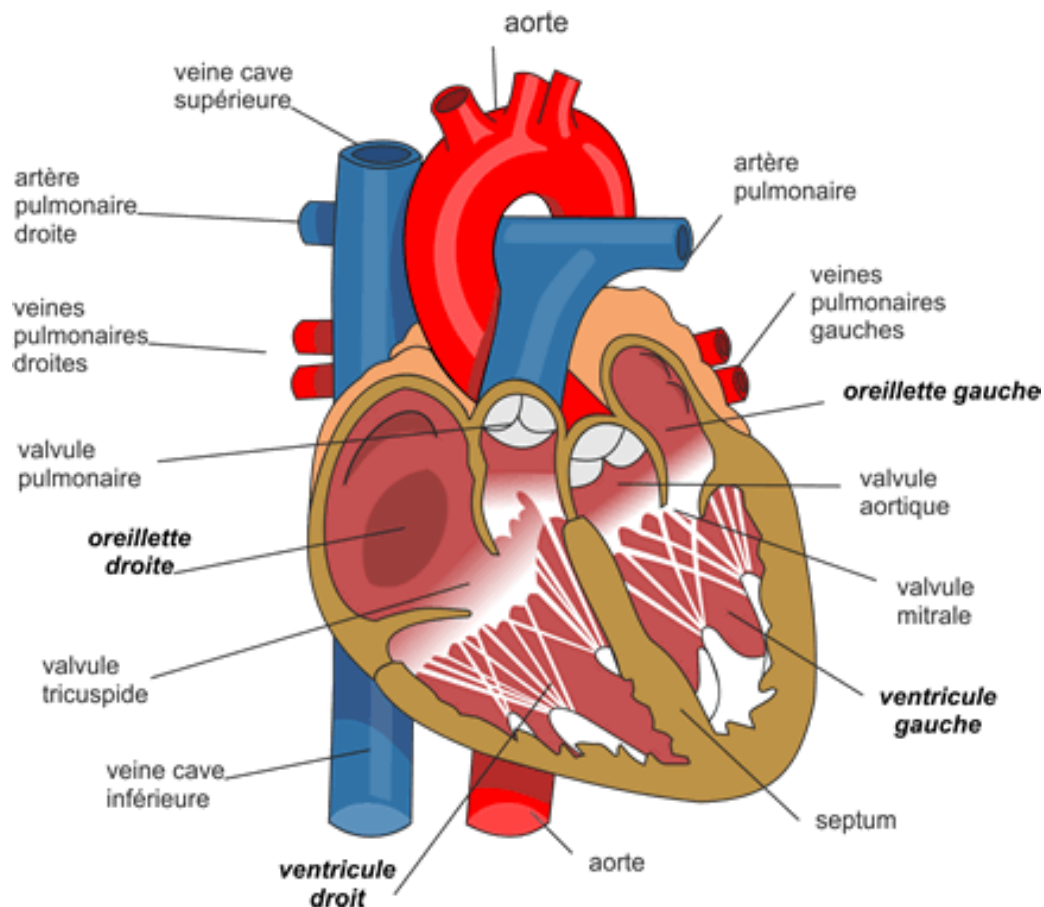
Le cœur est situé dans la cage thoracique et plus précisément logé dans le médiastin, c'est-à-dire la cavité située entre les 2 poumons. Il a une forme pyramidale triangulaire, avec une base regardant vers le haut et une pointe, nommée apex, située vers le bas (**Figure 1**).



**Figure 1:** Localisation du cœur dans le corps humain  
Image extraite du site : [www.sante.figaro.fr](http://www.sante.figaro.fr)

Le cœur est divisé en 2, le cœur droit et le cœur gauche. Chacun possède une cavité inférieure appelée ventricule qui expulse le sang et une cavité supérieure nommée oreillette ou atrium qui collecte le sang. Ainsi, le cœur possède 4 chambres, séparées grâce à des cloisons verticales et horizontales. Les 2 oreillettes sont séparées grâce au septum inter-auriculaire alors que les ventricules sont séparés par le septum interventriculaire.

Les ventricules et les oreillettes communiquent grâce à des valves, appelées valve mitrale dans le cœur gauche et valve tricuspide dans le cœur droit. Chaque ventricule est également relié à un orifice donnant naissance à une artère principale et constitué d'une valve. Le ventricule gauche est ainsi en relation avec l'aorte grâce à la valve aortique et le ventricule droit avec l'artère pulmonaire par la valve pulmonaire (**Figure 2**).



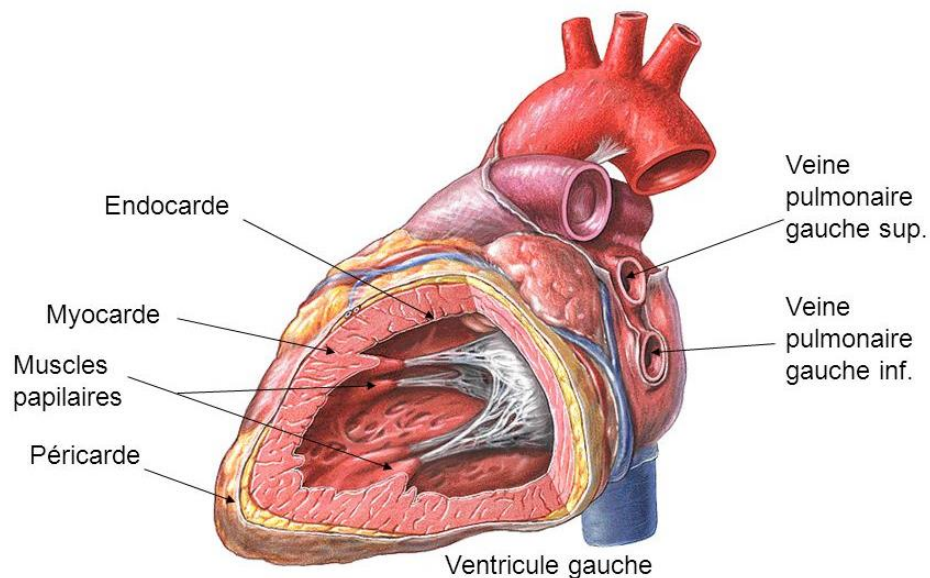
**Figure 2:** Anatomie interne du cœur  
Image extraite du site : [www.fedecardio.org](http://www.fedecardio.org)

Le cœur, étant un organe creux, possède une paroi complexe, capable de réaliser les différentes fonctions cardiaques. Sa paroi est ainsi constituée de 3 tuniques (**Figure 3**).

La couche la plus interne est l'endocarde qui est composée d'endothélium comparable à la paroi des vaisseaux. Cette paroi se prolonge par la tunique interne des artères et des veines émergentes du cœur. L'un de ses rôles est d'éviter la coagulation du sang au contact des parois.

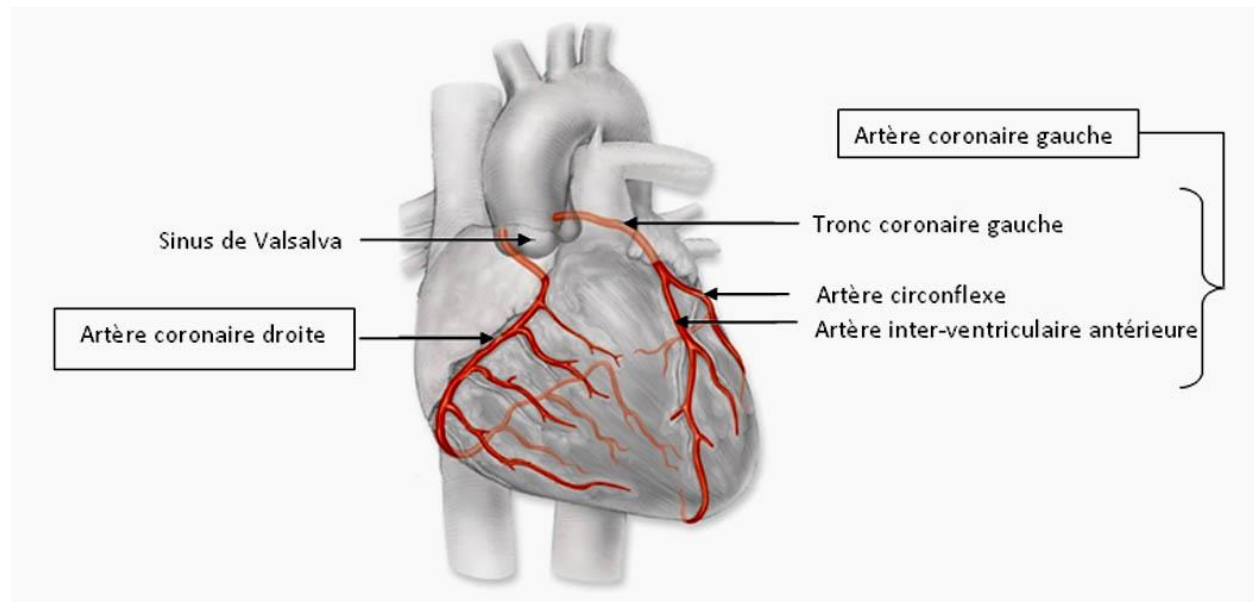
La couche la plus superficielle est le péricarde, sac à double paroi, qui permet d'une part le maintien du cœur dans la cage thoracique mais offre également une fluidité de mouvement pour la contraction cardiaque grâce au liquide contenu entre les deux feuillets du péricarde.

La couche centrale est le myocarde, fondement de la paroi cardiaque. C'est la tunique la plus épaisse et qui constitue la partie musculaire du cœur. En effet, le myocarde est capable de se contracter et ce, de façon autonome, régulière et régulée. Il est composé de cardiomyocytes organisés en travées et qui permettent la contraction mais aussi de fibroblastes qui composent la matrice extracellulaire (MEC), de cellules endothéliales composantes des vaisseaux et des cellules nerveuses sensibles. Cette contraction autonome est possible grâce à un tissu particulier contenu dans le myocarde, le tissu nodal. Agencé en îlots et en réseaux, le tissu nodal assure l'entretien des battements cardiaques grâce à la propagation du potentiel d'action à travers le cœur.



**Figure 3:** Anatomie des 3 tuniques cardiaques  
Image d'après F. Netter, Atlas d'anatomie humaine<sup>15</sup>

Le coeur, comme tout organe, nécessite un apport sanguin régulier. Il possède donc sa propre circulation artérielle et veineuse, appelée réseau coronaire. Il existe deux artères coronaires principales, la gauche et la droite qui sont ramifiées en de très nombreux vaisseaux irriguant l'ensemble du cœur. L'artère coronaire gauche est par exemple séparée en l'artère interventriculaire antérieure et en l'artère circonflexe irriguant le ventricule gauche (**Figure 4**).



**Figure 4:** Réseau artériel coronarien  
Image d'après F. Netter, Atlas d'anatomie humaine<sup>15</sup>

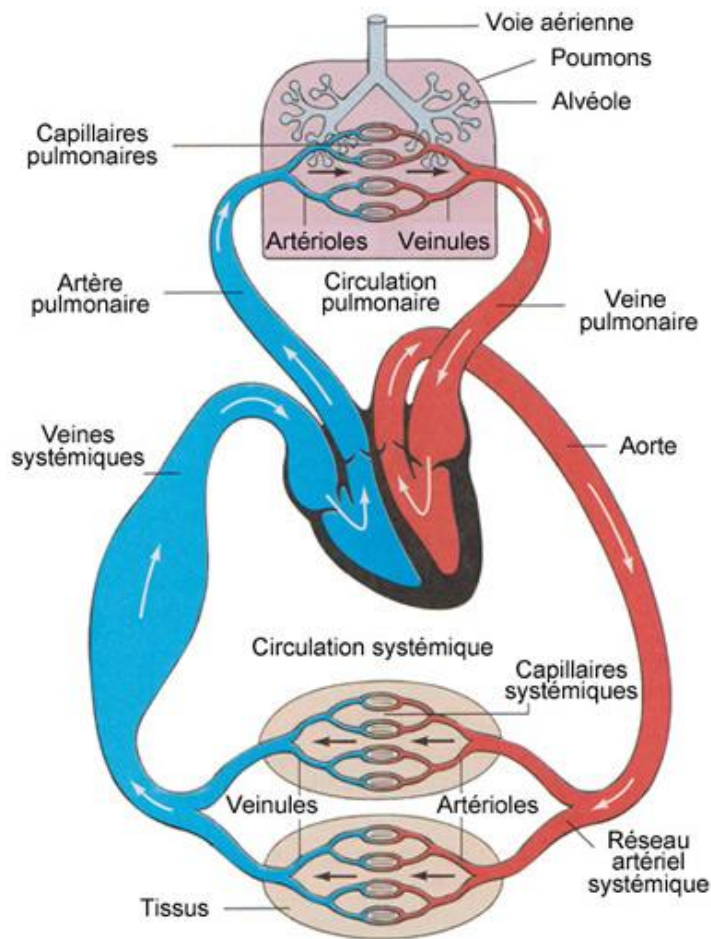
### 1.1.2. Fonction cardiaque

Le cœur a pour rôle d'assurer la circulation permanente du sang dans l'organisme afin de lui apporter l'oxygène et les nutriments nécessaires à son bon fonctionnement ainsi que de le débarrasser des déchets qu'il produit. Pour cela, le cœur, qui a le rôle de pompe, est relié à un circuit de distribution. L'ensemble forme ainsi le système cardiovasculaire. Ce réseau de distribution est composé de vaisseaux, de calibres et de résistances différentes. En effet, les artères, qui sont de gros vaisseaux, amènent le sang avec une pression élevée jusqu'aux artérioles puis capillaires qui sont de très petits vaisseaux permettant les échanges cellulaires. Le circuit de retour se fait avec une basse pression grâce aux veines.



Chaque côté du cœur est responsable d'un type de circulation. En effet, le cœur gauche assure la circulation systémique alors que le cœur droit assure la circulation pulmonaire.

Dans la circulation systémique, le sang, provenant des organes et appauvri en oxygène, est apporté par les veines jusqu'au cœur. Il est récolté au niveau de l'oreillette droite par les veines caves. Ce sang est transféré de l'oreillette au ventricule droit et est ensuite expulsé dans la circulation pulmonaire par l'artère pulmonaire. Au niveau des poumons, le sang veineux est réoxygéné et est redirigé vers le cœur grâce aux veines pulmonaires où il est collecté par l'oreillette gauche. Le sang, riche en oxygène, est transmis au ventricule gauche, qui lors de la contraction va l'expulser par l'aorte dans le reste de l'organisme (**Figure 5**).



**Figure 5:** Schéma de la circulation sanguine  
Image extraite du site [www.corpshumain.ca](http://www.corpshumain.ca)

Cette circulation sanguine est donc possible grâce aux mouvements cardiaques continus et cycliques qui alternent des phases de contraction et de relaxation. La contraction du myocarde est appelée systole et sa relaxation est appelée diastole. Les cycles cardiaques du cœur droit et du cœur gauche se produisent quasi simultanément mais les contractions des oreillettes et des ventricules se produisent avec quelques secondes de décalage.

Le cycle cardiaque, correspondant à un battement cardiaque, est aussi appelé révolution cardiaque et se divise en plusieurs étapes. Dans un premier temps, les ventricules se remplissent de sang, suite à la systole auriculaire, augmentant leur pression jusqu'à la fermeture des valves auriculo-ventriculaires. La contraction des ventricules augmente encore la pression permettant l'ouverture des valves artérielles et l'écoulement du sang, c'est la phase d'éjection systolique. Enfin, une fois la pression diminuée, il y a à nouveau remplissage des oreillettes, de façon passive due à la relaxation.

Ainsi, de la force de contraction du cœur dépendra le volume de sang éjecté dans les organes. Ce volume de sang est appelé volume d'éjection systolique (VES) et est de l'ordre de 100ml chez un homme adulte sain. Ce volume peut être calculé en soustrayant le volume de sang dans le ventricule gauche en fin de diastole (VTD : volume télédiastolique) par le volume en fin de systole dans le ventricule gauche (VTS : volume télésystolique). Ce volume dépend de facteurs intrinsèques décrits par la loi de Starling, de la taille du cœur, de sa force, de la durée de contraction et de facteurs extrinsèques comme les médicaments, les hormones, le système nerveux...

Ces paramètres cardiaques permettent le calcul de la fraction d'éjection (FE) qui est un indice du bon fonctionnement du cœur et qui permet de diagnostiquer certaines pathologies cardiaques. C'est un pourcentage calculé en divisant le VES par le VTD.

## 1.2. Epidémiologie et étiologie

D'après le dernier rapport des statistiques sanitaires mondiales publié en 2014 par l'organisation mondiale de la santé (OMS), l'espérance de vie des hommes et des femmes a augmenté d'environ 2 ans en un siècle. Ce phénomène est surtout visible dans les pays à revenus élevés où les progrès en termes de prévention, prise en charge et traitements de patients atteints de maladies cardiovasculaires ont été les plus notables<sup>1</sup>.

En revanche, malgré ces améliorations, les maladies cardiovasculaires sont toujours la première cause de mortalité dans le monde car elles sont très nombreuses dans les pays à revenus moyens ou faibles. En effet, en 2012, 17,5 millions de personnes sont décédées de maladies cardiovasculaires, soit 3 personnes sur 10. De plus, si on en croit les prédictions de l'OMS, d'ici les 15 prochaines années, le nombre de décès dus aux maladies cardiovasculaires devrait atteindre 23,3 millions de personnes<sup>2</sup>.

Parmi ces maladies sont répertoriées les maladies coronariennes, comme l'IDM qui représentent 40% des pathologies cardiovasculaires et les accidents vasculaires cérébraux qui représentent 35%<sup>3</sup>. Les autres maladies sont des artériopathies périphériques, des cardiopathies rhumatismales, des malformations cardiaques et des thromboses veineuses.

Récemment, le directeur de l'OMS, Margaret Chan, a publié un communiqué sur la situation mondiale visant à réduire les décès, d'ici 2025, dus aux maladies non transmissibles dont font partie les maladies cardiovasculaires. En effet, les facteurs de risque de ces maladies sont en partie contrôlables. Ainsi, les états membres de l'OMS se sont fixés des objectifs concernant 9 cibles d'action. Parmi ces cibles, on retrouve une réduction de l'usage nocif de l'alcool et du tabac, une augmentation de l'activité physique régulière, une alimentation plus contrôlée afin de réduire la recrudescence de l'obésité et du diabète, une meilleure prise en charge et accessibilité aux soins et médicaments<sup>16</sup>.

De plus, il est urgent de prendre en compte ces mesures d'action car si les maladies cardiovasculaires atteignent principalement les personnes âgées de plus de 60 ans, elles pourraient bien se déclarer beaucoup plus tôt compte-tenu de la tendance actuelle.

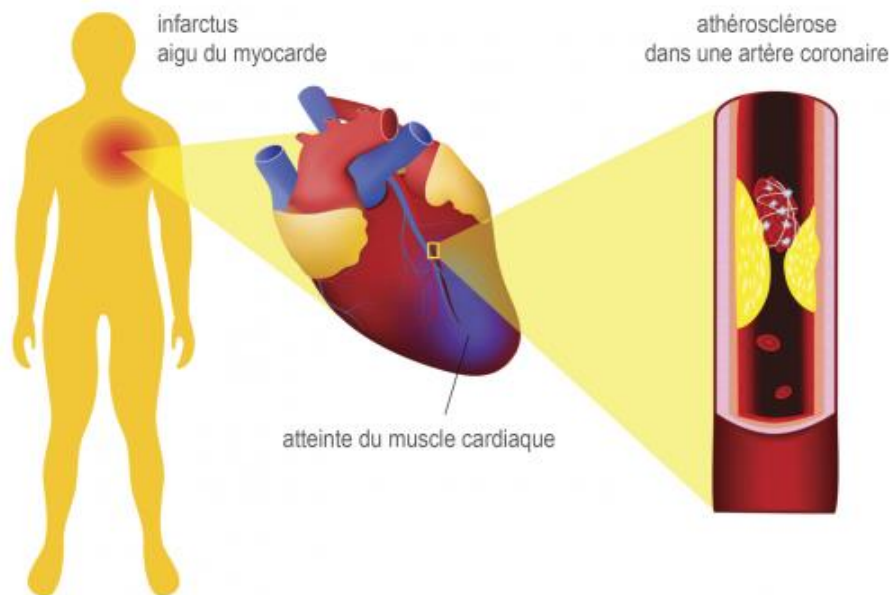
En effet, de façon alarmante, les cas d'obésité, un facteur de risque primordial des maladies cardio-vasculaires, ont doublé en 30 ans. D'autant plus que ce phénomène s'observe en majorité chez les enfants et les jeunes adultes<sup>16</sup>.

Les pays aux faibles ou moyens revenus sont les plus atteints par les maladies cardiovasculaires car ils sont beaucoup plus exposés aux facteurs de risque, tel que le tabagisme, l'alcool ou l'obésité. De plus, dans ces pays, les efforts réalisés pour améliorer les habitudes de vie sont moindres et les accès aux soins et médicaments sont plus difficiles. Ainsi les actions mises en œuvre par l'OMS doivent être renforcées dans ces pays.

### 1.3. L'athérosclérose et l'infarctus du myocarde

En 2012, la troisième définition universelle de l'IDM a été émise par un consensus de l'ESC (*European Society of Cardiology*)<sup>4</sup>. Traduite pour le site de cardiologie francophone, la définition de l'IDM est la suivante : *le terme IDM doit être utilisé lorsqu'il existe des preuves de nécrose myocardique dans un contexte clinique d'une ischémie myocardique aiguë*. En effet, on parle d'IDM lorsqu'une partie du muscle cardiaque subit une nécrose, c'est-à-dire une mort cellulaire due à un manque d'oxygène que l'on appelle ischémie. Dans un langage plus familier, on appelle ce phénomène « crise cardiaque ».

L'IDM se produit quand une ou plusieurs artères coronaires sont obstruées suite à la formation d'un thrombus qui conduit à l'arrêt de la circulation sanguine et donc à l'arrêt de l'apport en oxygène (**Figure 6**). Cette zone atteinte par l'ischémie est appelée zone infarctée et n'est plus capable d'assurer une contraction normale. Dans le cas d'une obstruction partielle, le cœur n'est pas totalement privé de son apport sanguin. Ainsi, la zone atteinte n'est pas nécrosée mais souffre du manque d'oxygène, on parle alors d'angor ou d'angine de poitrine. Le principal facteur de survenue d'un thrombus conduisant à l'IDM est la rupture d'une plaque athérosclérotique<sup>17</sup>.



**Figure 6:** L'infarctus du myocarde  
Image extraite du site : [www.medipédia.be](http://www.medipédia.be)

L'athérosclérose est considérée comme une maladie inflammatoire chronique. Elle résulte d'un métabolisme lipidique déséquilibré au niveau des parois artérielles impliquant les cellules musculaires, les cellules endothéliales et les cellules inflammatoires<sup>18</sup>. Parmi les nombreux facteurs de risque, qu'ils soient génétiques ou environnementaux, le taux élevé de cholestérol dans le sang, est l'unique facteur qui, à lui seul, peut entraîner le développement de l'athérosclérose.

L'athérosclérose débute par la formation de stries lipidiques des grosses et moyennes artères<sup>19</sup>. En effet, au cours du vieillissement artériel, la perméabilité de l'intima se voit augmenter, laissant ainsi pénétrer l'un des transporteurs du cholestérol dans le sang, les LDL (*low density lipoproteins*). Dans l'espace sous-endothélial, ces LDL subissent des modifications oxydatives qui conduiront à une migration des monocytes sanguins dans ce même espace sous-endothélial. Les monocytes sont ensuite différenciés en macrophages et vont se charger en LDL oxydés. De façon très explicite, les récepteurs des macrophages aux LDL oxydés sont appelés les récepteurs « charognards ». Chargés en LDL oxydés, les macrophages deviennent ainsi des cellules dites « spumeuses » créant ainsi un premier stade d'épaississement de la paroi endothéliale<sup>20</sup>.

La création d'une lésion endothéliale entraîne également le recrutement des lymphocytes T au niveau des stries lipidiques. Ils interagissent alors avec les cellules spumeuses et provoquent un processus d'inflammation chronique<sup>21</sup>. En effet, des cytokines sont sécrétées ce qui a pour effet de stimuler la prolifération des cellules musculaires lisses qui vont elles-mêmes sécréter des protéines de la MEC. Ce phénomène renforce à nouveau l'épaississement intimal par la formation d'une plaque fibreuse.

Du fait de l'environnement cytotoxique de la lésion artérielle, les macrophages vont entrer en nécrose<sup>22</sup> et les cellules musculaires lisses dériver en cellules spumeuses. L'accumulation de cellules nécrosées, de composantes de la MEC et de cholestérol forme ainsi un corps nécrotique qui tend une fois de plus à épaissir la plaque d'athérome.

Ce phénomène réduisant considérablement le diamètre du vaisseau entraîne une diminution de l'apport sanguin et conduit à l'angor. Ces plaques peuvent rester silencieuses pendant plusieurs mois voire plusieurs années ou évoluer vers des complications qui entraîneront un thrombus révélant ainsi la maladie.

En effet, la plaque peut se rompre et former une thrombose en aval. Un phénomène d'érosion du tissu endothélial est également possible, ce qui conduira à l'adhésion plaquettaire sur la paroi endothéliale et donc à un thrombus. Enfin, une hémorragie intra-plaque peut être observable ce qui augmentera considérablement le volume de la plaque et causera à nouveau l'obstruction de l'artère.

La taille de l'IDM sera donc déterminée par la taille du territoire vascularisé par l'artère obstruée. Cependant, une circulation collatérale peut réduire les dommages causés par l'ischémie dans une zone.

La survenue de l'IDM se manifeste par une soudaine douleur thoracique comprimant la poitrine et pouvant se propager jusqu'au bras gauche. Ces douleurs peuvent s'accompagner de sueurs, nausées, vomissements, de fatigue ou encore d'un essoufflement. Il est essentiel qu'à la suite de ces symptômes, la prise en charge se fasse de façon rapide pour limiter l'extension de la zone infarctée. La prise en charge débute par un questionnaire du patient afin de retrouver un éventuel facteur déclenchant de la douleur mais aussi afin de connaître les antécédents médicaux. Ensuite, des examens sanguins et des examens d'imagerie sont réalisés.

L'examen d'imagerie médicale est une échocardiographie qui va rechercher des troubles du rythme cardiaque en renseignant sur la morphologie et la fonction cardiaque. L'électrocardiogramme (ECG), réalisé en même temps, permet de visualiser des modifications des ondes visibles. En effet, une apparition d'onde Q pathologique ou une élévation du segment ST (patients appelés STEMI) permet de rapidement caractériser un patient atteint d'un IDM. En revanche, certains patients atteints d'IDM ne présentent pas d'élévation du segment ST (patients appelés NSTEMI), c'est pour cela que des examens sanguins sont également réalisés<sup>4</sup>.

L'examen sanguin mesure des biomarqueurs spécifiques des dommages cardiaques comme les troponines cardiaques. Cela dit, pour être concluantes, les mesures sanguines doivent être réalisées dans les quelques heures post-IDM<sup>23</sup>.

Afin d'améliorer le pronostic vital des patients de façon considérable, la technique de reperfusion est pratiquée<sup>24</sup>. Elle consiste en l'élimination du thrombus par différentes techniques afin de rétablir la circulation sanguine. Cependant, elle est bien souvent réalisée trop tard pour éviter l'IDM puisqu'elle n'est pratiquée qu'après l'admission à l'hôpital du patient suite aux douleurs thoraciques. Cette stratégie a permis d'améliorer considérablement la survie des patients après IDM mais a aussi augmenté la proportion de patients atteints d'IC<sup>25</sup>. En effet, lorsque la zone d'IDM est importante, le cœur subit des modifications physiologiques et fonctionnelles appelées remodelage ventriculaire<sup>5</sup>. Dans le cas d'un remodelage délétère, le patient développe une maladie encore mal caractérisée, l'IC.

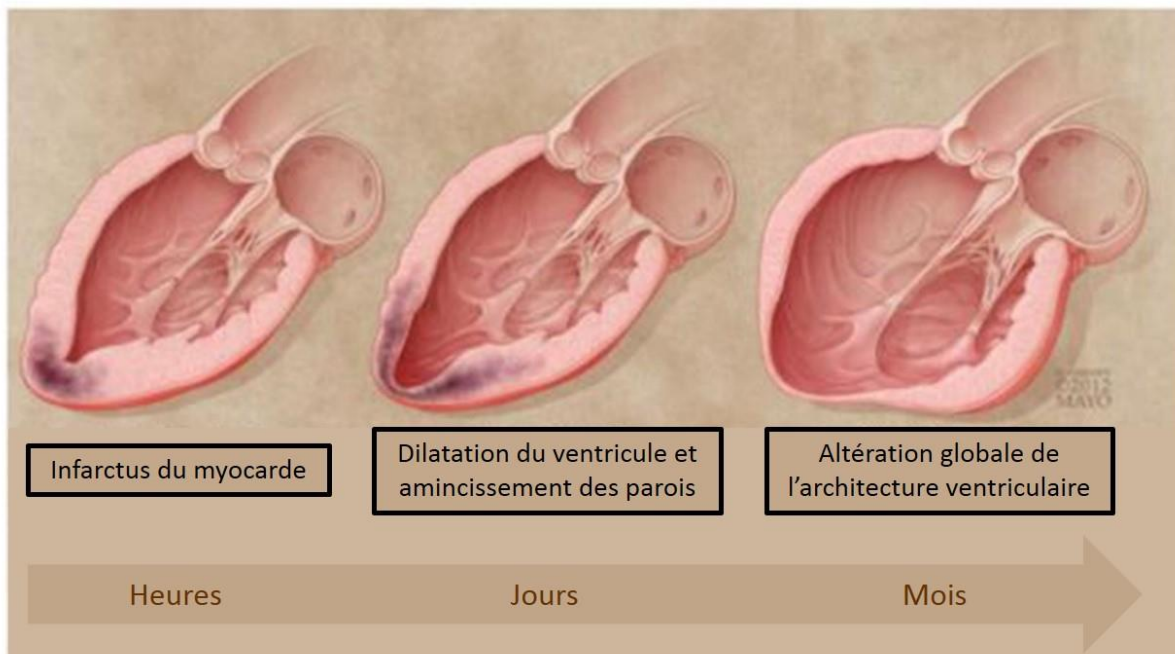
De nombreux traitements sont donc testés sur le long terme afin de prévenir ou de limiter l'IC, responsable de la majorité des cas de mortalité post-IDM<sup>26, 27</sup>. Malheureusement ces stratégies n'ont pas encore montré toute leur efficacité, d'où la nécessité de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques permettant de réduire les dommages de l'IDM ou de la survenue de l'IC.



## 1.4. Le remodelage ventriculaire post-infarctus

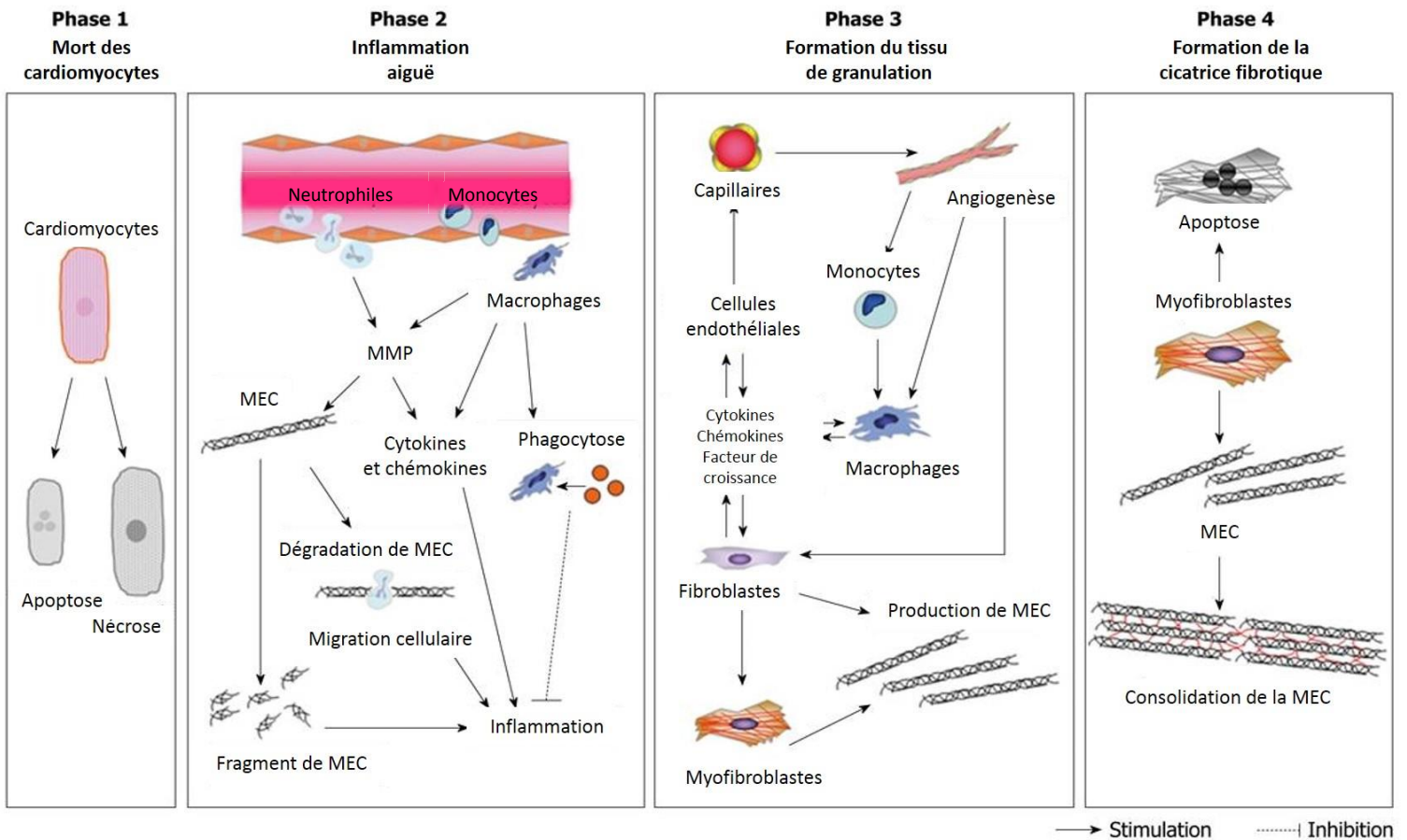
Le remodelage ventriculaire gauche a été défini comme le processus par lequel la taille, la forme et la fonction du cœur sont régulées par des facteurs mécaniques, neurohormonaux et génétiques<sup>5, 28</sup>. Le remodelage est un processus, qui est au départ physiologique et adaptatif durant la croissance, qui peut devenir délétère et pathologique en cas d'hypertension, de cardiomyopathie ou encore après un IDM. Le remodelage ventriculaire fait référence aux changements architecturaux de la zone atteinte par l'IDM ainsi que de la zone saine.

Il en résulte, dans une phase précoce, une dilatation du ventricule gauche liée à un amincissement de la paroi ventriculaire. Ceci entraîne de façon très précoce une augmentation du stress des parois en phase de diastole et de systole conduisant à l'apparition d'une hypertrophie ventriculaire<sup>29</sup>. Dans une phase de remodelage tardif, on observe une hypertrophie des cardiomyocytes<sup>30</sup> ainsi que des altérations globales dans l'architecture ventriculaire, notamment des rigidifications de la paroi et la formation d'un tissu cicatriciel (**Figure 7**). L'intensité du remodelage est corrélée avec la taille de la zone initialement atteinte par l'IDM<sup>28</sup>.



**Figure 7:** Représentation du cœur présentant un remodelage ventriculaire post-IDM  
Image traduite d'après Dunlay et Roger, 2012<sup>31</sup>

En 2010, Matsui et al. décrivent le remodelage en le divisant en 4 phases<sup>32</sup> : (1) mort cellulaire des cardiomyocytes, (2) inflammation aiguë, (3) formation d'un tissu de granulation (4) formation d'une cicatrice mature (**Figure 8**).



**Figure 8:** Les 4 phases du remodelage ventriculaire post-IDM  
Image traduite de la publication de Matsui et al., 2010<sup>32</sup>

Dès l'apparition de l'IDM, le cœur va subir des changements pour pallier le phénomène de perte cellulaire et générer des régions spécifiques avec des environnements cellulaires particuliers<sup>33</sup>. En effet, après 30 minutes d'ischémie, les cardiomyocytes subissent une mort cellulaire irréversible (1) qui va induire une réponse inflammatoire aiguë et marquer le début du remodelage ventriculaire.

La mort de ces cellules va provoquer un relargage d'une série de molécules comme les troponines, la CPK ou la myoglobine (MB) mais aussi un cocktail de molécules chimioattractantes déclenchant la phase inflammatoire aiguë (2).

Dans cette phase, les neutrophiles et les macrophages infiltrent la zone infarctée afin de nettoyer les débris cellulaires du site inflammatoire qu'est la blessure cardiaque. Pour pénétrer dans le tissu, les cellules inflammatoires relarguent des métalloprotéinases (MMP) qui vont dégrader la MEC<sup>34</sup>. Après la phagocytose des myocytes nécrotiques et grâce à la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance par les cellules inflammatoires, les cellules endothéliales et les fibroblastes prolifèrent et migrent dans la zone infarctée<sup>35</sup>.

Le tissu nécrosé est remplacé progressivement par un tissu de granulation ou cicatrice immature (3) qui permet de combler la perte myocardique consécutive à l'IDM. Il est formé grâce à l'association de fibroblastes, de myofibroblastes et de vaisseaux sanguins nouvellement formés ainsi que de la MEC riche en collagène sécrétée par les fibroblastes et les myofibroblastes. Cette cicatrisation est essentielle dans un premier temps pour ne pas entraîner la rupture de la paroi ventriculaire<sup>36</sup>. De plus, afin de compenser la baisse de contractilité de la zone infarctée, les cardiomyocytes de la zone bordante et de la zone non infarctée deviennent hypertrophiques<sup>37</sup>.

La dernière phase est la formation de la cicatrice (4), appelée aussi phase de remodelage tardif. Elle débute en moyenne à partir de 15 jours et peut se poursuivre sur plusieurs mois voire plusieurs années<sup>28, 32</sup>. Cette phase est essentielle puisqu'elle peut permettre la restauration de la fonction cardiaque ou conduire à l'apparition d'une IC. Durant cette période, le tissu de granulation est remplacé par un tissu cicatriciel riche en collagène et on observe également une mort importante des myofibroblastes. Ceci entraîne une rigidification du myocarde qui tend à diminuer la contractilité myocardique.

## 1.5. L'insuffisance cardiaque

L'IC est une maladie grave survenant après une affectation du cœur, comme une coronaropathie, un IDM ou encore de l'hypertension ayant exercé une surcharge sur le cœur. L'IC peut se produire à tout âge mais elle est bien plus présente chez les personnes âgées. En effet, elle représente la cause la plus fréquente d'hospitalisation des plus de 65 ans<sup>38</sup>. Le site internet *heartfailurematters.com* explique de façon très claire cette pathologie et fournit de nombreuses informations pour les patients, les aidants et le personnel soignant.

L'IC est caractérisée par le fait que le cœur n'est plus capable de maintenir une fonction suffisante pour subvenir aux besoins nutritionnels de l'organisme<sup>6</sup>. Effectivement, les modifications conformationnelles et structurelles entraînées par le remodelage ventriculaire conduisent à l'affaiblissement de la fonction cardiaque. Cette défaillance peut être due à une anomalie de contraction, on parle alors de défaillance systolique, ou à une anomalie de remplissage que l'on appelle défaillance diastolique. Ceci est responsable d'une baisse de débit sanguin et ainsi d'une baisse de l'apport en ressources énergétiques et métaboliques au reste de l'organisme. Ceci signifie également que les déchets de l'organisme ne sont plus éliminés correctement.

La baisse de l'apport nutritionnel et l'accumulation de déchets dans l'organisme entraînent dans un premier temps une fatigue. De plus, le sang non pompé par le cœur s'accumule, causant une fuite des liquides vers les tissus environnants. Ce phénomène est responsable d'une rétention d'eau dans l'abdomen et les membres provoquant un gain de poids et le gonflement des chevilles. La respiration est également affectée puisque la rétention d'eau peut occasionner une congestion des poumons.

Le cœur s'adapte dans une première période à ces changements mais à long terme, il n'est plus capable de compenser. Les conséquences sur le corps sont donc diverses puisque l'organisme va tenter de préserver le débit sanguin. Au niveau cardiaque, il y aura donc une accélération du rythme et une dilatation ventriculaire pour tenter de maintenir une FE correcte.

Les reins sont l'un des organes touchés par la tentative d'adaptation du corps à l'IC puisque le corps va tenter de préserver l'apport sanguin vers le cerveau et le cœur au dépend des autres organes. Ainsi, il y a une baisse de la filtration du sang au niveau des reins et donc une accumulation de déchets sanguins. Quelle que soit l'affectation, bien souvent, l'état général empire et affaiblit encore plus le cœur et le patient.

Les mécanismes conduisant à l'apparition d'un remodelage délétère et donc à terme à l'IC ne sont pas encore bien caractérisés. Compte-tenu de la proportion de patients atteints de cette pathologie et des conséquences dramatiques sur l'ensemble de l'organisme qu'elle cause, il paraît indispensable de continuer les recherches dans ce domaine. Il apparaît comme évident qu'une fois le cœur atteint d'IC, il est trop tard pour revenir en arrière et espérer retrouver une conformation cardiaque normale. C'est pourquoi il est essentiel de comprendre les mécanismes entraînant l'apparition de l'IC et donc les mécanismes de passage d'un remodelage ventriculaire normal à un remodelage ventriculaire délétère.

Ainsi, deux axes complémentaires de recherche sont privilégiés dans l'étude de l'IC. Il est important dans un premier temps d'identifier de nouveaux biomarqueurs capables de prédire la survenue de l'IC. Ensuite, il est nécessaire de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques pour prévenir et empêcher l'apparition de l'IC.

## 1.6. Les biomarqueurs

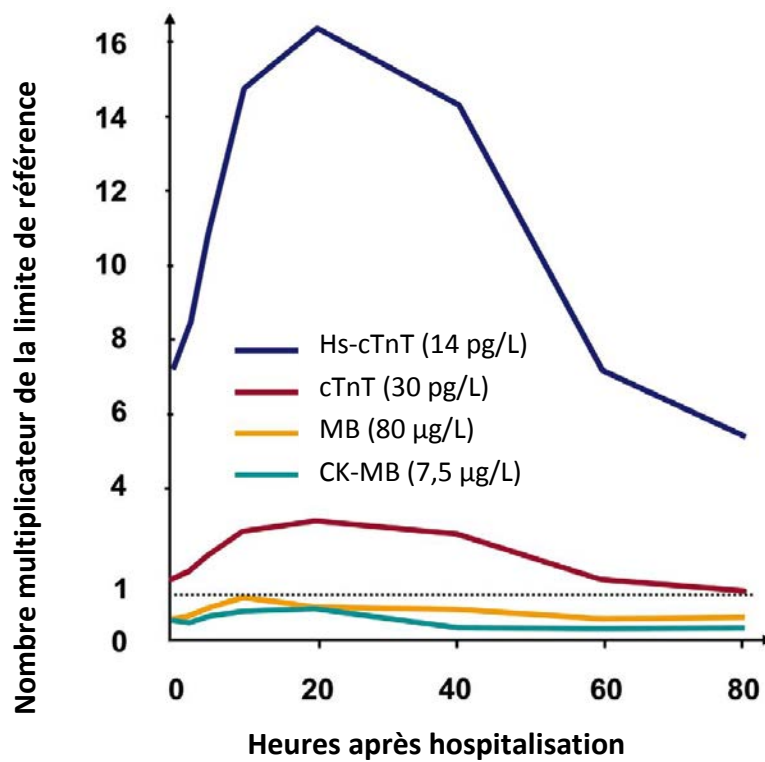
Un biomarqueur est désigné comme un paramètre mesurable et quantifiable lié à un processus physiologique ou pathologique. Les biomarqueurs servent d'outil diagnostique pour dépister la maladie d'un patient ou le stade de la maladie et servent d'outil pronostique pour prédire l'évolution d'une maladie ou la réponse à un traitement.

Un bon biomarqueur doit posséder diverses qualités. Il doit être mesurable en routine de façon rapide et peu coûteuse et facilement accessible de façon non invasive c'est-à-dire être par exemple présent dans les fluides biologiques humains. Lors d'une suspicion d'IDM, un ECG est réalisé et le diagnostic est basé sur l'élévation du segment ST (patients STEMI). Malheureusement les patients atteints d'IDM ne présentent pas toujours d'élévation du segment ST (patients NSTEMI) et c'est pour cela qu'il est nécessaire, pour le diagnostic, de combiner l'ECG à d'autres marqueurs tels que les troponines cardiaques<sup>39</sup>.

Les biomarqueurs biochimiques sont essentiellement des biomarqueurs circulants, c'est-à-dire qu'ils sont mesurés au niveau plasmatique à partir du sang périphérique. Les biomarqueurs circulants représentent des outils intéressants pour la médecine personnalisée. Les protéines et les ARNs sont apparus comme deux familles sources de biomarqueurs. Parmi les ARNs, les ARNs messagers (ARNm) ont été les premiers à être étudiés<sup>40-44</sup> mais les miARNs sont rapidement apparus comme des ARNs avec un très bon potentiel de biomarqueur<sup>45</sup>.

A l'heure actuelle, le marqueur biochimique prédominant et mesuré en priorité pour la détection d'un IDM est l'isoforme T de la troponine cardiaque (cTnT)<sup>46</sup>. Les troponines, notamment les isoformes I et T, sont des protéines situées dans le muscle cardiaque qui sont impliquées dans la contraction cellulaire<sup>47</sup>. Lors de l'IDM, les cardiomyocytes entrent dans un état de mort cellulaire et perdent leur intégrité entraînant la libération de leur contenu dans le sang. Ainsi les troponines sont facilement mesurables dans la circulation et spécifiques du cœur.

De plus, un individu sain ne possède pas de troponine dans son plasma. Les troponines commencent à être détectables dans le sang entre 3 et 6 heures après le début de la nécrose myocardique et atteignent leur maximum 24 heures après. Les troponines sont mesurées dans le sang grâce à des outils immunologiques qui ont connu une importante amélioration dernièrement. En effet, aujourd'hui on mesure les cTnT de façon hypersensible (hs-cTnT) avec un bruit de fond considérablement réduit par rapport aux premières techniques<sup>46, 48, 49</sup> (**Figure 9**).



**Figure 9:** Amélioration de la sensibilité de la mesure de la troponine cardiaque T (cTnT) avec les nouvelles techniques de détection hypersensible (hs-cTnT) et comparée à des marqueurs classiques comme la myoglobine (MB) et la créatine kinase MB (CK-MB).

Graphique d'après Mueller et al., 2013<sup>46</sup>

Effectivement, la sensibilité des dosages de la hs-cTnT pour une mesure prise à 24 heures après l'hospitalisation par exemple est multipliée par 5 par rapport à un dosage de cTnT classique. De plus, par rapport à d'autres marqueurs également mesurés en routine, comme la MB ou la créatine kinase MB (CK-MB), la sensibilité est multipliée par 15. Ceci démontre la qualité de ces nouvelles techniques de dosage (**Figure 9**).

La MB, tout comme la CK-MB sont présentes dans les cellules des muscles striés dont le myocarde mais ne sont donc pas spécifiques du cœur. En revanche, ces marqueurs sont tout de même mesurés car ils présentent l'avantage d'être relargués très tôt dans le sang après l'IDM et permettent d'estimer le moment de survenue de l'IDM. D'autres marqueurs, beaucoup moins spécifiques et beaucoup plus anciens montrent une atteinte cardiaque comme l'enzyme hépatique ASAT, l'enzyme cytoplasmique LDH ou encore la créatine phosphokinase (CPK)<sup>50</sup>.

La protéine C-réactive, protéine sécrétée par le foie en cas d'inflammation aiguë, est un autre marqueur connu depuis les années 90. Il peut être utilisé comme un marqueur pronostique des maladies coronariennes et utilisé pour stratifier et prévenir le risque<sup>51</sup>.

Concernant les pronostics liés à l'évolution post-IDM, les marqueurs étudiés sont tout d'abord les paramètres cardiaques comme les VTD et VTD et la FE. Ces paramètres sont étudiés grâce à des techniques d'imagerie comme l'échocardiographie, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou la tomographie à émission de positrons (TEP).

Cependant des dosages biochimiques sont également réalisés dans le plasma des patients<sup>52</sup>. En effet, le peptide BNP (*brain natriuretic peptide*) et son précurseur le Nt-proBNP (*N-terminal pro-brain natriuretic peptide*) sont sécrétés par les cardiomyocytes en cas d'IC. Ce sont ces biomarqueurs qui sont actuellement mesurés pour pronostiquer l'apparition de l'IC. Malheureusement ces deux peptides ne sont pas spécifiques de l'IC et peuvent être sécrétés en cas de diabète, d'insuffisance rénale, de cirrhose, d'hyperthyroïdie<sup>53</sup>...



Ainsi, ceci explique le fait qu'il n'y ait pas encore de consensus pour prédire l'évolution des patients après IDM<sup>54</sup>. Les seuls prédicteurs de mortalité sont les paramètres cardiaques mesurés par des techniques d'imagerie mais il est clair que chaque patient est différent et suit sa propre évolution. De plus, lorsque les patients présentent des dysfonctions trop importantes et donc des paramètres cardiaques très différents d'un sujet sain, le pronostic vital est déjà engagé.

De nombreux candidats ont été reconnus comme potentiels biomarqueurs pronostiques de l'IC comme la galectine 3<sup>55</sup>, l'angiogénine<sup>56</sup> ou des hormones thyroïdiennes<sup>57</sup>. Toutefois, aucun de ces marqueurs n'est encore recommandé en pratique clinique.

Ceci nous montre l'importance de trouver de nouveaux biomarqueurs pour améliorer le diagnostic et surtout le pronostic de l'évolution cardiaque post-IDM.

## 1.7. Les cibles thérapeutiques

Une cible thérapeutique est définie comme un élément quelconque de l'organisme pouvant être modulé afin de rétablir un phénotype normal au dépend d'un phénotype pathologique. La recherche fondamentale s'affaire constamment à trouver de nouvelles cibles thérapeutiques dans tous les domaines de recherche. Une base de données a été créée pour répertorier les cibles existantes reconnues (2025 en 2011) et celles en cours de recherche (1331 en 2011)<sup>58</sup>. Dans la majorité des cas, ces cibles thérapeutiques sont des protéines ou des séquences nucléotidiques.

Dans le contexte des maladies cardiovasculaires, on trouve de nombreuses cibles thérapeutiques. Au niveau protéique par exemple, le récepteur à l'aldostérone a été approuvé comme une cible thérapeutique dans l'athérosclérose<sup>59</sup> et dans l'IC<sup>60</sup>. Ceci a donné lieu à la création d'une molécule appelée éplérénone capable de moduler la voie de l'aldostérone et donc d'améliorer l'hypertension et par conséquence l'IC.

Parmi les cibles thérapeutiques d'origine protéique, on trouve également la très connue enzyme de conversion de l'angiotensine impliquée une seconde fois dans les mécanismes de régulation de la pression artérielle. Ainsi, de nombreuses drogues ont été produites afin de diminuer sa fonction, diminuant ainsi la production de l'angiotensine II et entraînant une baisse de la pression artérielle importante en cas d'hypertension et d'IC<sup>61</sup>.

Enfin, on peut citer l'exemple du facteur de coagulation X, impliqué dans la voie de la coagulation et ciblé dans des thérapies anti-thrombotiques limitant ainsi les survenues des IDM<sup>62</sup>.

Malheureusement, le ciblage par les médicaments ne suffit pas et présente de nombreuses limitations et effets secondaires. Il y a donc un réel manque de nouvelles cibles thérapeutiques permettant d'améliorer l'état de santé des patients atteints de maladies cardiovasculaires.

L'évolution des connaissances à propos du génome humain et le développement de nouvelles technologies d'analyse du génome ont permis de comprendre que les gènes ont un rôle essentiel dans les pathologies et notamment dans les maladies cardiovasculaires.

Ainsi certaines recherches fondamentales portant sur la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques se sont intéressées aux cibles thérapeutiques nucléotidiques.

Si l'on s'intéresse aux cibles thérapeutiques nucléotidiques, on parle inévitablement de thérapie génique qui consiste en la modulation de gènes pour le traitement de pathologies. Il peut s'agir de gènes manquants ou déficients que l'on va compléter afin de rétablir une production normale de protéines. Au contraire, il peut s'agir de gènes dont l'expression est devenue pathologique car trop importante et dans ce cas, il sera nécessaire d'inhiber la production de protéines.

Par exemple, il a été montré que la glycogène kinase/synthase 3 est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation et de nombreuses maladies dont l'IC. Il a été récemment montré de façon expérimentale que la délétion du gène codant pour cette enzyme permettrait de diminuer le remodelage ventriculaire et d'améliorer la fonction cardiaque après IDM en limitant l'expansion de la cicatrice et en augmentant la prolifération des cardiomyocytes<sup>63</sup>.

Des essais cliniques ont brillamment montré que l'augmentation par thérapie génique de l'enzyme SERCA2a permettrait de réduire les symptômes liés à l'IC<sup>64</sup>. Il en est de même pour l'augmentation de l'expression de SDF-1 (*stromal cell-derived factor-1*)<sup>65</sup>.

Malheureusement, la thérapie génique n'est pas un outil simple d'utilisation et fait face à des problèmes techniques, de spécificité et de ciblage.

Un grand nombre de techniques ont été mises en place dans les stratégies de thérapie génique de façon virale ou non virale<sup>66</sup>. Les techniques non virales permettant d'augmenter l'expression d'un gène, utilisent des séquences d'ADN « nues » qui doivent être, pour éviter leur dégradation, incluses dans des vecteurs circulaires possédant un promoteur et un site polyadénylé<sup>67</sup>. Ils sont simples à produire mais ne sont malheureusement pas très spécifiques et ne sont pas très efficaces. Au contraire, les séquences permettant l'inhibition d'un gène ne sont pas contenues dans un vecteur mais ont une longueur nucléotidique bien plus faible. Ce sont les petits ARNs interférents (siARNs) qui sont bien plus spécifiques.

Pour augmenter l'expression des gènes, on peut également employer des vecteurs viraux qui sont beaucoup plus utilisés pour l'application dans les maladies cardiovasculaires car ils sont beaucoup plus efficaces pour un transfert dans les cardiomyocytes. Il existe différents types de vecteurs viraux mais les plus intéressants sont les virus adéno-associés (AAV) qui sont très efficaces et ne déclenchent que très peu de réactions immunitaires au contraire des adénovirus. Ils sont même capables de délivrer le gène plusieurs années après l'injection du virus<sup>68</sup>.

Le plus difficile dans la thérapie génique est de libérer le gène à l'endroit souhaité pour que la surexpression ou l'inhibition du gène soit bien localisée dans l'organisme. Des essais ont testé des injections directement dans le myocarde montrant une efficacité plutôt intéressante mais une inflammation dues aux injections trop importantes<sup>69</sup>. Des perfusions intra-coronaires ont été testées mais l'efficacité est nettement moins importante qu'avec des injections intramyocardiques<sup>70</sup>. Une autre technique très attractive est celle de « la peinture péricardique » qui consiste à appliquer le vecteur directement sur le cœur. Les données précliniques ont montré une transmission vers les cellules très intéressante<sup>71</sup>.

La thérapie génique est donc un outil avec un potentiel réel pour le traitement des patients mais qui doit être encore considérablement améliorée pour pallier aux problèmes de spécificité, de ciblage et de réponse immunitaire<sup>66</sup>. De plus, il existe encore un manque important de cibles thérapeutiques dans les maladies cardiovasculaires puisqu'il n'est pas encore possible de prévenir le développement d'un remodelage ventriculaire post-IDM par exemple, ce qui explique la poursuite des recherches dans ce domaine.

A l'heure actuelle, bien que les mécanismes de passage d'un remodelage ventriculaire normal à un remodelage ventriculaire délétère ne soient que partiellement connus, on sait qu'ils impliquent des modulations de l'expression génique<sup>7</sup>.

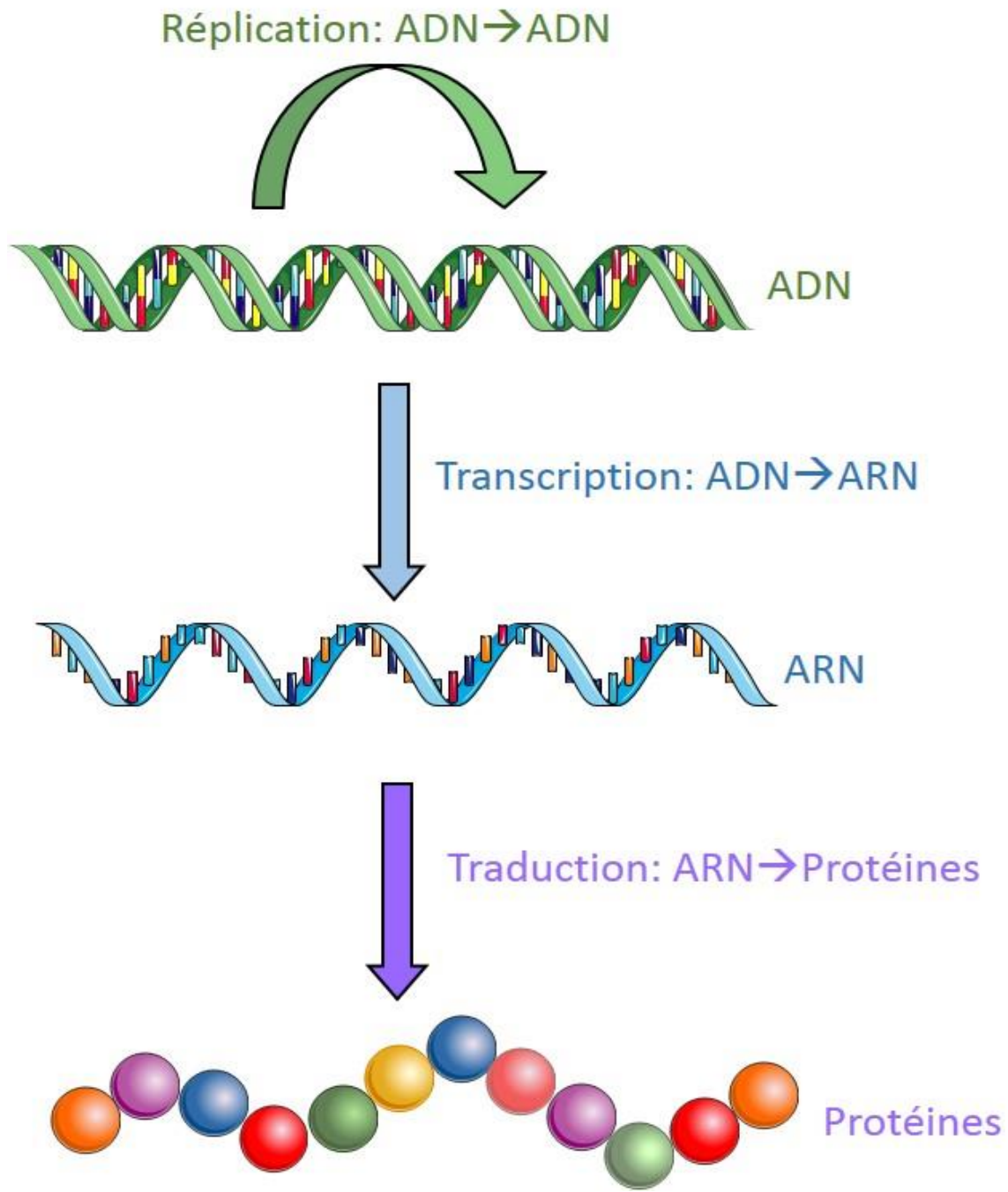
## Chapitre 2. Les ARNs non codants

### 2.1. Le dogme central de la biologie moléculaire

Tout être vivant, qu'il soit simple ou complexe, est constitué d'entités structurales, fonctionnelles et autonomes appelées cellules. On considère qu'il existe deux types fondamentaux de cellules, les procaryotes et les eucaryotes, différenciés par la complexité de leur organisation. En effet, les cellules procaryotes ne possèdent qu'une organisation intracellulaire très simple alors que les cellules eucaryotes sont composées de nombreux compartiments intracellulaires comprenant notamment le noyau.

Le noyau a un rôle essentiel dans la cellule eucaryote puisqu'il stocke la majorité du matériel génétique nécessaire au fonctionnement de l'organisme. L'information génétique est stockée sous forme d'acides désoxyribonucléiques (ADN) qui seront transmis sous une forme quasi identique au fil des générations. Dans le noyau, l'ADN se trouve sous une forme organisée et compactée, que l'on appelle chromosome.

L'information génétique, constituant le génotype, est exprimée et donne lieu aux caractères et fonctions de la cellule, appelé phénotype. Les mécanismes d'expression du génotype sont régis par le dogme central de la biologie moléculaire, formulé par Crick en 1958. Cette théorie repose sur le fait que l'ADN contenant toute l'information génétique, est capable d'être répliqué de façon identique pour être transmis mais aussi être transcrit en ARN, lui-même traduit en protéines. Cette hypothèse est souvent illustrée par le schéma de la **Figure 10**.



**Figure 10:** Le dogme central de la biologie moléculaire émis par Francis Crick, en 1958  
Images extraites de la banque d'image Servier Medical Art<sup>®</sup>

Dans le dogme de la biologie moléculaire, la première partie décrit le mécanisme de réplication. Il permet, lors de la division cellulaire, de dupliquer les molécules d'ADN « parents » en deux molécules « filles » et ainsi de conserver le matériel génétique de cellules en cellules. Après séparation des deux hélices de la molécule d'ADN, chaque brin constitue une matrice modèle pour la synthèse d'un nouveau brin identique. Cette synthèse est catalysée par des enzymes appelées ADN polymérases.

La transcription, deuxième étape décrite dans la théorie de Crick, est le processus par lequel l'ADN s'exprime. En effet, l'ADN est « uniquement » un support à l'information génétique mais ne permet pas la formation de protéines. Il est nécessaire de passer par l'étape de transcription où l'ADN est copié et transcrit en molécules d'ARN dites « messagers » (ARNm). Cette étape a lieu dans le noyau de la cellule et est catalysée par l'ARN polymérase.

Enfin, la dernière étape du dogme central a été décrite comme le processus de traduction. En effet, cette étape ultime permet d'obtenir des protéines, molécules formées par l'association d'acides aminés. Cette synthèse est réalisée grâce au code génétique contenu dans la séquence d'ARNm. La traduction se produit dans le cytoplasme de la cellule et en partie grâce aux ribosomes.

Ces concepts, émis il y a plus de cinquante ans avec une vision réductrice, ont bien sûr évolué et ont été décrites en détail. Cependant, ce dogme central est toujours au cœur de la biologie moléculaire.

## 2.2. Histoire des ARNs non codants

A cette époque les gènes étaient définis comme des séquences d'ADN, transcrites en ARNs codants pour des protéines. Le reste du génome était considéré comme de l'ADN « déchet » mais il intéressa fortement la communauté scientifique qui ne pouvait pas croire que de longues séquences d'ADN soient inutiles<sup>72</sup>. Ainsi, l'ARN de transfert (ARNt) et l'ARN ribosomique (ARNr), ayant des fonctions essentielles lors de la transcription, furent découverts. Ces ARNs furent nommés ARNs non codants. Ceux-ci interviennent dans de nombreux processus essentiels, tels que la régulation transcriptionnelle, la régulation traductionnelle, la maturation des ARNm, la synthèse des protéines, la structure cellulaire...

En plus de la diversité de fonction des ARNs non codants, il fut découvert que les ARNs non codants pouvaient avoir des tailles totalement différentes, de quelques paires de bases à plusieurs milliers de nucléotides. Certaines des séquences avec un grand nombre de nucléotides furent appelées ARNs non codants « ARNm-like », du fait de leur forte ressemblance avec les ARNm. En effet, de façon similaire aux ARNm, ces ARNs non codants de grande taille sont transcrits par l'ARN polymérase, sont épissés, sont coiffés en 5' et polyadénylés en 3' <sup>73</sup>.

L'intérêt pour les ARNs non codants explosa en 2012, lorsque le consortium ENCODE (*ENCyclopedia of DNA Elements*) révéla que seul 2% du génome humain est transcrit en ARNs codants pour des protéines<sup>74</sup>. Depuis, les améliorations en matière de séquençage et d'analyse informatique ont permis de contribuer à une meilleure caractérisation des ARNs non codants, leur donnant une nouvelle définition.

En effet, les ARNs non codants sont aujourd'hui catégorisés en deux groupes : les petits ARNs non codants ayant un nombre de paires de base inférieur à 200 nucléotides et les longs ARNs non codants (lncARNs) contenant plus de 200 nucléotides <sup>75</sup>.



## 2.3. Les miARNs

Les miARNs sont des petits ARNs qui ne codent pas pour des séquences protéiques et qui possèdent un nombre de nucléotides compris entre 18 et 22 et sont sous forme simple brin.

Les miARNs ont la capacité d'inhiber l'expression des gènes soit en inhibant la traduction des ARNm cibles soit en entraînant leur dégradation. Ces mécanismes ont lieu grâce à la complémentarité de séquence existante entre le miARN et son ARNm cible.

La régulation des gènes par les miARNs a déjà été longuement étudiée et intervient dans des conditions physiologiques mais également pathologiques comme les cancers<sup>76</sup>, les infections virales<sup>77</sup>, les désordres neurologiques<sup>78</sup>, et également les maladies cardiovasculaires<sup>79</sup>. De plus, la régulation des gènes par les miARNs est présente de façon quasi ubiquitaire puisqu'on la retrouve dans de nombreux mécanismes comme la prolifération, la différenciation, le métabolisme, l'apoptose...

### 2.3.1. Biogénèse des miARNs et régulation des ARNm

Les régions codantes pour des miARNs peuvent provenir dans le génome de régions intergéniques, de régions introniques pour des gènes codants ou non codants ou encore de transcrits primaires polycistroniques.

La voie la plus classique de biogénèse des miARNs (**Figure 11**)<sup>80</sup> se déroule dans le noyau et débute par la transcription d'un gène grâce à l'ARN polymérase II aboutissant à la formation d'une séquence appelée pri-miARN. Ce pri-miARN est un transcrit constitué d'une séquence double brin de plusieurs centaines de nucléotides, ayant un motif tige-boucle et présentant, aux deux extrémités 5' et 3', une polyadénylation. Le pri-miARN est ensuite clivé en un fragment de 60 à 70 nucléotides appelé pré-miARN et présentant toujours la structure tige-boucle.

Cette étape est réalisée grâce à un complexe protéique de reconnaissance et de clivage, contenant la ribonucléase III appelée Drosha et son partenaire protéique DGCR8 (*di george syndrome critical region gene 8*).

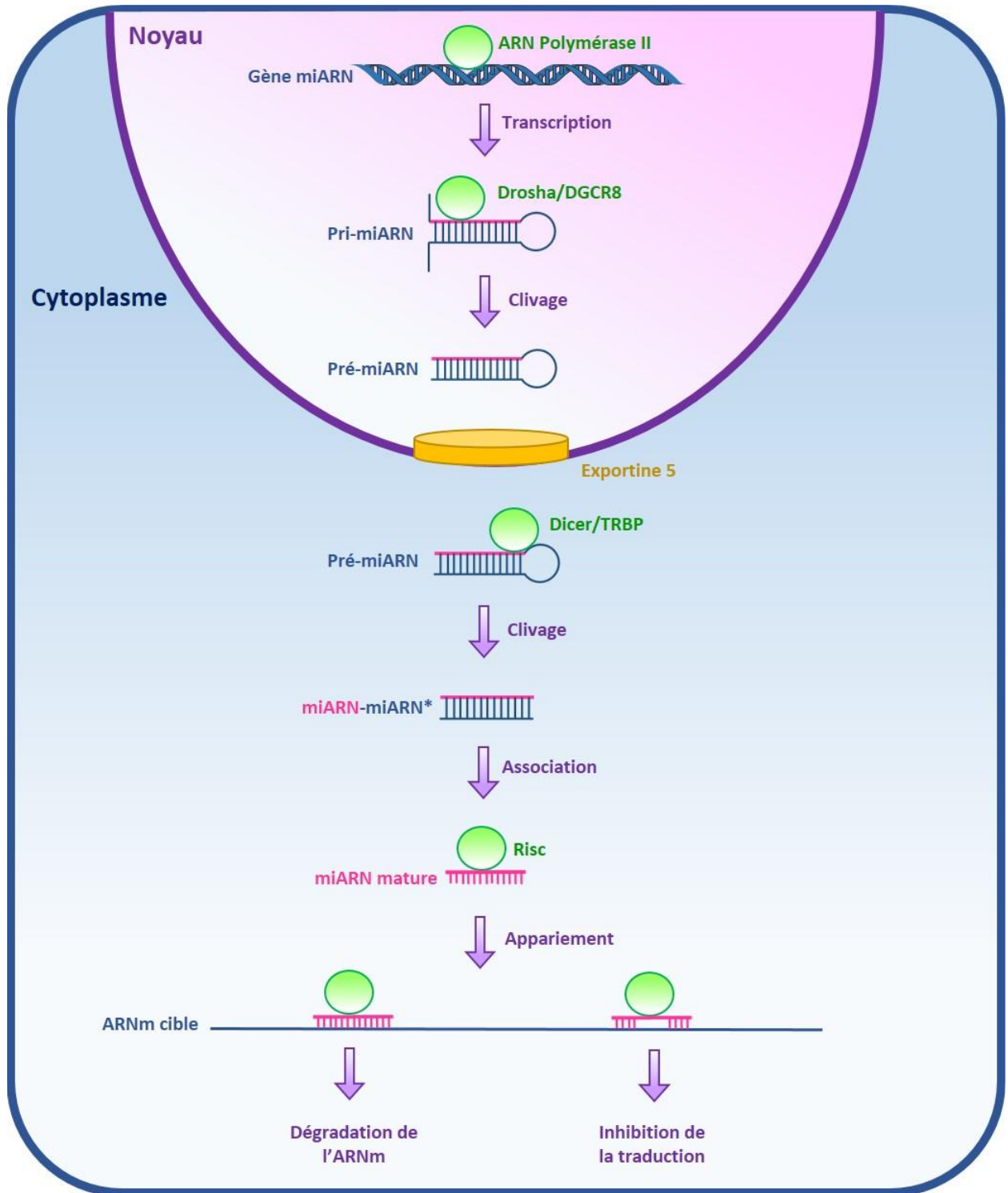
Le pré-miARN est suite exporté du noyau vers le cytoplasme grâce à l'exportine-5 où il sera clivé, au niveau de la structure tige-boucle, en miARN double brin : miR-miARN\*. Cette étape est réalisée grâce à une autre endonucléase III appelée Dicer en collaboration avec son cofacteur TRBP (*TAR RNA binding protein*).

Le duplex est ensuite séparé en un brin « passager », le miARN\* et un brin guide, le miARN mature. Le miARN mature est pris en charge par le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*) contenant des protéines de la famille des argonautes qui permettent une stabilisation entre le miARN et sa séquence cible. Grâce à une complémentarité de séquence et grâce au complexe RISC, le miARN va se fixer sur son ARNm cible et entraîner l'inhibition de son expression.

Dans le cas d'un appariement partiel, il y aura inhibition de la traduction alors que dans le cas d'un appariement total, il y aura dégradation de l'ARNm cible.

Il existe d'autres voies de biogenèse des miARNs, comme par exemple la voie appelée mirton qui requiert la machinerie de l'épissage et ne passe pas par un intermédiaire pri-miARN<sup>81</sup>.

Ainsi, d'une manière générale, les miARNs sont responsables d'une régulation post-transcriptionnelle négative. Cependant, dans des cas plus rares, ils ont été découverts comme ayant des propriétés régulatrices positives en activant leurs ARNm cibles<sup>82</sup>. De plus, un même miARN possède la capacité de pouvoir agir sur plusieurs gènes différents et un même gène peut être régulé par plusieurs miARNs.



**Figure 11:** Biogenèse des miARNs<sup>80</sup>

Tout comme dans la régulation des ARNm, l'expression des miARNs est régulée par des facteurs de transcription et par des modifications épigénétiques, telles que la méthylation ou l'acétylation de leurs promoteurs. Ainsi, leur action dépendra de leur transcription, de leur genèse ainsi que de leur dégradation<sup>83</sup>.

La base de données miRbase répertorie les séquences de miARNs publiées et annotées. Elle compte aujourd'hui, dans sa version 21, 35 828 miARNs matures dans 223 espèces différentes.

### 2.3.2. Circulation des miARNs : aspects pronostiques et diagnostiques

Les miARNs, du fait de leur petite taille, ont la particularité intéressante d'être très stables. En effet, ils sont capables de résister à des conditions particulières, comme une chaleur élevée, des pH extrêmes, des cycles de congélation/décongélation ou encore de longues conservations. De façon plus étonnante encore, ils sont retrouvés dans les fluides corporels, comme la salive, l'urine, le lait maternel ou encore le plasma, et ce, malgré la présence de ribonucléases<sup>84 85</sup>. Ce phénomène s'explique grâce à des associations entre les miARNs et différents composants protecteurs.

En effet, les miARNs peuvent s'associer avec des complexes protéiques se liant à l'ARN tels qu'Ago-2 ou NPM1 (*nucleophosmin1*)<sup>86, 87</sup>. C'est ce cas de figure qui est le plus couramment retrouvé. Les miARNs peuvent également être associés avec des molécules lipidiques, les HDL (*high density lipoprotein*)<sup>88</sup> pour prévenir leur dégradation. De plus, les miARNs peuvent être encapsulés dans des microparticules (exosomes<sup>89</sup>, microvésicules<sup>90</sup> et corps apoptotiques<sup>91</sup>) pour leur transport.

Cette stabilité dans la circulation sanguine offre donc la possibilité d'une communication intercellulaire par les miARNs. Ainsi, les miARNs sont libérés par les cellules de façon soit active par sécrétion, soit passive par libération à la mort des cellules et peuvent aller agir sur d'autres cellules via la circulation sanguine<sup>11</sup>.

Le grand intérêt offert par cette libération et cette stabilité dans la circulation sanguine est la facilité de mesure du taux de miARNs dans le sang chez de patients. Comme expliqué précédemment, l'une des qualités d'un bon biomarqueur est d'être circulant, ce qui permet de le mesurer de façon simple et rapide.

Ces propriétés ont donc permis aux miARNs d'être envisagés comme de potentiels biomarqueurs<sup>92</sup>, que ce soit à un niveau pronostique ou à un niveau diagnostique. Depuis, un nombre important d'études démontra leur potentiel en tant que biomarqueurs dans diverses pathologies cardiovasculaires. Un aperçu de ces études sera présenté dans le troisième chapitre de ce mémoire.

### 2.3.3. Modulation des miARNs : aspects thérapeutiques

La compréhension des mécanismes d'action des miARNs ainsi que leurs nombreuses implications dans diverses pathologies ont attiré l'attention sur le fait que leur modulation pourrait permettre de remplacer un phénotype malade par un phénotype sain. Ainsi les miARNs sont rapidement devenus des cibles thérapeutiques potentielles et ont engendré un intérêt important dans le développement de technologies. Il existe donc aujourd'hui des outils très intéressants qui permettent de moduler leur expression: les anti-miRs et les pré-miRs<sup>80, 93</sup>.

Les anti-miRs, appelés aussi antagoni-miRs, sont des oligonucléotides antisens qui vont interférer avec la biogenèse des miARNs en se liant au pri-miARN, au pré-miARN ou encore au miARN mature. Ainsi, ils empêchent la synthèse ou l'action du miARN et entraînent une augmentation de l'ARNm cible<sup>94</sup>. Ces anti-miRs, créés de façon synthétique, sont modifiés afin d'améliorer leur stabilité, leur efficacité et leur pénétration dans la cellule. Les séquences peuvent être conjuguées à des nanoparticules, des groupements cholestérol ou peuvent contenir des acides nucléiques modifiés, comme la technologie LNA (*locked nucleic acid*) qui propose des séquences d'acides nucléiques dans une conformité idéale pour des liaisons de type Watson-Crick<sup>95</sup>.

Les pré-miRs sont à l'inverse des séquences qui entraînent une diminution de l'expression de l'ARNm cible. En effet, ces séquences sont des équivalents artificiels des pré-miARN et seront pris en charge par la machinerie cellulaire de biogenèse des miARNs. Ils agissent ainsi de la même façon que les miARNs endogènes<sup>96</sup>. Tout comme les anti-miRs, les pré-miRs ont des formulations particulières qui permettent d'augmenter leur disponibilité dans la cellule. De plus, ils peuvent être inclus dans des vecteurs viraux libérant directement le miARN dans la cellule.

Ces outils sont donc couramment utilisés, *in vitro*, lors de la culture cellulaire, mais permettent également une utilisation efficace *in vivo*. Effectivement, leur chimie leur permet d'être injectés chez l'animal puisqu'ils sont solubles et stables<sup>97</sup>.

Il existe d'autres méthodes pour moduler l'expression des miARNs. La technique que l'on qualifie d'éponge par exemple consiste en l'inhibition, par compétition, de la liaison du miARN avec son gène cible<sup>98</sup>.

Le plus important à retenir de ces nouvelles technologies est leur potentielle utilisation chez l'homme qui ouvre de nouvelles portes en matière d'applications thérapeutiques. Un avantage non négligeable avec l'utilisation des miARNs est leur capacité à cibler plusieurs gènes dans une même voie de signalisation, au contraire des autres thérapies qui ne ciblent qu'une seule protéine. Néanmoins, ceci peut également être un inconvénient puisque d'autres voies de signalisation peuvent être modulées de façon non désirée et entraîner des effets secondaires.

D'autres avantages à souligner sont leur facilité d'utilisation, par injection par exemple, leurs effets sur le long terme grâce à leur stabilité ainsi que leur biodisponibilité.

La modulation des miARNs pour le ciblage des maladies cardiovasculaires sera abordée dans le troisième chapitre sur les ARNs non codants dans les maladies cardiovasculaires.

## 2.4. Les lncARNs

Comme déjà mentionné précédemment, les lncARNs sont définis généralement par leur taille, c'est-à-dire comme possédant plus de 200 nucléotides. Cependant cette définition est arbitraire puisqu'elle a été définie par rapport aux protocoles d'extraction de l'ARN. Ainsi, en 2011, Amaral et al. proposèrent une nouvelle définition précise pour les lncARNs: ARNs non codants pour des protéines qui peuvent fonctionner dans leur conformation primaire ou après épissage, qui sont indépendants de la classe des petits ARNs (miARNs, piwiARNs...) et indépendants de la famille des ARNt et ARNr<sup>99</sup>. En 2014, la mise à jour de la base de données NONCODE comptabilisa 210 831 lncARNs dont 95 135 dans le génome humain<sup>100</sup>.

Contrairement aux miARNs<sup>101</sup>, les lncARNs ont la capacité très intéressante de pouvoir réguler leurs gènes cibles de façon négative ou positive. Ceci s'explique par le fait qu'ils peuvent agir par de nombreux mécanismes d'action différents et à différents niveaux de régulation. En effet, ils sont capables de moduler l'expression génique à un niveau transcriptionnel, traductionnel ou post-traductionnel.

### 2.4.1. Localisation génomique des lncARNs

L'une des classifications des lncARNs souvent retrouvée dans la littérature est fonction de leur localisation génomique par rapport aux gènes codants pour des protéines. A l'heure actuelle, 6 catégories ont déjà vu le jour mais les découvertes à propos des lncARNs ne cessent d'accroître et d'étoffer cette classification (**Figure 12**)<sup>102</sup>.

Les lncARNs **sens (Figure 12.1.)** sont transcrits depuis le brin codant pour des protéines et chevauchent l'exon codant. Ils peuvent parfois partager le même promoteur.

Au contraire, les lncARNs **antisens (Figure 12.2.)** chevauchent un gène codant pour des protéines mais sont transcrits depuis le brin opposé.

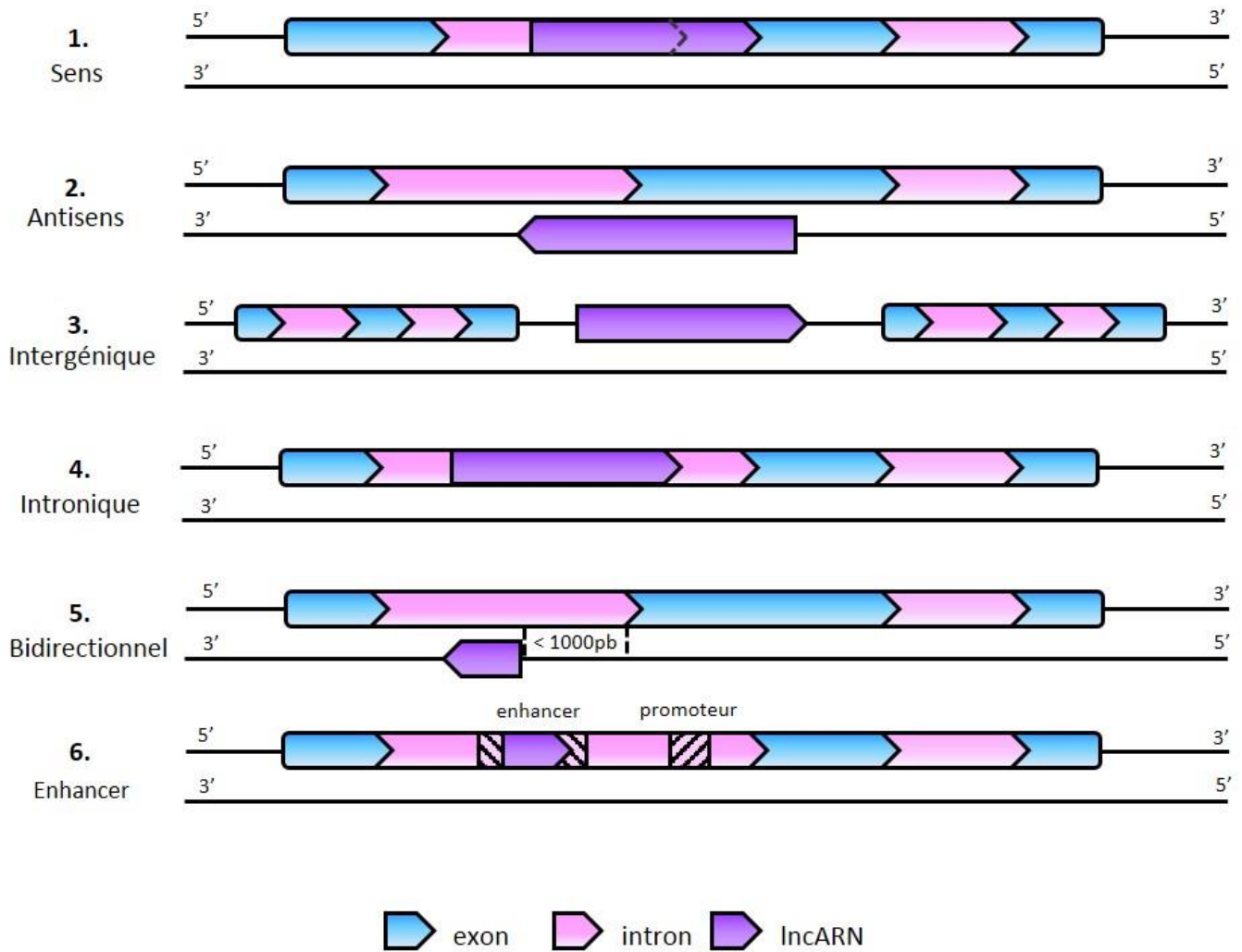
Les lncARNs **intergéniques (Figure 12.3.)** sont quant à eux transcrits comme des unités indépendantes puisqu'ils sont localisés entre 2 gènes.

Les lncARNs localisés dans un intron de gène codant pour des protéines sont appelés lncARNs **introniques (Figure 12.4.)**. Les lncARNs intergéniques et introniques sont les plus répandus.

Le cinquième groupe de lncARNs inclue les lncARNs **bidirectionnels (Figure 12.5.)** qui sont transcrits depuis une zone se situant à moins de 1 000 paires de base d'un promoteur et dans le sens opposé au gène codant.

Enfin, le sixième groupe de lncARNs contient les lncARNs « **enhancers** » qui sont transcrits depuis une zone que l'on appelle enhancer située en amont des promoteurs des gènes qui permet de stimuler l'expression d'un gène (**Figure 12.6.**).





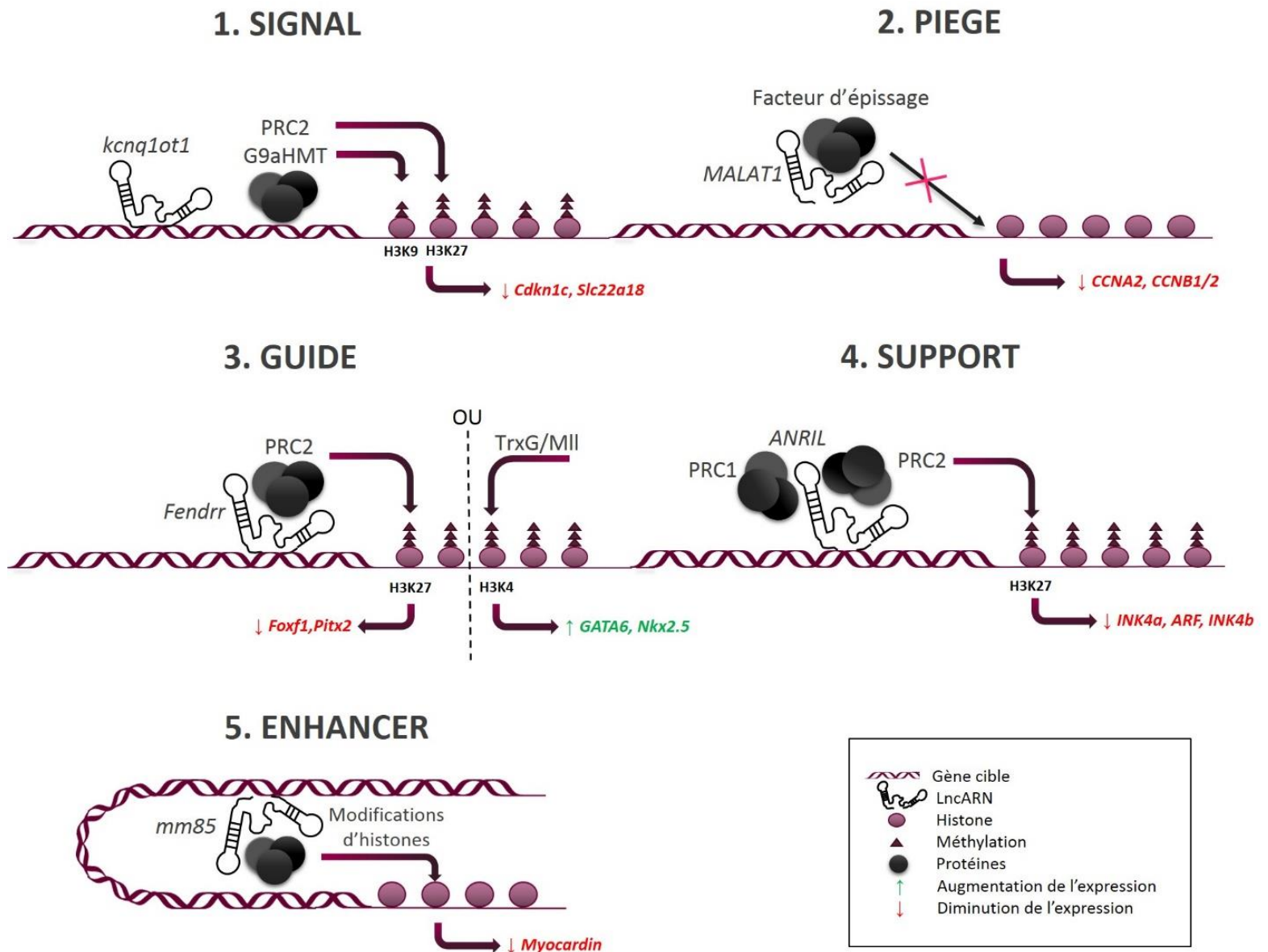
**Figure 12:** Classification des lncARNs par leur localisation génomique  
 Ce schéma a servi de base pour la figure 1 de la revue Devaux et al., 2015.

## 2.4.2. Mécanismes d'action des lncARNs

Il s'avère que les lncARNs sont très peu conservés entre les différentes espèces par rapport aux ARNm et aux miARNs. Ceci complique grandement la recherche puisque la transposition animal/homme en devient d'autant plus difficile. En revanche, cela ne leur confère pas un manque de fonction<sup>103</sup>. Bien au contraire, les lncARNs sont des acteurs significatifs des différents processus de régulation et agissent par des mécanismes très complexes et encore peu élucidés.

De leur localisation cellulaire dépendra également leur fonction. En effet, leurs rôles seront différents en fonction de leur présence dans le cytoplasme ou dans le noyau. Les lncARNs nucléaires auront plus tendance à agir sur l'ADN par l'intermédiaire d'enzymes modifiant la chromatine par exemple et donc sur le mécanisme de transcription<sup>104</sup>. Les lncARNs cytoplasmiques moduleront quant à eux les mécanismes de traduction en agissant sur les ARNm ou les miARNs<sup>105</sup> mais la proportion de lncARNs cytoplasmiques est nettement plus faible (15%)<sup>106</sup>.

Différents groupes de lncARNs ont donc été créés par rapport à leurs mécanismes d'action et ont été groupés en différentes catégories pour la première fois en 2011 par Wang et Chang<sup>12</sup> (**Figure 13**).



**Figure 13:** Mécanismes d'action des lncARNs  
 Ce schéma a servi de base pour la figure 2 de la revue Devaux et al., 2015.

#### 2.4.2.1. Mécanisme 1 : Signal

Le premier groupe inclut les lncARNs appelés **signal (Figure 13.1.)**. Les lncARNs sont exprimés dans des types cellulaires spécifiques et sont capables de répondre à différents stimuli. Ainsi ils agissent sur l'expression de gènes comme des molécules signales, c'est-à-dire à une localisation et à un temps précis. De plus, ils permettent une régulation bien plus rapide que celle effectuée par les protéines.

Dans cette catégorie, on trouve notamment les lncARNs responsables du phénomène de l'empreinte génomique parentale. Celle-ci est illustrée par le fait que deux allèles d'un même gène, l'un hérité de la mère et l'autre du père, sont exprimés de façon différente et spécifique. En effet, alors que dans la plupart des cas les deux allèles sont exprimés de façon égale, il est possible que l'expression de certains gènes, grâce à des mécanismes épigénétiques, soit réduite à l'un des 2 allèles parentaux.

L'exemple d'empreinte génomique parentale, très bien caractérisée, est l'inactivation du chromosome X dans les cellules mammifères femelles. En effet, dans les cellules femelles, de façon aléatoire, l'un des deux chromosomes X est inactivé et n'est pas fonctionnel. Ce mécanisme s'opère grâce au lncARN *Xist*, un ARN ne codant pas pour des protéines long de 16 kb et exprimé par le futur chromosome inactif. *Xist* est produit en très grande quantité et recouvre entièrement le chromosome X entraînant la répression totale des gènes. Il existe également un lncARN appelé *Tsix*, antisens de *Xist* qui permet sa répression<sup>107</sup>.

Le lncARN *Kcnq1ot1 (Figure 13.1.)* est également impliqué dans le mécanisme d'empreinte parentale puisqu'il va entraîner la répression de gènes présents sur des allèles spécifiques par l'intermédiaire de mécanismes épigénétiques. *Kcnq1ot1* est un ARN de 91,5 kb exprimé par les chromosomes paternels uniquement. Son promoteur est situé dans un intron du gène *Kcnq1*, une région soumise à l'empreinte génomique parentale et il est transcrit dans le sens opposé à *Kcnq1*<sup>108</sup>. *Kcnq1ot1* serait capable de recruter sur ses gènes cibles des enzymes modifiant l'état de chromatine comme la méthyltransférase G9a ou le complexe PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*)<sup>109</sup>.

La méthyltransférase G9a est connue pour catalyser la diméthylation de la lysine 9 (K9) de l'histone H3 (H3K9)<sup>110</sup> et le complexe PRC2 est connu pour catalyser la triméthylation de la lysine 27 (K27) de l'histone H3 (H3K27)<sup>111</sup>. Ainsi, *Kcnq1ot1*, à travers ces modulations de la conformation de la chromatine, réprimerait l'expression des gènes cibles. Les gènes régulés par ces mécanismes peuvent être des gènes voisins du lncARN *Kcnq1ot1*. On trouve, par exemple, le gène *Kncq1* qui code pour une protéine d'un canal potassique ou le gène suppresseur de tumeur, *Slc22a18*. Les gènes cibles de *Kcnq1ot1* peuvent également se trouver plus loin sur le génome comme le gène *Ascl2* codant pour un facteur de transcription ou le gène *Cd81* codant pour une protéine de surface. Ces gènes sont donc soumis aux mécanismes d'empreinte parentale. Ceci s'opère dans le placenta, à différents stades du développement embryonnaire, illustrant bien la notion de lncARN signal, agissant à des localisations génomiques et à des moments spécifiques<sup>112</sup>.

Un second exemple, illustrant cette notion de régulation à un moment et à un endroit précis, sont les nombreux lncARNs provenant des boîtes de transcription homéotiques (HOX)<sup>113</sup>. Par exemple, le lncARN *HOTAIR*, provenant du locus HOXC est exprimé, lors du développement embryonnaire, uniquement dans des positions distales et postérieures du corps alors que le lncARN *Frigidair*, provenant également du locus HOXC est exprimé de façon antérieure. *HOTAIR* se lie avec le complexe PRC2 qui entraîne la triméthylation de gènes du locus HOXD<sup>114</sup>.

Dans cette catégorie, on retrouve donc des lncARNs qui sont impliqués à des moments précis du développement embryonnaire c'est-à-dire dans des conditions physiologiques basales. En revanche, ils peuvent également jouer un rôle à des moments précis faisant suite à des stimuli causés par des stress. Le lncARN appelé *Linc-p21* a été découvert comme répresseur transcriptionnel de gènes impliqués dans la voie de signalisation de p53 en réponse aux dommages de l'ADN. Il joue ainsi un rôle dans le déclenchement de l'apoptose. *Linc-21* agit en se fixant avec des ribonucléoprotéines HNRPK (*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*) et module leurs localisations cellulaires<sup>115</sup>.

Un dernier exemple, assez surprenant pour être mentionné, est celui du lncARN *COOLAIR* que l'on retrouve chez les plantes. Le passage de l'état végétatif à l'état reproductif est un phénomène hautement régulé chez les plantes puisqu'il dépend des conditions saisonnières. Chez *Arabidopsis thaliana*, le froid déclenche une série de nombreuses triméthylations H3K27 dans un locus appelé FLC (*Flowering Locus C*) entraînant la répression de nombreux gènes. Ces changements épigénétiques sont réalisés par le complexe PRC2 et favorisés par une forte augmentation de l'expression de *COOLAIR*. En effet, le promoteur de *COOLAIR* est inductible par le froid<sup>116</sup>.

Pris ensemble, ces exemples montrent la diversité de fonctions des lncARNs ainsi que leur spécificité d'action en des lieux et temps précis. D'un point de vue plus clinique, les lncARNs étant induits de façon très spécifique, ils peuvent être vus comme de potentiels biomarqueurs.

#### 2.4.2.2. Mécanisme 2 : Piège

Le deuxième mécanisme d'action des lncARNs est le mécanisme de **piège (Figure 13.2.)**. Les lncARNs sont en effet capables de séquestrer des molécules afin d'empêcher leur action sur leurs gènes cibles. Ces molécules peuvent être des protéines comme des facteurs de transcription ou des enzymes modifiant l'état de chromatine mais elles peuvent aussi être des séquences nucléotidiques comme les miARNs.

Le noyau, compartiment destiné à la production des ARNm, est divisé en plusieurs corps nucléaires, autour des chromosomes. On trouve, par exemple, les nucléoles où sont fabriquées les sous-unités ribosomales ou encore les « speckles », granules formées de ribonucléoprotéines impliquées dans la machinerie de l'épissage<sup>117</sup>. L'épissage alternatif est un mécanisme indispensable puisqu'il permet la maturation des pré-ARNm par l'élimination des introns et la ligature des exons. 98% des gènes multiexoniques subissent un épissage avant d'être traduits en protéines<sup>118</sup>. C'est également un point de régulation important, notamment grâce à des protéines SR, riches en sérine et arginine.

Le lncARN *MALAT1* (*metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1*) (**Figure 13.2.**) est un lncARN découvert à l'origine dans plusieurs cancers<sup>119</sup> et localisé de façon abondante dans les speckles. Ainsi en 2010, Tripathi et al. émettent l'hypothèse que *MALAT1* est associé à l'épissage et montrent que *MALAT1* est capable de séquestrer les protéines SR dans les speckles permettant la maturation des pré-ARNm. En effet, lorsque les cellules sont déplétées en *MALAT1*, les protéines SR ne sont plus retenues dans les speckles causant un désordre dans l'épissage<sup>120</sup>.

Les télomères sont des séquences nucléotidiques hautement répétitives et non codantes à l'extrémité des chromosomes des cellules eucaryotes. Ils ont un rôle protecteur puisque, l'ADN polymérase n'étant pas capable de répliquer les derniers nucléotides, à chaque réplication un raccourcissement des chromosomes est observé. L'absence des télomères signifierait une perte rapide de l'information génétique au cours des divisions cellulaires. Cependant, il a été montré récemment que ces séquences peuvent être transcrites en lncARNs appelés *TERRA* et seraient capables de réguler la production des télomères<sup>121</sup>. En effet, *TERRA* interagit physiquement avec la sous-unité protéique TERT de la télomérase ou par complémentarité de séquence avec la sous-unité nucléotidique. Ceci permet ainsi une régulation, en inhibant l'action de l'enzyme<sup>122</sup>. Il a été montré que le niveau d'expression de *TERRA* est différent en fonction des phases du cycle cellulaire, avec notamment une forte diminution en phase S. Ceci permet ainsi une plus grande disponibilité de la télomérase afin de réaliser l'extension des télomères de façon spécifique par rapport au cycle cellulaire<sup>123</sup>.

Il a été aussi montré que des lncARNs peuvent agir comme des pièges empêchant l'action des miARNs. En effet, Wang et al. ont récemment montré que le lncARN *CHRF* (*cardiac hypertrophy related factor*) est capable d'agir comme une éponge sur le miR-489. Ainsi, le *CHRF* permet de contrecarrer l'action du miR-489 sur le gène *Myd88* et entraîne une augmentation de l'expression de *Myd88*. *Myd88* étant impliqué dans des voies de signalisation de l'hypertrophie, *CHRF* est alors une cible potentielle dans la modulation de l'hypertrophie<sup>124</sup>.

### 2.4.2.3. Mécanisme 3 : Guide

Le troisième mécanisme est celui de **guide (Figure 13.3.)**. De la même façon que le deuxième mécanisme d'action, on observe une fixation entre un lncARN et un complexe ribonucléoprotéique mais dans ce cas pour conduire le complexe jusqu'à son gène cible. Cette régulation peut avoir lieu sur des gènes proches, c'est-à-dire en *cis* ou sur des gènes plus lointains, en *trans*. Les molécules conduites jusqu'aux gènes cibles peuvent aussi bien être des molécules entraînant une répression de l'expression que des molécules entraînant une activation.

Par exemple, le lncARN *Fendrr* (**Figure 13.3.**) est capable de former un complexe avec PRC2 afin d'entraîner la triméthylation de H3K27 sur ces gènes cibles *Fox1* et *Pitx2*. *Fendrr* se lie avec le promoteur de *Fox1* et *Pitx2* grâce à une séquence complémentaire de 40 nucléotides. La triméthylation de ces promoteurs est à l'origine de la répression des gènes<sup>125</sup>. *Fendrr* est aussi capable de se lier avec le groupe de protéines TrxG (*trithorax group*). Le complexe TrxG agit par des triméthylations de H3K4 responsables à l'inverse d'une augmentation de l'expression des gènes<sup>125</sup>.

Le lncARN *Kcnq1ot1* classé dans la catégorie des lncARNs signal, agit avec un mécanisme de guide, puisqu'il est capable d'emmener la méthyltransférase G9a et le complexe PRC2 jusqu'à leurs gènes cibles<sup>109</sup>.

En plus des régulations épigénétiques, les lncARNs sont capables de guider des molécules comme des facteurs de transcription ou des co-activateurs de la transcription. C'est le cas du lncARN *Evf-2* qui coopère avec le complexe Dlx-2 pour augmenter la transcription des gènes *Dlx-5* et *Dlx-6*<sup>126</sup>.



#### 2.4.2.4. Mécanisme 4 : Support

Le dernier mécanisme présenté par Wang et Chang, est celui de « scaffold », traduit littéralement par « échafaudage » mais que l'on appellera plus communément **support (Figure 13.4.)**. Les lncARNs possédant ce mécanisme d'action servent de plateforme pour l'assemblage de plusieurs composants moléculaires, notamment des enzymes. Il est possible que ces molécules aient des effets opposés ceci permettant un changement d'action rapide.

Dans cette catégorie, on trouve le lncARN *ANRIL*, antisens et régulateur du locus *INK4b/ARF/INK4a* et régulateur de celui-ci (**Figure 13.4.**). *ANRIL* est capable de se lier avec les deux complexes PRC1 et PRC2 qui ont des actions répressives combinées. En effet, PRC2, recruté par *ANRIL* va entraîner la triméthylation H3K27 du gène. PRC1, également recruté par *ANRIL* va se lier au gène via la triméthylation H3K27 et entraîner l'ubiquitination du gène, ce qui maintiendra une répression de l'expression de *INK4b/ARF/INK4a*<sup>127</sup>.

Une fois encore, le lncARN *Kcnq1ot1* a sa place dans cette catégorie puisqu'il est capable de lier le complexe PRC2 et la méthyltransférase G9a<sup>109</sup>. Plusieurs lncARNs possèdent les caractéristiques pour appartenir à plusieurs groupes ce qui limite ce classement. En effet, bien souvent, les lncARNs sont induits dans des situations et cellules précises, ce qui en fait des molécules **signales**, mais elles agissent selon un mécanisme de **guide** ou de **piège**. De plus, les lncARNs qui agissent comme des **guides** pour des protéines sont souvent capables de lier plusieurs enzymes ce qui en fait des molécules **supports**<sup>12</sup>.

#### 2.4.2.5. Mécanisme 5: Enhancer

Dans le classement de Wang et Chang<sup>12</sup>, ce 5ème mécanisme n'a pas son propre groupe. En effet, les lncARNs agissent via un mécanisme dit de « **enhancer** » (**Figure 13.5.**) sont classés dans le groupe des lncARNs avec un mécanisme de type signal. Dans les classements plus récents, ce mécanisme très particulier forme un groupe à lui seul. Cela-dit, il est tout de même possible de le placer dans le groupe des lncARNs signal puisque, comme expliqué ci-dessus, un lncARN peut appartenir à plusieurs catégories.

En 2010, une étude a identifié la présence de milliers d'ARNs non codants dans des cellules neuronales, provenant de régions enhancers. Les régions enhancers sont des régions qui permettent de recruter l'ARN polymérase vers le promoteur. Ces lncARNs ont donc été appelés eLncARNs<sup>128</sup>. Deux classes de eLncARNs ont été définies : (1) les 1d-eLncARNs qui sont polyadénylés et transcrits de façon unidirectionnelle depuis les régions enhancers et (2) les 2d-eLncARNs qui ne sont pas polyadénylés et peuvent être transcrits de façon bidirectionnelle<sup>129</sup>.

Il a également été montré que l'expression des eLncARNs est positivement corrélée avec le niveau des ARNm voisins, suggérant une interaction entre les régions enhancers et les régions promotrices<sup>128</sup>. Effectivement, ces eLncARNs permettent une interaction entre la région enhancer et le promoteur d'un gène, autrement dit une régulation en *cis*. Ceci est possible grâce à la formation d'une boucle chromatique<sup>130</sup>.

Le lncARN *CCTA1-L*, transcrit spécifiquement dans les cancers colorectaux chez l'homme, se situe à 515 nucléotides en amont du gène du gène proto-oncogène *MYC*. L'inhibition de *CCTA1-L* réduit les interactions entre la région enhancer et le promoteur de *MYC*. *CCTA1-L* joue donc un rôle dans la régulation transcriptionnelle de *MYC* en induisant une boucle dans la chromatine<sup>131</sup>. Dans le contexte cardiaque, le lncARN *mm85* est transcrit depuis une région enhancer qui agit sur le gène *myocardin* grâce à la formation d'une boucle<sup>132</sup> (**Figure 13.5.**).

D'autre part, les eLncARNs pourraient également être capables de rapprocher une région enhancer et une région promotrice mais cette fois-ci en *trans*, c'est-à-dire entre 2 séquences éloignées dans le génome<sup>133, 134</sup>.

### 2.4.3. Rôle structurel des lncARNs

En plus de leur mécanisme d'action à proprement dit, les lncARNs ont également un rôle structurel. Comme indiqué précédemment, le noyau est divisé en plusieurs corps nucléaires liés à la régulation des gènes. Parmi eux, les paraspeckles, sont des sous-unités composées d'ARN et de protéines comme le facteur d'épissage PSF (*polypyrimidine tract-binding protein (PTB) splicing factor*). Les lncARNs *MENε* et *MENβ*, transcrits depuis le locus *MEN* (*multiple endocrine neoplasia*) ont été découverts comme des ARNs non codants indispensables dans le maintien de ces structures nucléaires. Ils seraient responsables de l'organisation des paraspeckles. En effet, dans des cellules, il a été observé une absence de formation des paraspeckles lors de l'inhibition de *MENε* et *MENβ*<sup>135</sup>. De plus, pour leur formation, *MENε* et *MENβ* se fixeraient aux facteurs d'épissage PSF et p54nrb. Ces deux lncARNs sont également connus sous le nom de NEAT1 et NEAT2 (*nuclear paraspeckle assembly transcript*)<sup>136</sup>.

Le lncARN *Gomafu*, connu en cardiologie sous le nom de *MIAT* (*myocardial infarction associated transcript*) est un composant de la matrice nucléaire<sup>137</sup>. En effet, *Gomafu* a été identifié dans des neurones en phase post-mitotique, formant des spots distincts dans le nucléoplasme et ne coïncidant pas avec les domaines nucléaires. De plus, ce lncARN est très insoluble et reste intact après une préparation de la matrice nucléaire. Ce lncARN, très spécifique du type cellulaire serait donc un composant de la matrice nucléaire capable en somme de réguler l'expression des gènes.

#### 2.4.4. Potentiels cliniques des lncARNs

L'étude des ARNs et notamment des lncARNs a pour but bien sûr de comprendre leurs mécanismes d'action dans des situations physiologiques ou pathologiques. Néanmoins, l'intérêt principal est de pouvoir les utiliser à des fins thérapeutiques en modulant leur expression ou leur comportement.

A la différence des miARNs, les lncARNs peuvent réguler de façon négative ou positive l'expression des gènes et sont impliqués à différents niveaux de régulation ce qui permet d'avoir main mise sur un grand nombre de mécanismes génétiques différents. De plus, les lncARNs sont généralement régulés, comme expliqué précédemment, à des moments et à des endroits très précis ainsi que dans des voies de signalisation spécifiques. Ceci permet, en cas de modulation, de cibler de façon précise voire unique un mécanisme.

Le potentiel clinique des lncARNs peut être, encore une fois, étudié de deux manières : soit avec un aspect de biomarqueur, soit avec un aspect de cible thérapeutique.

L'engouement créé par la découverte des miARNs comme biomarqueurs circulants dans de nombreuses pathologies a tout naturellement conduit à l'étude des lncARNs pour ce même rôle. De plus, leur régulation de façon spatiale et temporelle leur procure un réel atout pour être de bons biomarqueurs.

Les études sur les lncARNs circulants sont encore peu nombreuses puisque du fait leur longueur, ils peuvent être rapidement dégradés par les nombreuses RNases présentes dans les fluides biologiques. Cependant, tout comme les miARNs et les ARNm, les lncARNs peuvent être contenus dans des microvésicules qui permettraient leur transport dans les fluides<sup>138, 139</sup>.

En cancérologie, plusieurs lncARNs ont déjà été identifiés pour leur potentiel de biomarqueur circulant<sup>140</sup>. Par exemple, le lncARN *PCA3*, mesuré dans l'urine des patients atteints du cancer de la prostate, s'avère être un biomarqueur plus sensible et plus spécifique que le marqueur habituellement mesuré dans le sérum, PSA (*prostate-specific antigen*)<sup>141</sup>. Le lncARN *HULC* (*highly upregulated in liver cancer*) a été détecté dans le sang de patients atteints de cancer du foie, par des techniques classiques de PCR<sup>142</sup>.

En cardiologie, seuls quelques lncARNs ont été décrits pour leur fonction potentielle en tant que biomarqueurs circulants. Ce sujet sera abordé dans le troisième chapitre sur les ARNs non codants dans les maladies cardiovasculaires.

D'un point de vue thérapeutique, la majorité des molécules actuellement disponibles pour réguler l'expression des gènes dans différentes pathologies ont leurs limites. On trouve par exemple, l'administration de peptides comme l'insuline pour traiter le diabète<sup>143</sup> ou l'administration d'enzymes dans le cas de désordres génétiques rares<sup>144</sup>. Il existe d'autres approches telles que l'administration de gènes pour remplacer une déficience en utilisant des vecteurs viraux inactivés<sup>145</sup>, ou encore la modulation de miARNs avec des prémiRs ou antimiriRs comme expliqué précédemment.

Malgré le fait que ces stratégies soient prometteuses, elles présentent toutes de sévères contraintes notamment lorsqu'il s'agit d'augmenter l'expression d'un gène ou de remplacer une molécule déficiente, d'où la nécessité de développer de nouvelles techniques<sup>146</sup>. Ainsi le potentiel des lncARNs pour la régulation de gènes a récemment été étudié<sup>147</sup>.

Il est souhaitable de réguler de façon négative ou positive l'expression d'un lncARN en fonction de son action sur les gènes cibles. Ainsi, des outils similaires à ceux utilisés pour réguler l'expression des miARNs ont été développés. Il existe des siARNs de quelques paires de bases qui permettent de diminuer l'expression de lncARNs en se liant par complémentarité de séquence. Ainsi la formation d'un complexe double brin entrainera sa dégradation par la RNase H et le lncARN ne sera plus en mesure d'agir sur ces gènes cibles<sup>148</sup>. Ces siARNs ont été conçus pour être transfectés dans des cellules mais peuvent être également injectés chez l'animal.

Les lncARNs peuvent également être protecteurs. Dans ce cas, il faut accroître leur expression. Malheureusement, à l'heure actuelle, il n'existe pas encore d'outils semblables et aussi simples d'utilisation que les pré-miARNs qui permettent de transférer la séquence directement dans la cellule ou l'animal. Les outils disponibles pour surexprimer les lncARNs sont équivalents aux outils de surexpression des ARNm. En effet, on peut utiliser des vecteurs d'expression comme les plasmides<sup>149</sup> ou encore des particules virales comme les adénovirus<sup>150</sup>. Les études sont en voie d'expansion mais restent encore très rares. Les études à propos de la modulation des lncARNs dans le domaine cardiovasculaire seront présentées dans le troisième chapitre.

Les outils permettant la modulation des lncARNs sont utilisés en premier lieu pour comprendre les mécanismes cellulaires. Ensuite, les études *in vivo* sont réalisées afin de voir les effets de la modulation dans un organisme entier. Cependant, le but ultime est de pouvoir utiliser ces outils dans des buts thérapeutiques chez l'humain.

Actuellement, toutes les études de modulation des lncARNs ont été réalisées chez les animaux de laboratoire et c'est un vrai défi de transposer des résultats obtenus chez les animaux vers l'homme. En effet, à la différence des miARNs, les lncARNs sont malheureusement très peu conservés entre les espèces.

Il est concevable qu'une meilleure compréhension de l'implication des miARNs et des lncARNs dans les maladies cardiovasculaires pourrait permettre de découvrir de nouveaux biomarqueurs et de nouvelles cibles thérapeutiques pour faciliter le traitement des pathologies relatives au cœur.

## **Chapitre 3. Les ARNs non codants dans le cœur**

### **3.1. Implication des miARNs dans la physiopathologie cardiaque**

Aujourd'hui, il est devenu évident que les miARNs sont impliqués dans la grande majorité des processus physiologiques et pathologiques. De plus, il est clair qu'une expression aberrante des miARNs est la cause de certaines pathologies comme certains cancers, diabète ou encore IC. Le stress peut induire des modifications de l'expression des miARNs et ceci sera responsable de l'arrêt de la régulation normale d'une batterie de gènes.

Environ 2000 miARNs matures humains ont été répertoriés et l'on pense qu'ils seraient capables de réguler la moitié des gènes<sup>151</sup>. Plusieurs d'entre eux sont spécifiques d'un tissu et sont impliqués dans des mécanismes de régulation à des niveaux physiopathologiques spécifiques ce qui en fait de potentielles cibles thérapeutiques.

De plus, les miARNs possèdent la propriété d'être stables dans les fluides corporels grâce à leur intégration dans des vésicules ou leur association avec des protéines ce qui en fait de potentiels biomarqueurs circulants.

#### **3.1.1. Les miARNs dans le développement cardiaque**

Chez le fœtus, le cœur est le premier organe devant être fonctionnel car il doit assurer la distribution des nutriments au reste du corps pour sa croissance. Le développement du cœur est complexe et requiert de nombreux processus impliquant des voies de signalisation et des facteurs de transcription devant coordonner la migration, la réplication et la différenciation des cellules. Ainsi de nombreux niveaux de régulation des gènes doivent être réalisables et requièrent des molécules telles que les miARNs.

Le rôle central des miARNs dans le développement cardiaque a été découvert en empêchant la maturation des miARNs. Comme expliqué précédemment, les pré-miARNs doivent être maturés en miARNs matures et ceci est réalisé notamment grâce au complexe enzymatique Dicer (**Figure 11, page 60**). Ainsi, la délétion du complexe Dicer empêche la maturation des miARNs. Il a été montré dans ce cas une forte létalité des embryons de souris ne possédant pas de machinerie de maturation des miARNs, démontrant leur rôle critique dans le développement animal<sup>152</sup>.

Plus précisément, au niveau cardiaque, dans le cas d'une délétion de Dicer dans les cellules progénitrices cardiaques, les embryons survivent seulement pendant 12 jours et montrent une compaction du myocarde<sup>153</sup>. La délétion de Dicer dans des cardiomyocytes de cœur de souris à 3 semaines provoque leur mort en une semaine, du fait d'une cardiomyopathie et d'une IC<sup>154</sup>. Ces études montrent à quel point les miARNs sont importants dans le développement cardiaque.

Le miR-1, spécifique du cœur et du muscle squelettique est indispensable pour la cardiogenèse et régule l'expression de nombreuses protéines impliquées dans la contraction<sup>155</sup>,<sup>156</sup>. De même, les miR-208a, miR-208b et miR-499, spécifiques du cœur, sont transcrits depuis les introns des gènes *Myh6* et *Myh7* codants pour les protéines impliquées dans les chaînes de myosine et donc impliquées dans la contraction musculaire<sup>157</sup>.

Cependant, la délétion de miARNs individuels comme le miR-208b ou le miR-499, ne montre pas de changements sévères du phénotype cardiaque, suggérant ainsi que plusieurs miARNs ont probablement la même fonction et que la suppression d'un miARN peut être remplacée par un autre<sup>158</sup>.

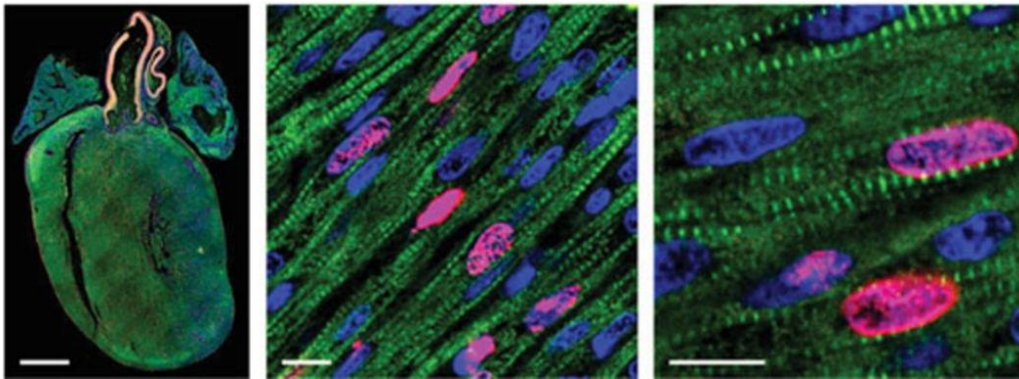
De plus, il a été montré que seules 18 familles de miARNs (miR-1, miR-29, miR-30...) contribuent à 90% de l'expression des miARNs dans le cœur<sup>159</sup>.



### 3.1.2. Rôle des miARNs dans la régénération cardiaque

En plus du développement cardiaque, des études ont également montré une implication des miARNs dans les mécanismes de prolifération des cardiomyocytes. Ceci est très encourageant puisque les cardiomyocytes adultes sont des cellules différenciées qui sont sorties du cycle cellulaire et qui ne sont pas capable de proliférer.

Une étude récente a identifié 40 miARNs impliqués de façon importante dans la prolifération de cardiomyocytes néonataux de rat et de souris. De plus, il a été démontré que 2 de ces 40 miARNs, le miR-199a et le miR-590 sont capables d'induire la prolifération des cardiomyocytes *in vitro* et *in vivo*<sup>160</sup>. En effet, ces 2 miARNs ont été administrés de façon exogène à des cardiomyocytes néonataux et adultes et les cellules sont à nouveau entrées dans le processus du cycle cellulaire (**Figure 14**).



**Figure 14:** Images représentatives d'un marquage immunofluorescent dans un cœur de souris montrant la prolifération des cardiomyocytes après injection du miR-590.

L'alpha-actine des cardiomyocytes est colorée en vert. Les noyaux des cellules sont colorés en bleu. L'ADN nouvellement synthétisé est coloré en rose.

Images d'après Eulalio et al., 2012<sup>160</sup>

De plus, cette équipe a montré qu'après un IDM, l'augmentation de ces miARNs est capable de régénérer le cœur et d'améliorer la fonction cardiaque. Ainsi le miR-199 et le miR-590 sont des cibles thérapeutiques intéressantes.

Ces résultats sont très prometteurs puisque l'injection de ces miARNs pourrait être envisagée comme un traitement à la perte de cellules cardiaques dans le cas d'une ischémie par exemple.

### 3.1.3. Implication des miARNs dans l'IDM

L'IDM est dû à l'apparition d'un thrombus dans une artère coronaire causant l'ischémie du muscle cardiaque et donc la mort des cardiomyocytes atteints dans la zone non irriguée. Que ce soit dans des modèles animaux ou chez l'homme, de nombreuses études se sont intéressées au profil d'expression des miARNs après l'IDM et une quantité importante de miARNs voient leur expression modulée. En effet, en 2011, Meder et al. ont identifié 121 miARNs dont l'expression est régulée de façon statistiquement significative dans le sang après l'IDM<sup>161</sup>.

Le miR-1 par exemple, est le miARN le plus abondant dans le cœur et dans le muscle. Dans des conditions physiologiques, il est très peu relargué dans le sang. Cependant après des dommages cardiaques, la quantité de miR-1 dans le sang est bien plus élevée et elle est corrélée de façon positive avec la taille de l'IDM ainsi qu'avec le niveau de CK-MB sanguin. Evidemment, ceci fait du miR-1 un biomarqueur très intéressant pour le diagnostic de l'IDM<sup>162</sup>.

Ce n'est pas le seul miARN montrant une augmentation d'expression après l'IDM. En effet, le miR-133a, le miARN -208a, le miR-208b et le miR-499 sont également élevés après IDM dans le sang de patients comparés à des volontaires sains<sup>163-165</sup>.

Ceci s'explique par le fait que lors de l'IDM, les cellules cardiaques libèrent leur contenu dans la circulation sanguine. De plus, leur stabilité dans les fluides corporels offre la possibilité de les mesurer sans une perte de signal due à une dégradation.

Cette régulation n'est pas présente uniquement dans le plasma, puisque le miR-208a présente une expression plus élevée dans le sang des patients mais également dans le tissu cardiaque<sup>166, 167</sup>. Certains miARNs, comme le miR-25-3p peuvent être différentiellement exprimés dans les plaquettes ou dans les cellules sanguines<sup>168</sup>.

Il est important de signaler que cette régulation d'expression de miARNs est très intéressante puisqu'elle est visible très tôt après l'IDM, à partir de 2h pour certains. De plus, ces expressions sont corrélées avec les mesures de cTnT classiquement réalisées dans le diagnostic de l'IDM<sup>169</sup>, ce qui ajoute une forte valeur diagnostique aux miARNs.

Le potentiel des miARNs comme biomarqueurs a aujourd'hui été bien caractérisé. Malheureusement, pour l'instant aucun miARN ne possède de valeur diagnostique de l'IDM supérieure à celle de la cTnT.

Les études réalisées ont surtout montré l'impact qu'a l'IDM sur l'expression des miARNs mais moins bien l'impact des miARNs sur l'IDM. Evidemment il est difficile d'étudier l'expression des miARNs avant l'apparition de l'IDM chez des patients et par conséquent, cela réduit considérablement le nombre d'études sur les marqueurs pronostiques de l'IDM.

Au vu de l'état actuel de la recherche concernant la valeur pronostique et diagnostique des miARNs dans le contexte de l'IDM, nous avons étudié ces valeurs avec différents miARNs circulants chez des patients atteints de douleurs thoraciques aiguës. C'est l'objet de l'étude n°1 présentée dans ce manuscrit.

Afin de se renseigner sur leurs implications dans l'IDM, les miARNs ont été étudiés dans les mécanismes aboutissant à l'apparition de l'IDM. L'athérosclérose est en grande partie responsable de l'IDM et l'implication des miARNs a donc été étudiée dans les différents stades de développement des plaques athérosclérotiques.

Par exemple, le miR-21 a été montré comme étant impliqué dans l'activation des cellules endothéliales via la voie de signalisation de l'oxyde nitrique<sup>170</sup>. Le miR-126 a quant à lui été désigné comme responsable de l'adhésion des leucocytes lors de la formation de la plaque d'athérome. En effet sa diminution entraîne la surexpression de gènes codant pour des protéines d'adhésion vasculaire<sup>171</sup>.

Dans le développement des plaques d'athérosclérose et dans leur déstabilisation causant leur rupture et donc le thrombus, l'inflammation joue un rôle clé. Les macrophages sont les principaux acteurs et de nombreux miARNs sont impliqués dans la réponse inflammatoire<sup>172</sup>.

Le miR-155 est spécifiquement exprimé dans l'athérosclérose et il a un rôle pro-inflammatoire pour les macrophages. En effet, une étude a montré que la délétion du miR-155 réduit considérablement le développement de la plaque par une augmentation d'expression de Bcl6 qui, via la voie des chémokines, réduit le recrutement des macrophages sur le site inflammatoire<sup>173</sup>.

On peut également citer l'exemple du miR-146 qui cible les gènes des récepteurs de plusieurs molécules pro-inflammatoires des macrophages comme le TNFalpha ou l'interleukine-1<sup>174</sup>.

Les cellules musculaires lisses sont des acteurs importants dans le processus d'athérosclérose et la balance entre leur différenciation et leur prolifération est responsable de la stabilité ou de l'instabilité de la plaque. Plusieurs miARNs sont responsables de cette balance et vont donc contribuer à la rupture de la plaque comme par exemple, les miR-143, miR-145, miR-221 et miR-222<sup>175, 176</sup>.

Les LDL, transporteurs du cholestérol, sont également des acteurs importants et un taux élevé de LDL dans le sang est un facteur de risque notable dans l'athérosclérose. Le miR-122 participe à la régulation de la biosynthèse du cholestérol en diminuant l'expression de l'enzyme 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA-reductase<sup>177</sup> ayant pour conséquence d'augmenter les LDL circulants.

Cette liste est bien sûr non exhaustive car il y a encore bien d'autres miARNs non cités ici qui régulent des mécanismes aboutissant à l'apparition de l'athérosclérose ou à l'IDM. Le plus important à retenir de ces découvertes est l'application thérapeutique potentielle ouvrant de nouvelles portes en matière de thérapie dans le domaine cardiovasculaire.

Les études sur la modulation des miARNs dans le cadre de maladies cardiovasculaires sont très nombreuses chez les animaux. Comme expliqué précédemment, ces expériences utilisent des prémiRs, des antimiriRs ou génèrent des animaux génétiquement modifiés (KO ou KI).

Dans le contexte de l'IDM uniquement, sans prendre en compte le remodelage ventriculaire, peu de miARNs ont été étudiés pour leur aspect thérapeutique. On peut tout de même citer le miR-874 qui, inhibé par un antagomiR, permet de réduire le nombre de cellules nécrotiques et diminue la taille de l'IDM chez la souris<sup>178</sup>. La modulation de ce miARN apparaît comme une nouvelle approche thérapeutique pour le ciblage de la nécrose myocardique.

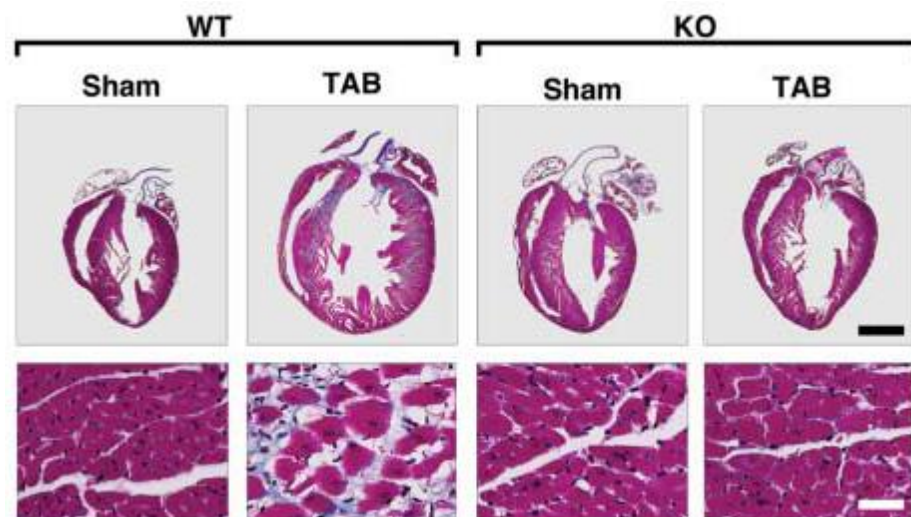
#### 3.1.4. Rôle des miARNs dans le remodelage ventriculaire et dans l'IC

Le remodelage cardiaque est défini comme une altération de la structure et du fonctionnement du cœur. C'est l'une des principales réponses du cœur au stress et plusieurs études ont montré que les miARNs ont des implications fonctionnelles dans le remodelage cardiaque<sup>179</sup>.

Afin de mieux comprendre ces implications, le profil d'expression des miARNs a été caractérisé pendant le remodelage cardiaque et il apparaît évident que les miARNs modulent des composants clés du remodelage ventriculaire et qu'ils réactivent des gènes fœtaux<sup>180</sup>.

Par exemple, le miR-21 est impliqué dans le développement de la fibrose cardiaque post-IDM via la voie des ERK-MAP kinase dans les fibroblastes<sup>181</sup>. L'inhibition du miR-21, via un antagonomiR chez des souris présentant un remodelage cardiaque dû à une hypertension, a montré une réduction de la voie des ERK-MAP kinase, inhibant ainsi la fibrose et améliorant la fonction cardiaque.

Le miR-208, déjà connu pour sa modulation dans l'IDM, est également connu dans l'hypertrophie des cardiomyocytes et la fibrose. Ce miARN, spécifique du cœur, est transcrit depuis l'intron du gène codant pour la chaîne lourde de la myosine alpha et régule l'expression de la chaîne lourde de la myosine bêta. Il a été montré que des souris déficientes pour le miR-208 possèdent un phénotype cardiaque normal. En revanche, lorsque ces souris ont subi un rétrécissement de l'aorte thoracique, les cœurs ne présentent plus de remodelage ventriculaire à l'inverse des souris sauvages, 21 jours après l'opération. De plus, la fibrose est nettement atténuée (**Figure 15**)<sup>158</sup>.



**Figure 15:** Coupes histologiques de cœurs de souris contrôles (*sham*) ou ayant subi un rétrécissement de l'aorte thoracique (TAB), de type sauvage (WT) ou mutées pour le miR-208 (KO). Coloration au Trichrome de Masson.

L'absence du miR-208 réduit considérablement l'hypertrophie ventriculaire par rapport à une souris de type sauvage. La fibrose, colorée en bleu sur les coupes du bas est également réduite.

Image d'après Van Rooij et al., 2007<sup>158</sup>

Chez le rat hypertendu, il a aussi été montré que la diminution de l'expression du miR-208 par des injections sous-cutanées d'un oligonucléotide antisens anti-miR-208 empêche les modifications de l'expression des protéines des chaînes de myosine et diminue le remodelage ventriculaire<sup>182</sup>.

Un autre exemple plus récent mais dans le même ordre d'idée, est celui du miR-155. Chez des souris présentant une hypertrophie, la délétion du miR-155 supprime l'hypertrophie cardiaque et le remodelage en réponse à des stress causant une réponse pathologique. Plus important, il a été montré que le miR-155 serait capable d'empêcher la progression de l'IC<sup>183</sup>.

La liste des miARNs impliqués dans le remodelage ventriculaire est longue et non exhaustive. En effet, les miARNs ne sont pas seulement modulés dans les fibroblastes et les cardiomyocytes. Ils ont également un rôle dans les fonctions vasculaires et endothéliales<sup>184</sup>. Ces données montrent que l'inhibition des miARNs a un réel potentiel thérapeutique pour réduire le remodelage ventriculaire post-IDM et peut être envisagée en clinique.

Une autre stratégie a été envisagée, celle de cibler plusieurs miARNs à la fois dans un but thérapeutique. En effet, il est clair que plusieurs miARNs sont impliqués dans un même événement pathologique. Ceci est en partie dû au fait que les miARNs sont répartis en famille possédant une séquence commune appelée « seed ». Cette séquence, de 7 nucléotides, est la séquence qui doit être parfaitement complémentaire entre le miARN et l'ARNm pendant la régulation pour avoir son action. Ainsi plusieurs miARNs partagent cette séquence et on peut cibler cette séquence avec un antimiR pour cibler toute une famille de miARN<sup>185</sup>.

Par exemple, un antimiR ciblant la famille du miR-15 contenant 6 miARNs différents, a été injecté chez la souris et a permis d'améliorer la FE après un IDM et de réduire la fibrose<sup>186</sup>. Le ciblage de la famille du miR-34 a lui aussi permis de réduire le remodelage cardiaque induit par l'IDM ou par l'hypertension induite par une constriction de l'aorte thoracique<sup>187</sup>. De plus, ceci a permis d'améliorer la fonction cardiaque et de réduire la fibrose.

Au laboratoire, nous avons également montré que la modulation de plusieurs miARNs de façon combinée permet de réduire l'hypertrophie des cardiomyocytes<sup>188</sup> alors que la modulation de ces miARNs de façon distincte n'apporte pas de résultats concluants.

Tous ces exemples nous montrent l'intérêt et le potentiel envisageable avec ces stratégies d'un point de vue clinique. C'est pour cette raison que la recherche ne doit pas se limiter à des tests chez la souris et qu'il est primordial de transposer ces études sur le porc qui est un animal bien plus proche, au niveau physiologique, de l'homme.

Une inhibition avec un antimiR de la famille du miR-15 a été réalisée et montre une diminution de l'expression des miARNs mais n'a pas encore été testée sur des porcs présentant un remodelage cardiaque<sup>186</sup>. Le miR-92a, quant à lui, diminue la taille de l'IDM après la technique d'ischémie/reperfusion et après l'injection de l'antimiR-92a<sup>189</sup>.

Le développement d'outils comme les prémiRs ou les antimiRs est en pleine expansion depuis que leurs effets ont été prouvés en recherche fondamentale et en recherche préclinique.

Au niveau des pathologies cardiovasculaires, des antimiRs contre le miR-208a et le miR-499 sont en développement ainsi qu'un antimiR contre la famille du miR-15. Cependant aucun traitement ciblant les miARNs n'est encore réalisé chez l'homme à l'heure actuelle pour pallier à une maladie cardiovasculaire telle que l'IC.

L'étude des miARNs dans le contexte de l'IC aide à comprendre son rôle physiopathologique. Malheureusement, il n'y a encore que peu d'études sur les miARNs après une IC comparé aux études des miARNs après un IDM.

Des études ont indiqué que dans les cœurs humains atteints d'IC, il y a une réactivation de l'expression de gènes fœtaux<sup>190</sup>. L'expression des miARNs apparait comme très similaire entre des patients avec une IC avancée et des tissus de cœurs humains de fœtus. Cette réactivation de gènes éteints, comme ceux des miARNs par exemple, a pour conséquence de modifier la balance protéique entre les différentes isoformes de la chaîne lourde de myosine. En effet, il y a une diminution des chaînes alpha et une augmentation des chaînes bêta ce qui entraîne une diminution de la contractilité dans les cœurs et donc une IC.



Par exemple, on observe dans des cœurs atteints d'IC, une surexpression du miR-21, du miR-129 et du miR-212. De plus, lors d'une transfection de ces miARNs sur des cardiomyocytes néonataux de rat, il y a induction de changements morphologiques causant une hypertrophie des cellules et la réactivation de gènes fœtaux<sup>180</sup>.

Pour explorer quels miARNs peuvent être utilisés comme biomarqueurs dans l'IC, des travaux ont été réalisés en étudiant des profils d'expression des miARNs chez des patients présentant une IC tout comme il a été réalisé chez des patients avec IDM.

Les études sont peu nombreuses mais il a tout de même été observé des augmentations des miR-21, miR-23a, miR-122, miR-133, miR-423 et miR-499 et des diminutions des miR-1, miR-7, miR-150<sup>191, 192</sup>. De façon intéressante, le miR-423 s'est révélé être un bon marqueur diagnostique et est corrélé avec le marqueur de référence dans l'IC, le pro-BNP<sup>193</sup>.

Au niveau du pronostic des patients présentant une IC, aucun biomarqueur n'est encore capable de prédire avec certitude le devenir des patients. Une étude en cours menée au laboratoire chez des patients atteints d'IC a permis de montrer qu'un faible taux de miR-423-5p est associé avec un mauvais devenir des patients. Ce miARN pourrait donc constituer un biomarqueur pronostique de l'IC.

Dans l'étude n°2 présentée dans ce mémoire, portant sur le miR-150, l'objectif a été d'identifier de nouveaux miARNs avec un potentiel de biomarqueur dans le remodelage ventriculaire post-IDM et dans l'IC.

## 3.2. Implication des lncARNs dans la physiopathologie cardiaque

L'émergence des lncARNs ces dernières années dans le monde de la recherche n'a pas épargné le domaine cardiovasculaire qui connaît une forte augmentation des études sur le sujet. Ceci est dû au fait que les lncARNs ont été trouvés comme différentiellement exprimés dans le développement cardiaque et dans les maladies cardiovasculaires ce qui suggère leur implication dans les mécanismes physiologiques et pathologiques cardiaques. La compréhension de ces mécanismes pourrait conduire vers la découverte de nouveaux biomarqueurs et de cibles thérapeutiques pour les maladies cardiovasculaires.

### 3.2.1. Les lncARNs dans le développement cardiaque

Comme mentionné précédemment, le développement cardiaque est un phénomène complexe qui requiert des régulations précises et spécifiques en temps et en lieu pour la migration, prolifération et différenciation cellulaire. Cette régulation si précise renvoie vers la notion de molécules signales et en particulier vers les lncARNs capables de régulations très spécifiques.

De plus, le comportement des cellules durant l'embryogenèse est médié par un programme transcriptionnel précis incluant de nombreuses régulations des gènes en *cis* et notamment par les séquences enhancers. Le génome contient plus de 1 million de séquences enhancers qui sont activées par des facteurs de transcription<sup>194</sup>. Comme décrit auparavant, les lncARNs peuvent provenir de séquences enhancers en amont de promoteurs de gènes et ainsi permettre une interaction entre les deux régions.

Compte-tenu de ces informations, il apparaît évident que les lncARNs sont impliqués dans le développement cardiaque. De plus, ceci a été très bien montré dans l'étude d'Ounzain et al. en 2014. En effet, cette équipe a montré que des elncARNs d'origine cardiaque sont transcrits pendant le développement fœtal et que leur expression est corrélée avec l'état embryonnaire<sup>132</sup>.

De plus il a été montré que parmi 834 transcrits ayant une spécificité cardiaque et provenant de régions intergéniques, la majorité provient de régions enhancers et sont impliqués dans le développement cardiaque<sup>195</sup>. De façon intéressante, la majorité des lncARNs identifiés dans des cœurs de souris ayant subi un stress sont également associés avec des séquences enhancers spécifiques du cœur<sup>13</sup>. Le lncARN *mm85* (**Figure 13.5., page 68**) par exemple est un lncARN transcrit depuis une séquence enhancer qui agit sur l'expression du gène de la *myocardin*, voisin en formant une boucle chromatique entre la région enhancer et la région promotrice<sup>132</sup>. L'inhibition des lncARNs réduit donc l'expression des gènes voisins par des mécanismes de régulation en *cis*. Il existe également d'autres lncARNs impliqués dans le développement et n'agissant pas comme un enhancer<sup>132</sup>.

On trouve par exemple, le lncARN *Braveheart*, découvert en 2013, qui est requis pour la différenciation des cellules en cardiomyocytes chez la souris. Il entraîne l'expression du gène *MesP1* (*mesoderm posterior 1*), un marqueur des cellules progénitrices cardiaques, en séquestrant le complexe PCR2. Il possède donc un mécanisme de piège<sup>196</sup>. Malheureusement *Braveheart* ne possède pas d'homologue chez l'homme et la question est de savoir si un tel gène existe chez l'homme et possède cette fonction importante.

On peut encore citer l'exemple du lncARN *Fendrr*, déjà cité pour son mécanismes de guide (**Figure 13.3., page 68**) et présentant des homologues chez le rat et chez l'homme. Il a été caractérisé en 2012 comme étant impliqué dans le développement des souris, suite à des délétions de *Fendrr* conduisant à une létalité prématurée des embryons<sup>125</sup>. Il régule l'expression d'importants facteurs de transcription cardiaques comme GATA-6, NKX2.5, FOXF1, TBX3 et PITX2 en modulant l'état chromatique de leur promoteur par des mécanismes de méthylation.

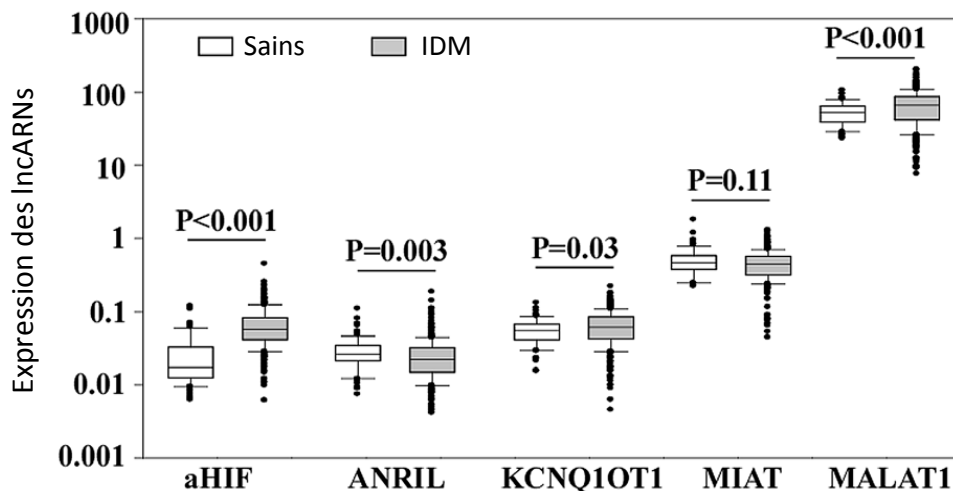
Le lncARN *kcnq1ot1*, dont les divers mécanismes d'action ont été présentés précédemment, serait également impliqué dans le développement cardiaque puisqu'il régule le gène *kcnq1*, un gène crucial dans le développement cardiaque<sup>197</sup>.

Ces gènes permettent ainsi dans des cellules indifférenciées de contrôler et d'emmener la cellule vers un programme génétique cardiaque. Chez des cellules déjà différenciées, ces transcrits permettent de maintenir une spécialisation cellulaire.

### 3.2.2. Implication des lncARNs dans l'IDM

C'est en 2006 que les premières découvertes sur les lncARNs dans l'IDM ont été réalisées lors d'une étude génétique sur le polymorphisme nucléotidique dans l'IDM. Un ARN ne codant pas pour des protéines et associé fortement avec l'IDM a été découvert et nommé par les auteurs *MIAT*<sup>198</sup>. Ils ont montré que la modification d'un seul nucléotide de ce gène entraîne une augmentation de son expression et modifie sa fixation avec différentes protéines. Cependant sa fonction reste encore inconnue dans le cœur. *MIAT* est également connu sous le nom de *Gomafu* et a montré une action dans les cellules souches pluripotentes via l'action d'*Oct4*<sup>199</sup>. Il a également un rôle dans le développement du cerveau via le gène *Wnt*<sup>200</sup>. La voie de signalisation impliquant Wnt est une voie importante dans les maladies cardiovasculaires, il serait donc intéressant d'étudier le lien avec *MIAT* dans ce contexte.

Récemment, des études réalisées au laboratoire ont montré que l'expression de *MIAT* n'est pas modulée dans les cellules sanguines entre des volontaires sains et des patients atteints d'IDM<sup>201</sup> (**Figure 16**).



**Figure 16:** Niveau d'expression des lncARNs *aHIF*, *ANRIL*, *Kcnq1ot1*, *MIAT* et *MALAT1* dans les cellules sanguines de volontaires sains (n=86) et de patients atteints d'IDM (n=414). Le sang des patients a été obtenu au moment de la reperfusion et les lncARNs ont été mesurés par PCR utilisant le gène *SF3a1* comme gène de ménage pour la normalisation.

Graphique extrait de la publication de Vausort et al., 2014<sup>201</sup>

Cependant, l'expression de 4 autres lncARNs est régulée de façon significative entre les deux groupes. En effet, les niveaux d'expression d'*aHIF*, *kcnq1ot1* et *MALAT1* s'avèrent être augmentés chez les patients avec IDM alors que le niveau de *ANRIL* est diminué. Ces lncARNs apparaissent donc comme des biomarqueurs potentiels pour l'IDM.

Ces 4 autres lncARNs n'ont bien sûr pas été sélectionnés au hasard.

*aHIF* est l'antisens du gène *HIF1α* (*hypoxia inductible factor 1 alpha*), un facteur de transcription impliqué dans la réponse des cellules à l'hypoxie. *aHIF* a été montré comme étant surexprimé dans le cœur de patients atteints d'IC<sup>202</sup>.

*ANRIL* est un antisens du locus *INK4b/ARF/INK4a* qu'il régule grâce à son action avec les complexes PRC1 et PRC2 (**Figure 13.4., page 68**), Il maintient la répression de l'expression de *INK4b/ARF/INK4a* grâce à des méthylations effectuées par PRC1 et PRC2<sup>127, 203</sup>. Il a été montré qu'*ANRIL* est associé avec un risque très élevé de développer des maladies coronariennes ainsi que d'autres pathologies comme le cancer<sup>204, 205</sup>. De plus, il est impliqué dans le métabolisme du glucose et des acides gras<sup>206</sup>.

*Kcnq1ot1*, comme cité précédemment, serait impliqué dans le développement mais il est également impliqué dans des désordres cardiaques congénitaux entraînant des anomalies dans les battements cardiaques et le décès prématuré<sup>207</sup>.

Enfin, *MALAT1*, également décrit précédemment (**Figure 13.2., page 68**), est présent de façon très abondante dans les cellules circulantes et il est impliqué dans des mécanismes d'épissage et de régulation épigénétique<sup>120</sup>.

L'équipe de Liu et al. a montré une régulation de l'expression des lncARNs chez la souris après l'ischémie/reperfusion. Certains lncARNs ont présenté une expression augmentée (*AK035396*, *ENSMUST00000156081*, *AK005401*, *ENSMUST00000118172*) et d'autres une expression diminuée (*oc007prv.1*, *AK080112*, *ENSMUST00000170410*, *AK156124*)<sup>208</sup>.

Au niveau des mécanismes liés à l'IDM, on trouve les mécanismes de mort cellulaire et notamment ceux de l'apoptose des cardiomyocytes. La fission des mitochondries est impliquée dans la réponse au stress et l'apoptose. Il a été montré récemment qu'un lncARN appelé *CARL* (*cardiac apoptosis-related*) serait impliqué dans la fission mitochondriale en ciblant le miR-539 par un mécanisme de piège<sup>209</sup>. En effet, le miR-539 est responsable d'une dysfonction de la fission mitochondriale et donc de l'apoptose en ciblant le gène *PHB2* dans des conditions d'anoxie. Ainsi, *CARL* agirait avec un mécanisme d'éponge sur le miR-539 empêchant son action sur *PHB2* et donc empêchant l'apoptose. Le ciblage de *CARL* est donc une stratégie thérapeutique pour réduire l'apoptose et l'IDM<sup>209</sup>.

### 3.2.3. Rôle des lncARNs dans le remodelage ventriculaire et l'IC

En 2013, il a été montré pour la première fois que les lncARNs sont régulés après l'IC dans le cœur, dans le sang et dans le plasma<sup>210</sup>. Cette équipe a réalisé ces analyses grâce à des puces à ARN contenant des sondes de lncARNs sur des plasmas, du sang et des cœurs de souris présentant une IC. Celle-ci a été induite chez ces souris par des injections d'isoprotérénol. 32 lncARNs ont été identifiés comme différentiellement exprimés entre les souris saines et les souris avec IC à la fois dans le cœur, le sang et le plasma et 18 d'entre eux montrent une expression différentielle semblable entre les 3 compartiments. Ces lncARNs apparaissent donc comme de potentiels biomarqueurs de l'IC. D'autant plus que les lncARNs ont été mesurés dans le plasma, leur conférant une propriété de stabilité plutôt étonnante<sup>210</sup>.

Ces résultats très intéressants ont ensuite été montrés chez l'homme quelques mois plus tard. En effet, des analyses de puces à ARN réalisées sur des cœurs humains présentant une IC ont révélé que plusieurs centaines de lncARNs sont régulés avec l'IC. Les lncARNs ont également été étudiés après la pose d'un dispositif permettant d'aider le cœur à fonctionner lors d'une atteinte importante et il s'est avéré que 10% des lncARNs ont vu leur expression se normaliser.

Ceci montre encore une fois que les lncARNs sont bien impliqués dans l'IC et peuvent être de potentielles cibles thérapeutiques pour améliorer la fonction cardiaque ou de potentiels biomarqueurs<sup>211</sup>.

L'idée que les lncARNs puissent être des biomarqueurs circulants est assez déroutante puisque comme ce sont des ARNs de grande taille, on aurait tendance à penser qu'ils sont très fragiles et facilement dégradables, surtout dans les fluides corporels qui contiennent de nombreuses nucléases. Cependant, tout comme les miARNs, les lncARNs ont été retrouvés dans les exosomes<sup>212</sup>. Leur fraction est néanmoins plus faible puisque les miARNs représentent environ 50% des ARNs présents dans les exosomes alors que les lncARNs représentent 3%. Cela corrobore en tout cas le fait que les lncARNs peuvent se retrouver dans les fluides corporels et notamment dans le plasma.

C'est le cas du lncARN *LIPCAR*, un lncARN d'origine mitochondriale, qui a montré une régulation de son expression et une association avec le développement d'un remodelage cardiaque et d'une IC dans le plasma de patients. *LIPCAR* serait donc un biomarqueur très prometteur car capable de prédire le devenir des patients avec un remodelage ventriculaire post-IDM<sup>14</sup>.

Peu de lncARNs permettant de réduire les mécanismes impliqués dans le remodelage ventriculaire ont été identifiés.

Le lncARN *CHRF*, décrit auparavant dans la partie mécanistique, apparaît comme l'une d'entre eux. En effet, il a été montré que *CHRF* agit comme une éponge du miR-489 et le miR-489 cible le gène *Myd88* qui est connu pour être surexprimé dans l'hypertrophie. Ainsi *CHRF* fournit une nouvelle stratégie thérapeutique pour réduire l'hypertrophie via la voie miR-489/*Myd88*<sup>124</sup>.

Le locus de la chaîne lourde de la myosine 7 spécifique du cœur a récemment été mis en avant en montrant qu'il contenait de nombreux lncARNs antisens que l'on a appelé *Mhrt* (Myosin heavy-chain-associated RNA transcripts). L'inhibition de ces transcrits a montré une forte implication dans le développement de cardiomyopathies associées à des surcharges de pression. Ainsi, restaurer l'expression de *Mhrt* permettrait de protéger le cœur de l'hypertrophie et donc de l'IC<sup>213</sup>.

Le lncARN *Sencr* (*smooth muscle and endothelial cell enriched migration/differentiation-associated long non-coding RNA*) a été caractérisé dans les cellules musculaires lisses. Il serait impliqué dans la contractilité de ces cellules en ayant un mécanisme de piège sur des miARNs capables de cibler des gènes essentiels à la contraction comme *MYCD*<sup>214, 215</sup>.

L'équipe de S. Dimmeler a montré que *MALAT1* régule la fonction des cellules endothéliales et est impliqué dans la croissance des vaisseaux<sup>216</sup>. Pour cette étude, des outils très intéressants ont été utilisés tels que des transfections de siARNs dans des cellules endothéliales ou encore des injections de siARNs chez des souris. De plus, des modèles de souris transgéniques pour *MALAT1* ont été réalisés. Des puces à ARN ont permis de caractériser les lncARNs dans les cellules endothéliales et il s'avère que *MALAT1* est très exprimé dans ces cellules et plus exprimé en hypoxie qu'en normoxie. Il a ensuite été montré que la modulation de *MALAT1* module la fonction des cellules endothéliales *in vitro* via des régulateurs du cycle cellulaire et qu'il régule la croissance des vaisseaux *in vivo*. Ceci fait de *MALAT1* une cible thérapeutique intéressante pour la modulation de l'angiogenèse que ce soit au niveau cardiovasculaire mais aussi au niveau des cancers<sup>216</sup>.

Enfin, récemment, Ounzain et al. ont montré l'implication des lncARNs dans le contexte de l'IDM et du remodelage ventriculaire post-IDM<sup>13</sup>. Cette équipe a identifié de nouveaux lncARNs spécifiques du cœur et impliqués dans des mécanismes de remodelage maladaptatif. Effectivement, des centaines de nouveaux lncARNs apparaissent comme étant régulés après remodelage ventriculaire post-IDM et leurs expressions sont corrélées avec les paramètres cardiaques des souris.



Parmi eux, on peut citer le lncARN *NovInc35*, spécifique des cardiomyocytes, *NovInc103* spécifique des fibroblastes ou encore *NovInc61* provenant des deux types cellulaires. Plusieurs de ces nouveaux lncARNs montrent des changements d'expression dans les cellules souches durant la cardiogenèse, suggérant qu'ils peuvent avoir un rôle dans le développement cardiaque. Finalement, il a été montré que 73% de ces nouveaux lncARNs possèdent une séquence orthologue chez l'homme. De plus, 2 d'entre eux, le *NovInc6* et *NovInc44* ont montré une différence d'expression significative dans des cœurs de patients avec une pathologie cardiaque, ce qui en fait des cibles thérapeutiques intéressantes<sup>13</sup>.

Comme évoqué précédemment, la difficulté qui est bien moins rencontrée avec les protéines ou les miARNs, est la transposition vers l'homme puisque les lncARNs sont peu conservés entre les espèces. De plus, même si la séquence est conservée, elle n'a pas forcément la même fonction. Utiliser des lignées de cellules humaines pour l'identification de lncARNs paraît être une solution pour passer outre ces limitations. Autrement, il est possible de débiter et réaliser des études sur des lncARNs de génome animal et de montrer qu'il existe un orthologue chez l'humain comme il a été remarquablement fait dans l'étude précédemment décrite<sup>13</sup>.

Quoi qu'il en soit, il est clair que de nombreuses questions restent aujourd'hui ouvertes avant de conférer aux lncARNs une utilité clinique.

Au laboratoire, l'un de nos objectifs est de détecter de nouvelles cibles thérapeutiques dans l'IDM et le remodelage ventriculaire post-IDM. C'est l'objet d'étude de la publication n°3 présentée dans ce mémoire.



# Matériel et méthodes

## 1. Cohortes de patients

### 1.1. Cohorte APACE

La cohorte APACE (*Advantageous Predictors of Acute Coronary syndrome Evaluation*) est une cohorte de patients ayant été admis à l'hôpital pour des douleurs thoraciques entre 2006 et 2009. Elle comptabilise 1 267 patients qui sont donc considérés comme potentiellement atteints d'IDM.

Les patients inclus ont donné leur consentement écrit en accord avec des comités éthiques propres à chaque institution et conformément à la déclaration d'Helsinki. Cette étude multicentrique a été mise en place et coordonnée par l'hôpital universitaire de Bâle. L'investigateur principal de cette étude est le Professeur Christian Mueller.

Dans l'étude des miARNs, 1 155 patients ont été inclus car les patients présentant une insuffisance rénale ou un diagnostic final non concluant ont été exclus. Chez ces patients, des échantillons sanguins ont été prélevés à leur arrivée, puis 3 et 6 heures après afin d'effectuer entre autre des mesures de cTnT. De plus, des examens ont été réalisés comme un ECG, une échocardiographie et d'autres mesures sanguines, afin d'établir un diagnostic du patient. Le diagnostic final du patient a été établi en prenant tous les examens en compte.

Finalement, la cohorte compte 931 patients non atteints d'IDM et 224 patients avec IDM parmi lesquels on trouve 45 STEMI (20%) et 179 (80%) NSTEMI. Les patients ont été suivis à 3, 12 et 24 mois après leur sortie de l'hôpital. Les données caractéristiques de ces patients sont répertoriées dans le **Tableau 1**.

|   | <b>Patients totaux</b> | <b>Patients atteints d'IDM</b> |               | <b>Valeur de p</b> |
|---|------------------------|--------------------------------|---------------|--------------------|
|   | (n=1155)               | Oui (n=224)                    | Non (n=931)   | (IDM /non IDM)     |
| <b>Caractéristiques</b>                           |                        |                                |               |                    |
| Age   | 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           | 85 (68-101)            | 73,6 (59-95)                   | 87 (70-102)   | < 0,001            |
| STEMI   |                        | 45 (20%)                       |               |                    |
| NSTEMI  |                        | 179 (80%)                      |               |                    |
| <b>Facteurs de risque, n (%)</b>                  |                        |                                |               |                    |
| 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              |
| <b>Antécédents, n (%)</b>                         |                        |                                |               |                    |
| Maladies coronariennes                            | 436 (37%)              | 106 (48%)                      | 309 (33%)     | <0,001             |
| IDM   | 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             |
| <b>Statut vital (médiane, rang interquartile)</b> |                        |                                |               |                    |
| 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, bpm                             | 76 (66-89)             | 79 (68-90)                     | 75 (65-89)    | 0,055              |
| <b>Symptômes</b>                                  |                        |                                |               |                    |
| 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              |
| <b>Modifications à l'ECG</b>                      |                        |                                |               |                    |
| 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             |

**Tableau 1:** Données caractéristiques des 1 155 patients inclus dans l'étude APACE

## 1.2. Cohorte de patients avec IDM pour l'étude du miR-150

Cette cohorte compte 90 patients présentant un IDM avec une élévation du segment ST (STEMI). En effet, ces patients ont montré toutes les caractéristiques de la survenue d'un IDM, à savoir des symptômes physiques, l'augmentation du segment ST et l'augmentation des troponines et des créatine kinases. Tous les patients inclus ont donné leur consentement écrit en accord avec des comités éthiques et conformément à la déclaration d'Helsinki.

Le premier groupe de patients inclut 60 patients qui composent le groupe de dérivation. Les expériences de puces à ARN ont été effectuées sur ce groupe. Il inclut des patients admis pour un IDM entre le 1<sup>er</sup> Septembre 2004 et le 31 Mars 2005, dans l'unité des soins coronaires de l'hôpital St Georges à Londres<sup>217</sup>. Les patients avec des maladies supplémentaires ont été exclus ainsi que ceux dont l'ECG n'avait pas donné de résultats assez clairs. La majorité d'entre eux a été traitée par thrombolyse. La fonction cardiaque a été évaluée par échocardiographie entre 3 et 4 jours après l'IDM ainsi que pendant le suivi après 176 jours en moyenne (entre 138 et 262 jours). Le remodelage ventriculaire a été évalué en calculant la différence des VTD des ventricules gauches mesurés aux 2 temps ( $\Delta$ VTD). Les patients ont été considérés comme présentant un remodelage lorsque la  $\Delta$ VTD $\Delta$  était positive. Ainsi, dans ce groupe, 30 patients présentaient un remodelage et 30 patients ne présentaient pas de remodelage.

Le second groupe, incluant 30 nouveaux patients, est le groupe de validation. Il comprend des patients ayant également subis un IDM avec élévation du segment ST et admis en 2010 à l'hôpital Glenfield de Leicester. Ces patients ont été traités à leur arrivée à l'hôpital par angioplastie coronaire. Leurs paramètres cardiaques ont été évalués par IRM quelques jours après l'IDM puis pendant le suivi 121 jours en moyenne après IDM (entre 98 et 209 jours). Ce groupe a été divisé en 2, les patients sans remodelage (n=11) et les patients avec remodelage (n=19). Les données caractéristiques de ces patients sont présentées dans le **Tableau 2**.

|   | Cohorte de dérivation (n=60) |                              |                           |      | Cohorte de validation (n=30) |        |
|---|------------------------------|------------------------------|---------------------------|------|------------------------------|--------|
|   | n=60                         | $\Delta$ VTD $\leq$ 0 (n=30) | $\Delta$ VTD $>$ 0 (n=30) | P    |                              | P      |
| Age, médiane (rang interquartile)                                     | 63,5 (38-86)                 | 63,5 (38-86)                 | 63,5 (40-86)              | 0,99 | 62,5 (42-82)                 | 0,27   |
| Sexe masculin, n (%)  | 46 (77)                      | 20 (67)                      | 26 (87)                   | 0,08 | 28 (93)                      | 0,66   |
| <b>Ethnicité, n (%)</b>   |                              |                              |                           |      |                              |        |
| Caucasiens  | 52 (87)                      | 27 (90)                      | 25 (83)                   | 0,99 | 29 (97)                      | 0,86   |
| Asiatique   | 8 (13)                       | 3 (10)                       | 5 (17)                    | 0,71 | 1 (3)                        | 0,27   |
| <b>Facteurs de risque, n (%)</b>                                      |                              |                              |                           |      |                              |        |
| Tabac   | 27 (45)                      | 14 (47)                      | 13 (43)                   | 1    | 13 (43)                      | 0,91   |
| Hypercholestérolémie familiale  | 20 (33)                      | 10 (33)                      | 10 (33)                   | 1    | 6 (20)                       | 0,45   |
| Angine  | 2 (3)                        | 1 (3)                        | 1 (3)                     | 1    | 0 (0)                        | 1      |
| Diabète   | 0 (0)                        | 0 (0)                        | 0 (0)                     | 1    | 0 (0)                        | 1      |
| Hypertension  | 12 (20)                      | 6 (20)                       | 6 (20)                    | 1    | 8 (27)                       | 0,76   |
| Hypercholestérolémie  | 12 (20)                      | 8 (27)                       | 4 (13)                    | 0,33 | 8 (27)                       | 0,76   |
| IDM   | 0 (0)                        | 0 (0)                        | 0 (0)                     | 1    | 0 (0)                        | 1      |
| Angioplastie  | 1 (1,7)                      | 0 (0)                        | 1 (3)                     | 1    | 0 (0)                        | 1      |
| Pontage coronarien  | 0 (0)                        | 0 (0)                        | 0 (0)                     | 1    | 0 (0)                        | 1      |
| <b>Présentation, n (%)</b>  |                              |                              |                           |      |                              |        |
| STEMI   | 60 (100)                     | 30 (100)                     | 30 (100)                  | 1    | 30 (100)                     | 1      |
| IDM antérieur   | 28 (47)                      | 11 (37)                      | 17 (57)                   | 0,20 | 18 (60)                      | 0,63   |
| Thrombolyse   | 34 (57)                      | 21 (70)                      | 13 (46)                   | 0,07 | 0 (0)                        | <0,001 |
| <b>Marqueurs sériques à l'admission, médiane (rang interquartile)</b> |                              |                              |                           |      |                              |        |
| Troponine I, ng/ml  | 16,9 (0,5-150)               | 22,8 (1,5-150)               | 14,3 (0,5-150)            | 0,85 | 21,9 (8,25- >50)             | 0,84   |
| CK, U/L   | 1230 (56-7384)               | 1148 (56-4423)               | 1367 (216-7384)           | 0,57 | 1101 (232-6308)              | 0,77   |
| Nt-proBNP, ng/L   | 2,82 (0,94-3,8)              | 2,85 (1,25-3,8)              | 2,8 (0,94-3,61)           | 0,47 | 0,85 (0,007-4,75)            | <0,001 |
| <b>Médications à l'admission, n (%)</b>                               |                              |                              |                           |      |                              |        |
| Aspirine  | 5 (8)                        | 3 (10)                       | 2 (7)                     | 1    |                              |        |
| Clopidogrel   | 1 (2)                        | 1 (3)                        | 0 (0)                     | 1    |                              |        |
| B-bloquants   | 5 (8)                        | 4 (13)                       | 1 (3)                     | 0,35 |                              |        |
| Antagonistes du calcium   | 6 (10)                       | 2 (7)                        | 4 (13)                    | 0,67 |                              |        |
| Inhibiteurs de l'enzyme de conversion                                 | 5 (8)                        | 2 (7)                        | 3 (10)                    | 1    |                              |        |
| Bloquant du récepteur à l'angiotensine                                | 2 (3)                        | 1 (3)                        | 1 (3)                     | 1    |                              |        |
| Statines  | 4 (7)                        | 3 (10)                       | 1 (3)                     | 0,61 |                              |        |
| <b>Médications pendant le suivi, n (%)</b>                            |                              |                              |                           |      |                              |        |
| Aspirine  | 51 (85)                      | 22 (73)                      | 29 (97)                   | 0,03 |                              |        |
| Clopidogrel   | 16 (27)                      | 8 (27)                       | 8 (27)                    | 1    | 27 (90)                      | 0,002  |
| B-bloquant  | 56 (93)                      | 26 (87)                      | 30 (100)                  | 0,11 | 29 (97)                      | 0,96   |
| Inhibiteur de l'enzyme de conversion                                  | 53 (8)                       | 25 (83)                      | 28 (93)                   | 0,47 | 29 (97)                      | 0,90   |
| Bloquant du récepteur à l'angiotensine                                | 4 (7)                        | 2 (7)                        | 2 (7)                     | 1    |                              |        |
| Diurétique  | 5 (8)                        | 3 (10)                       | 2 (7)                     | 1    | 4 (13)                       | 0,49   |
| Statine   | 59 (98)                      | 29 (97)                      | 30 (100)                  | 1    | 30 (100)                     | 0,92   |
| Warfarine   |                              |                              |                           |      | 5 (17)                       |        |
| Antagoniste de l'aldostérone  |                              |                              |                           |      | 2 (7)                        |        |
| <b>Données terminales</b>   |                              |                              |                           |      |                              |        |
| Réinfarctus, n (%)  | 5 (8)                        | 3 (10)                       | 2 (7)                     | 1    |                              |        |
| IF, n (%)   | 5 (8)                        | 1 (3)                        | 4 (13)                    | 0,35 | 5 (17)                       | 0,31   |
| Décès, n (%)  | 1 (2)                        | 0 (0)                        | 1 (30)                    | 1    |                              |        |

**Tableau 2:** Données caractéristiques des patients inclus dans l'étude du miR-150

## 2. Protocoles expérimentaux

### 2.1. Animaux

Les études ont été conduites en accord avec le règlement concernant le bien-être des animaux de l'institut national du guide de la santé pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire.

Les protocoles ont été approuvés par le comité d'éthique local ainsi que par la Direction Départementale de Protection des Populations, agréments RAR1A03516811825 et 54-100.

Les animaux utilisés ont été exclusivement des souris de souche C57BL/6J (Charles River, France ou Harlan, Pays-Bas), étant âgées de 8 à 12 semaines et avec un poids compris entre 18 et 25g.

Les souris ont été hébergées dans une animalerie quotidiennement contrôlée avec un cycle lumière/obscurité de 12 heures, une température comprise entre 20 et 22°C et un taux d'humidité de 35 à 40%. Elles ont eu accès à l'eau et à une nourriture standard sans restriction.

Cette lignée de souris consanguines est fréquemment utilisée en recherche cardiovasculaire par le fait qu'elle est capable de développer des lésions athérosclérotiques avec un régime riche en lipide mais également pour sa forte résistance à la chirurgie.

## 2.2. Ligature coronaire

Afin d'induire un IDM, les souris ont été soumises à une ligature de l'artère interventriculaire antérieure, selon un protocole couramment utilisé<sup>218</sup>. Cette chirurgie, qui nécessite une thoracotomie, peut être considérée comme ayant un pallier de douleur de niveau 2, voire de niveau 3 pendant l'acte chirurgical. Ainsi les moyens analgésiques et anesthésiques mis en œuvre doivent être importants et sérieusement considérés.

Avant toute opération sur l'animal, une injection sous cutanée de 0,05 mg/kg de buprénorphine (Temgésic<sup>®</sup>) a été réalisée. C'est un analgésique central, ayant une action de 8 heures, qui permet une diminution de la douleur pendant la chirurgie et au réveil de l'animal. De plus, un mélange xylazine/kétamine, de faible concentration (5µg/ml ; 50µg/ml respectivement), a été injecté par voie intrapéritonéale. Cette combinaison de drogue permet une potentialisation du pouvoir analgésique lors de la chirurgie entraînant une diminution de la douleur acceptable lors d'une intervention de niveau 3.

Les animaux ont été ensuite anesthésiés en utilisant une boîte à induction avec un mélange gazeux d'isoflurane (2,5% isoflurane /1,5% O<sub>2</sub>). Dans ce type de chirurgie, les chances de survie de l'animal sont plus élevées avec un réveil rapide, ce qui est envisageable avec un anesthésique gazeux tel que l'isoflurane et une concentration faible en kétamine, anesthésique habituellement associé à la xylazine.

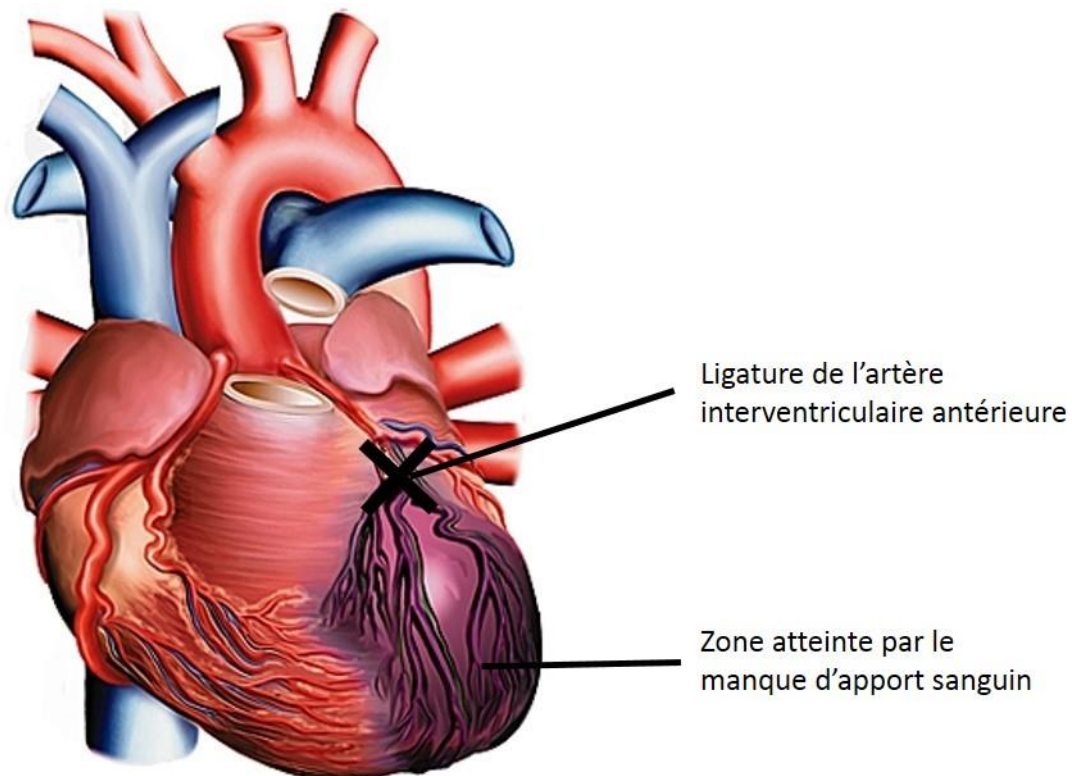
Les souris ont été ensuite rapidement intubées avec une sonde endotrachéale afin d'être ventilées par un mélange gazeux d'isoflurane durant toute la chirurgie (2% isoflurane /1,5% O<sub>2</sub>) (Harvard Apparatus, USA, volume tidal = 220µl, fréquence respiratoire = 170 mouvements par minute). En effet, l'intubation est obligatoire puisque l'animal subit une thoracotomie qui entraîne un affaissement des poumons en cas de non-ventilation assistée. L'intubation a été confirmée par l'observation de l'expansion/rétraction de la poitrine et l'anesthésie a été vérifiée par la perte du réflexe de pincement de la patte.



L'animal a ensuite été placé en décubitus dorsal, puis un ruban adhésif a été placé de façon lâche sur le cou afin de maintenir la sonde en place. Les 4 pattes ont été également fixées. La partie haute gauche du thorax a été rasée puis désinfectée.

Après avoir incisé la peau, les muscles pectoraux majeurs et mineurs ont été disséqués afin de mettre en évidence les côtes. La thoracotomie a été effectuée entre la 2<sup>ème</sup> et la 3<sup>ème</sup> côte (3<sup>ème</sup> espace intercostal), puis le cœur a été mis en évidence en écartant les côtes avec des fils (Vicryl, Ethicon 6-0, Johnson & Johnson Medical, Belgique).

Après avoir effectué la péricardotomie, l'artère interventriculaire antérieure a été ligaturée (Prolène, Ethicon 7-0, Johnson & Johnson Medical, Belgique) à environ 3mm de la naissance de l'artère aorte (**Figure 17**). La survenue de l'IDM a été confirmée par le blanchiment de la partie du ventricule gauche située sous le nœud de ligature.



**Figure 17:** Représentation schématique de la ligature coronaire  
La croix noire représente l'endroit où est effectué le nœud lors de la chirurgie.  
Schéma modifié d'après [www.larousse.fr](http://www.larousse.fr)

En analgésie locale, un mélange lidocaïne/adrénaline (10mg/kg, Aguetant, France) a été déposé sur le cœur afin de potentialiser à nouveau l'analgésie et procurer à l'animal un plus grand confort. L'adrénaline permet d'augmenter les battements cardiaques qui sont affaiblis après la ligature.

Les côtes ont été ensuite refermées avec les 4 fils mis en place pour exposer le cœur. Les muscles ont été remplacés et la peau a été suturée. Une fois que l'animal avait retrouvé sa respiration spontanée, il a été extubé. Il a ensuite été placé dans une chambre chauffée à 30°C jusqu'au réveil. Le même protocole a été effectué pour l'opération *sham*, à l'exception de la ligature.

Une seconde injection de buprénorphine a été réalisée, 8 heures post-opératoire afin de garder l'animal en condition d'analgésie pendant une durée plus longue.

## 2.3. Imagerie cardiaque par tomographie à émission de positrons

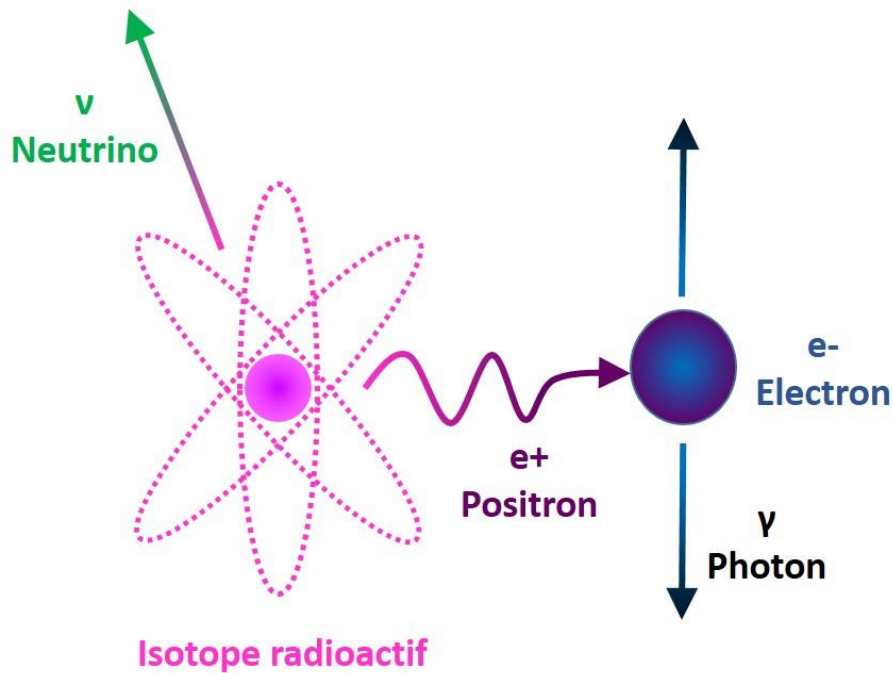
### 2.3.1. Principe

La technique de TEP utilisant le 18Fluor-fluorodeoxyglucose (18F-FDG) est une technique, en imagerie cardiaque, permettant de différencier un ventricule sain d'un ventricule nécrosé<sup>219</sup><sup>220</sup>. Comme pour tous les examens de médecine nucléaire, la TEP nécessite l'injection d'un traceur radioactif.

Un traceur radioactif est composé d'une molécule qui est distribuée dans l'organisme et d'un isotope radioactif émetteur de positrons qui ne modifie pas les propriétés de la molécule. L'isotope radioactif le plus utilisé en imagerie cardiaque est le 18F qui a une demi-vie de 110 minutes. Il est souvent couplé au FDG, un analogue du glucose qui permet donc d'étudier le métabolisme des cellules.

L'isotope radioactif émet des positrons car il possède un excès de charges positives (protons) dans son noyau. En effet, il se désintègre vers un état stable avec la transformation d'un proton en un neutron. Ceci entraîne l'émission d'un neutrino et d'un positron. Une fois émis, ce positron va parcourir quelques millimètres au cours desquels il perd son énergie. Une fois au repos, le positron interagit avec un électron du milieu suivant une réaction d'annihilation. Ainsi, il y a une émission de deux rayonnements gamma dans des sens opposés de 511 keV<sup>221</sup> (**Figure 18**).

Les capteurs situés autour du patient ou de l'animal vont ainsi détecter ces photons en coïncidence, ce qui permet d'identifier la ligne sur laquelle se trouve l'émission des deux photons. L'information mesurée correspond donc au lieu d'annihilation et non à l'endroit d'émission des positrons. La distance entre les deux est appelée libre parcours moyen du positon (0.5mm pour le 18F). Ceci constitue une première limite dans la résolution spatiale. La seconde limite en termes de résolution spatiale est la non colinéarité des deux photons gamma émis. En effet ce défaut peut être de l'ordre de 0,5°.



**Figure 18:** Processus d'annihilation entraînant l'émission de deux photons

Un algorithme de reconstruction va permettre la restitution de l'image en 3 dimensions. Lors de l'analyse des résultats, une diminution de l'activité du FDG indique la zone où le tissu cardiaque est nécrosé. Ces données permettent de définir différents paramètres ventriculaires et ainsi d'évaluer la fonction ventriculaire.

Pour des études chez des animaux de petite taille, le principal problème rencontré lors de l'imagerie est la dégradation de la résolution entraînant un flou et des images de moins bonne qualité. Le TEP utilisé dans notre étude est dédié aux petits animaux et possède une résolution spatiale de 0,8 X 0,4 X 0,4 mm et une résolution temporelle de 11-15 ms. La qualité des images dépend également de la consommation du FDG, elle-même dépendante des conditions métaboliques de l'animal.

Ainsi pour des conditions optimales, une prémédication à l'acipimox (Olbetam®), un composé nicotinique, est réalisée. Elle permet d'inhiber la lipolyse réduisant alors le taux d'acide gras sérique utilisable comme substrat énergétique par les cellules. En effet, l'acipimox est couramment utilisé pour les examens chez l'homme car il permet d'obtenir des images de meilleure qualité en réduisant le rapport signal/bruit sans interférer avec la fonction cardiaque des patients<sup>222</sup>. De plus, des travaux menés au laboratoire ont permis de mettre au point l'évaluation des paramètres cardiaques du rat par TEP grâce à la prémédication à l'acipimox<sup>223</sup>.

### 2.3.2. Protocole

Les animaux ont été mis à jeun la veille afin d'être en hypoglycémie au moment de l'examen. La glycémie a été vérifiée après prélèvement d'une goutte de sang, grâce à un lecteur. 2 heures avant l'examen, la souris a été pesée et une première dose d'acipimox (50 mg/kg Olbetam®) a été injectée par voie intrapéritonéale. Une heure après, la souris a reçu une seconde dose d'acipimox ainsi que 37 MégaBequerel (MBq) de 18F-FDG (IBA, France) par voie veineuse.

L'examen a été réalisé une heure après la dernière injection du traceur radioactif grâce à un appareil de microTEP (Inveon, Siemens, USA). La souris a été anesthésiée avec un mélange gazeux (2% isoflurane/1,5% O<sub>2</sub>) et placée en décubitus ventral sur le tapis chauffant de l'appareil.

Des électrodes (SA Instruments Inc, Stony Brook, USA) ont été appliquées sur les pattes permettant de monitorer l'ECG. Une sonde rectale a été placée pour mesurer la température de l'animal et une sonde a été placée sous l'animal pour mesurer la fréquence respiratoire. Un écran placé à côté de l'appareil a ainsi permis de visualiser en temps réel l'ECG ainsi que la fréquence respiratoire. Ceci est essentiel pour adapter le pourcentage d'anesthésiant afin que la souris ne se réveille pas pendant l'examen.

L'acquisition a duré 40 minutes pour l'émission de  $^{18}\text{F}$  et 10 minutes pour la transmission avec le Cobalt-57 ( $\text{Co}^{57}$ ). Cette source radioactive externe permet d'évaluer les coefficients d'atténuation de la souris pour appliquer une correction et avoir une image plus représentative.

Une fois l'examen terminé, les images ont été reconstruites à l'aide d'un algorithme appelé « *3-D ordered subset expectation maximization* » (OSEM-3-D), comprenant 4 itérations et 16 subsets, une matrice de  $128 \times 128$ , un zoom de 2,0 et une épaisseur de 0,8mm. Ceci a permis d'obtenir des voxels de  $0,8 \times 0,4 \times 0,4$  mm. Le cycle cardiaque a été divisé en 16 intervalles pour la reconstruction et la synchronisation des images. Un logiciel sur une station Esoft (Siemens, USA) a permis de réorienter les images selon le petit axe, le grand axe horizontal et le grand axe vertical.

Le cœur a été divisé en 17 segments, selon une classification établie par l'American Heart Association<sup>224</sup>. La captation du  $^{18}\text{F}$ -FDG, exprimée en pourcentage dans chacun des 17 segments, a été déterminée grâce au logiciel « Quantitative Perfusion Score » (QPS). Les segments étaient considérés comme nécrosés lorsque la captation exprimée était inférieure à 50%, de même que les examens effectués chez l'homme ou chez le rat<sup>223</sup>.

Le logiciel « Quantitative Gated SPECT » (QGS) a permis d'obtenir, à partir de coupes selon le petit axe, les paramètres suivants : VTD, VTS et FE.

## 2.4. Sacrifices et prélèvements d'organes

Les animaux ont été sacrifiés en fin d'expérience, c'est-à-dire à différents temps après ligature coronaire, afin de récupérer un échantillon de sang ainsi que le cœur. Les souris ont été anesthésiées et sacrifiées avec une overdose d'isoflurane (5% isoflurane /1,5% O<sub>2</sub>).

Suivant le but final de l'expérience, la procédure de récupération des organes fut différente. En effet, pour les études de biologie moléculaire, il a été nécessaire de récupérer l'ARN cardiaque ainsi que le sang. Pour cela, une thoracotomie a été réalisée et le sang a été collecté par ponction cardiaque à raison de 1ml. Les ventricules cardiaques ont ensuite été excisés et immédiatement rincés dans un tampon de lyse (Lysis Binding Buffer, miRVana isolation kit, Life technologies, Belgique). Enfin, les ventricules ont été broyés dans 2 ml de tampon de lyse avec un polytron, jusqu'à dissociation complète des tissus. Le lysat a été ensuite centrifugé 5 minutes, à 10 000g et à 4°C. Le surnageant a été congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C avant l'extraction d'ARN.

Le sang a quant à lui été centrifugé 10 minutes, à 10 000g et à 10°C après une période de 30 minutes à température ambiante permettant la coagulation du sang dans le tube. Cette méthode a permis de récupérer le sérum des souris, aliquoté avec des inhibiteurs de protéases (mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche Applied Science, Belgique) et conservé par la suite à -20°C.

Par ailleurs, pour les études histologiques, une thoracotomie a été réalisée et les cœurs entiers ont été prélevés puis rincés dans du tampon de phosphate salin (PBS) froid afin de les vider entièrement du sang résiduel. Ils ont ensuite été fixés dans une solution de formaldéhyde (FA) 4% pendant 24 heures.

## 3. Analyses histologiques

### 3.1. Coupes histologiques

Après fixation des cœurs dans la solution de FA, ils ont été immergés dans différents bains d'une Citadel (Shandon Citadel, Thermo Scientific, USA) suivant un programme automatique de 27 heures (**Tableau 3**) afin de les inclure en paraffine. Des coupes de 5 $\mu$ m ont été ensuite réalisées selon le grand axe horizontal grâce à un microtome et ont été déposées sur des lames POLYSINE™ (VWR international, Belgique).

| Pas   | Bain        | Temps (heures) |
|-------|-------------|----------------|
| 1     | Formaline   | 2              |
| 2     | Formaline   | 2              |
| 3     | Alcool 70%  | 2              |
| 4     | Alcool 90%  | 1              |
| 5     | Alcool 100% | 2              |
| 6     | Alcool 100% | 2              |
| 7     | Alcool 100% | 2              |
| 8     | Xylène      | 2              |
| 9     | Xylène      | 2              |
| 10    | Xylène      | 2              |
| 11    | Paraffine   | 3              |
| 12    | Paraffine   | 5              |
| Total |             | 27             |

**Tableau 3:** Programme d'inclusion en paraffine de la Citadel  
Après la fixation dans la FA 4%, les cœurs ont été inclus en paraffine suivant un programme de 27 heures.



## 3.2. Détection de la fibrose au trichrome de Masson

Le trichrome de Masson est une technique permettant d'évaluer la fibrose sur une coupe histologique. Elle associe une coloration nucléaire à l'hématoxyline, une coloration cytoplasmique au rouge Ponceau, une coloration du collagène grâce à l'acide phosphomolybdique qui dépouille les fibres de collagène et enfin une coloration par le bleu d'aniline. L'ensemble des bains a été réalisé à température ambiante.

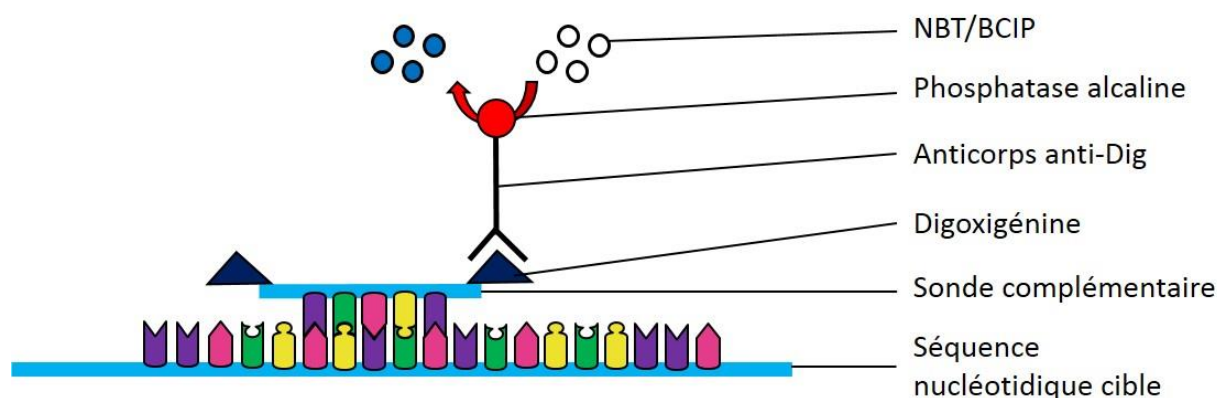
Des étapes de déparaffinisation et déshydratation ont été réalisées grâce à des bains de xylène et d'éthanol. Les coupes ont été immergées 5 minutes dans l'hématoxyline qui colore les noyaux en bleu, puis rincées 5 minutes à l'eau courante pour accentuer la coloration. Après rinçage, le cytoplasme des cellules a été coloré en rouge par une solution de rouge Ponceau pendant 10 minutes. Ensuite, un traitement de 10 minutes à l'acide phosphomolybdique a dépouillé les fibres de collagène qui ont ensuite été colorées par le bleu d'aniline pendant 5 minutes.

Une série de bains d'éthanol (70°,90°,100°) a permis, pour finir, de déshydrater les tissus. Enfin les coupes ont été montées entre lames et lamelles avec le milieu de montage Eukitt (Sigma-Aldrich, Belgique). Les lames ont été observées au microscope optique Leica, grossissement X400 et 3 photos choisies au hasard ont été faites dans chacune des 3 zones : la zone infarctée, la zone bordante et la zone saine.

Le degré de fibrose a été obtenu en rapportant l'aire de la partie fibrotique (présence de collagène) par rapport à l'aire totale de tissu grâce au logiciel ImageJ v1.42.

### 3.3. Détection de séquences nucléiques par hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* est une technique permettant la localisation d'une séquence nucléotidique connue mono-brin sur une coupe histologique de tissu et reposant sur la complémentarité des bases azotées. Ici, la technique utilisée comprend un anticorps couplée à une enzyme, la phosphatase alcaline qui lorsqu'elle catalyse le nitro-blue-tetrazolium/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP) entraîne l'apparition d'un précipité coloré (**Figure 19**).



**Figure 19:** Schéma représentant le principe de l'hybridation *in situ*.

L'hybridation *in situ* a été réalisée sur des coupes de cœurs de souris. Après déparaffinisation et lavage au PBS, les coupes ont été incubées avec la protéinase K (1µg/ml, Sigma Aldrich, Belgique), afin de perméabiliser le tissu, puis ont été déshydratées.

Elles ont été ensuite hybridées dans une chambre pendant 1 heure, avec la solution d'hybridation (Sigma-Aldrich, Belgique) contenant la sonde d'intérêt (LNA™ sonde, 40nM, Exiqon, Danemark). La température d'hybridation était spécifique à la sonde c'est-à-dire de 30°C inférieur à la température de fusion de la sonde.

Une sonde contrôle, c'est-à-dire n'ayant aucune séquence nucléotidique complémentaire avec le génome de l'espèce testée, est utilisée comme contrôle négatif. Les sondes étaient couplées en 3' et en 5' à la digoxigénine.

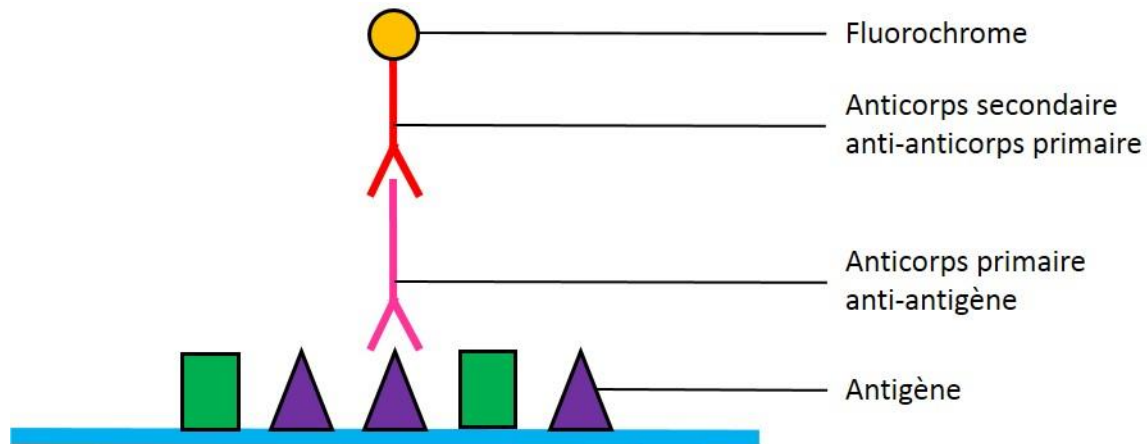
Après hybridation, les coupes ont été lavées grâce à des solutions de SSC (20X, Life Technologies, Belgique) à différentes dilutions préchauffées à la température d'hybridation. Les sites aspécifiques ont été bloqués pendant 30 minutes, grâce à une solution de blocage diluée dans l'acide maléique (DIG wash and block buffer set, Roche-Prophac, Luxembourg). Les coupes ont été incubées pendant 30 minutes avec l'anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline (Roche-Prophac, Luxembourg) à une dilution de 1/5000 dans la solution de blocage.

Après rinçage, le substrat de la phosphatase alcaline, le NBT/BCIP (NBT-BCIP ready for use tablets, Roche-Prophac, Luxembourg) a été ajouté sur les coupes pendant 2 heures et à l'abri de la lumière. Dans la solution de NBT/BCIP, a été ajouté 0.2mM de lévamisole (Fluka, Belgique) permettant de bloquer les phosphatases alcalines endogènes.

La réaction enzymatique a ensuite été arrêtée grâce à une solution de KTBT (50mM Tris-HCl ; 150 mM NaCl ; 10mM KCl). Les noyaux ont été colorés avec une solution de Nuclear Fast Red (Sigma-Aldrich, Belgique) pendant une minute puis rincés pendant 10 minutes à l'eau courante. Une nouvelle fois, les coupes ont été déshydratées et ont été montées entre lames et lamelles avec de l'Eukitt (Sigma-Aldrich, Belgique). Les coupes ont été analysées au microscope optique au grossissement X400.

### 3.4. Co-marquage de protéines et d'acides nucléiques par hybridation *in situ* couplée à l'immunofluorescence

L'immunofluorescence est une technique d'immunomarquage, c'est-à-dire permettant le marquage de protéines, grâce à des anticorps couplés à des fluorochromes, sur des coupes histologiques (**Figure 20**).



**Figure 20:** Schéma représentant le principe de l'immunofluorescence

Le co-marquage d'acides nucléiques et de protéines est très utile notamment lorsqu'il s'agit de définir le type cellulaire exprimant une séquence nucléique. En effet, la co-détection d'une protéine spécifique d'un type cellulaire avec la séquence nucléique d'intérêt permet de définir sa localisation.

Le co-marquage a été réalisé sur des coupes de cœurs de souris incluses en paraffine. Les coupes ont été tout d'abord déparaffinées et déshydratées dans des bains de xylène et d'éthanol. Après rinçage, une fixation de 10 minutes a été faite dans le FA 4%. Les coupes ont été ensuite perméabilisées avec la protéinase K à 10 µg/ml pendant 15 minutes à 37°C. Après rinçage dans des solutions de Tris-HCl/Glycine (100 mM Tris-HCl, 100 mM glycine) et de TBS (50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl), les coupes ont été pré-hybridées (4X SSC, 50% formamide déionisé) pendant 15 minutes à 37°.

Les sondes spécifiques de la séquence d'intérêt ou négatives ont été diluées dans une solution d'hybridation (Sigma-Aldrich, Belgique) et déposées dans sur les coupes. Après une nuit d'hybridation à température spécifique, les coupes ont été rincées plusieurs fois dans des solutions diluées de SSC à température d'hybridation. De plus, une incubation avec de la RNase A (10µg/ml, Life Technologies, Belgique) a été réalisée afin de cliver les séquences d'ARN simples brins.

Après lavage, les sites aspécifiques ont été bloqués pendant 1 heure, grâce à une solution de blocage diluée dans l'acide maléique (DIG wash and block buffer set, Roche-Prophac, Luxembourg). Ensuite, les coupes ont été mises en présence de l'anticorps anti-digoxigénine couplé à la fluorescéine (488nm, Roche-Prophac, Luxembourg) pendant 2 heures à température ambiante puis rincées. A partir de cette étape, l'hybridation *in situ* était terminée, il s'agissait alors de faire le marquage des protéines. Pour cela, les coupes ont à nouveau été bloquées pendant une heure avec une solution de blocage (PBS - 3% BSA - 5% sérum spécifique de l'anticorps utilisé).

Une incubation avec les anticorps primaires a été faite toute la nuit à 4°C (**Tableau 4**). Trois protéines différentes ont été choisies pour différencier les cellules cardiaques, à savoir : la vimentine pour les fibroblastes, l'actine sarcomérique  $\alpha$  pour les cardiomyocytes et le CD45 pour les cellules inflammatoires. Pour le contrôle négatif, les coupes ont été incubées uniquement avec de la solution de blocage.

Après cela, les coupes ont été rincées et incubées 1 heure avec un anticorps secondaire spécifique couplé à un fluorochrome. Dans cette manipulation, il est nécessaire d'avoir un fluorochrome couplé à l'anticorps émettant à une longueur d'onde différente de celle de la fluorescéine couplé à l'anticorps anti-digoxigénine (**Tableau 4**).

Enfin le montage des lames a été fait entre lames et lamelles avec un milieu de montage Vectashield (Labconsult, Belgique) comprenant le 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) qui colore les noyaux à une longueur d'onde de 405 nm.

| Anticorps primaire  | Dilution | Compagnies           | Anticorps secondaire   | Dilution | Compagnies                  |
|---|----------|----------------------|--|----------|-----------------------------|
| Anticorps monoclonal anti-actinine sarcomérique $\alpha$ de lapin | 1/250    | Abcam, Angleterre    | Anticorps de chèvre anti-anticorps de lapin Alexafluor <sup>®</sup> 635 nm | 1/1000   | Life technologies, Belgique |
| Anticorps monoclonal anti-vimentine de lapin                      | 1/250    | Abcam, Angleterre    | Anticorps de chèvre anti-anticorps de lapin Alexafluor <sup>®</sup> 635 nm | 1/1000   | Life technologies, Belgique |
| Anticorps monoclonal anti-CD45 de rat                             | 1/250    | Santacruz, Allemagne | Anticorps de chèvre anti-anticorps de rat Alexafluor <sup>®</sup> 633 nm   | 1/1000   | Life technologies, Belgique |

**Tableau 4:** Mode d'utilisation des différents anticorps dans le cadre de l'immunofluorescence couplée à l'hybridation *in situ*

## 4. Analyses biochimiques et moléculaires

### 4.1 Extraction d'ARN total

Le kit mirVana™ Isolation Kit (Ambion, Life technologies, Belgique) a été utilisé pour extraire les ARNs totaux à partir des tissus prélevés chez la souris ou de cellules issues de culture.

Le kit mirVana™ PARIS Isolation Kit (Ambion, Life technologies, Belgique) a été utilisé pour extraire les ARNs totaux à partir d'échantillons plasmatiques.

Cette technique est constituée d'une étape d'extraction organique suivi d'une étape d'immobilisation de l'ARN sur colonne afin de purifier ceux-ci avant l'élution.

Pour commencer, les échantillons ont été décongelés de façon lente, sur glace afin d'éviter toute dégradation d'ARN, puis, pour obtenir un lysat homogène, les échantillons ont été vigoureusement vortexés.

600µl de lysat cellulaire ou tissulaire ont été incubés 10 minutes sur glace avec 60µl de *miRNA homogenate additive* qui permet la stabilisation des ARNs alors que 400µl de plasma ont été incubés avec 400 µl de *denaturing solution 2X*. Dans les plasmas, un mélange de 3 miARNs synthétiques a été ajouté (cel-miR-39, cel-miR-54 et cel-miR-238 (Qiagen, Allemagne)) afin d'avoir des contrôles d'efficacité d'extraction et de normaliser les expressions des miARNs.

L'acide-phénol chloroforme, permettant la séparation organique, a été ensuite ajouté. Après centrifugation (5 minutes à 10 000g), la phase supérieure aqueuse contenant les ARNs a été récupérée. La précipitation des ARNs a été obtenue ensuite grâce à l'ajout d'éthanol 100%. Différents lavages ont ensuite permis de ne garder que l'ARN sur les colonnes et ainsi éliminer les fluides résiduels. De plus, la colonne a subi un traitement avec une DNase I (Qiagen, Pays-Bas) afin de supprimer toute contamination potentielle en ADN génomique. Enfin, les ARNs totaux ont été élués dans 50µl d'eau et dénaturés à 65°C.

## 4.2. Analyse quantitative et qualitative de l'ARN

La quantité d'ARN totaux a été mesurée grâce à un Nanodrop qui permet de mesurer l'absorbance d'échantillons de très faible volume (1 à 2 $\mu$ l). Les mesures des différentes valeurs d'absorbance à 230, 260 et 280nm sont utilisées pour calculer la concentration en ARNs et pour estimer la pureté des échantillons.

De plus, la qualité des ARNs a été vérifiée à l'aide du BioAnalyser (Agilent Technologies, USA) afin de s'assurer qu'ils n'étaient pas dégradés pour la suite des manipulations. Cet instrument permet de réaliser des électrophorèses capillaires. Les résultats se présentent alors sous forme d'électrophorégramme et l'intégrité de l'ARN est évaluée grâce au logiciel qui attribue un indice de qualité à chaque échantillon. Cet indice doit être supérieur à 7 pour traduire une bonne qualité et une faible dégradation. Il est basé sur la qualité des ARNs ribosomiques 18S et 28S présents en très forte concentration dans les cellules eucaryotes.



### 4.3. Puces à ARN

Les puces à ARN ont été utilisées afin d'étudier le niveau d'expression de différents types de transcrits dans les cœurs de 2 groupes de 4 souris, le premier étant des souris *sham* et le second des souris ayant subi une ligature coronaire.

Après extraction de l'ARN total et vérification de la quantité ainsi que de l'intégrité de l'ARN, le kit « Low Input Quick Amp Labeling » (Agilent, Belgique) a été utilisé afin d'amplifier et de marquer l'ARN. Pour cela, une RT a été réalisée avec la transcriptase inverse AffinityScript afin d'obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir de 200ng d'ARN. Ensuite, l'ADNc a été amplifié grâce à l'enzyme T7 RNA polymérase qui simultanément incorpore la cyanine3-CTP, présente dans le mélange, produisant ainsi des ARNc marqués. Après l'amplification et le marquage, les ARNc ont été purifiés sur colonne (RNeasy Minikit, Qiagen, Pays-Bas).

L'étape suivante consistait en l'hybridation des ARNs purifiés sur les puces à ARN grâce au kit « Gene expression Hybridization » (Agilent, Belgique). Brièvement, l'ARN a été fragmenté grâce à un tampon de fragmentation afin de réduire la taille des ARNs permettant ainsi une meilleure hybridation avec les sondes de la puce. Ensuite, 40 µl d'échantillon ont été déposés sur chacune des puces et hybridés pendant 17 heures dans un four à rotation à 65°C.

Après lavage avec le kit « Gene expression Wash Buffer » (Agilent, Belgique), les puces ont été scannées avec un scanner Agilent G2565CA et les données brutes ont été acquises à l'aide du logiciel « Feature extraction software » (Agilent). Les données ont été analysées à l'aide du logiciel SAM 3.09 (significance analyses of microarrays).

Les gènes avec une différence d'expression de plus de 2 fois entre les souris *sham* et les souris avec IDM et ayant une q-value inférieure à 5%, ont été considérés comme différentiellement exprimés entre les deux groupes. Les cartes d'expression ont été créées grâce au logiciel TreeView et Cluster 3.0. Les analyses fonctionnelles concernant les voies de signalisation des gènes différentiellement exprimés ont été réalisées avec le logiciel DAVID (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery).

Les puces utilisées dans cette étude étaient des puces SurePrint G3 (8x60K, Agilent, Belgique) spécifiques du génome de souris et comprenant 55 681 sondes reconnaissant à la fois des ARNm et des ARNs non codants. La normalisation a été réalisée grâce à des séquences précises appelées « RNA Spike-In » (Agilent, Belgique) ajoutées aux échantillons avant le début de la manipulation.

Grâce à des techniques de bio-informatique, 2 groupes de sondes ont été discriminés, d'une part les transcrits ayant un préfixe NM c'est-à-dire codant pour une protéine (26 535 sondes) et d'autre part les transcrits sans préfixe NM (29 146 sondes). De ce dernier groupe, 2 831 sondes, soit 5%, représentaient des lncARNs.

## 4.4. Transcription inverse et PCR quantitative en temps réel

Une étape de RT est nécessaire afin d'obtenir de l'ADNc pour les analyses par PCR quantitative en temps réel.

Pour les études portant sur les lncARNs et les ARNm, la transcriptase inverse Superscript II (Life technologies, Belgique) a été utilisée avec 1µg d'ARN total ainsi qu'avec des hexamères aléatoires, un tampon, du dithiothreitol et des nucléotides pour un volume final de 20µL. La réaction a été catalysée lors d'une première étape de 50 minutes à 42°C puis une seconde étape de 15 minutes à 70°C a permis l'inactivation de la transcriptase inverse. Des contrôles sans ARN et sans enzyme ont été faits pour chaque manipulation.

Pour les études portant sur les miARNs, la transcriptase inverse miScript (Life technologies, Belgique) a été utilisée. Elle est comprise dans un mélange contenant également une polymérase polyA. Ce mélange est dilué dans un tampon adéquat contenant des amorces aléatoires, des amorces oligo-dT, des nucléotides et du magnésium (miScript HiFlex Buffer) pour un volume final de 20µl. Ce kit permet, avant de rétrotranscrire la séquence, d'ajouter une queue polyA aux miARNs pour la fixation des amorces oligo-dT. La réaction est catalysée lors d'une étape de 60min à 37°C puis d'une étape de 5min à 95°C.

La PCR est une technique d'amplification exponentielle d'ADN couramment utilisée et permettant d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie. L'avantage d'une PCR quantitative en temps réel est qu'elle permet à chaque cycle d'amplification de connaître la quantité d'ADN. En effet, le principe repose sur le fait qu'un agent intercalant de l'ADN et fluorescent, le SYBR® Green, va émettre une quantité de fluorescence à chaque amplicon produit. Ainsi la fluorescence mesurée est directement proportionnelle à la quantité d'ADN présent dans l'échantillon.

Les ADNc ont été dilués au 1/10<sup>ème</sup> pour leur utilisation en PCR et déposés à raison de 4µl par puits dans des plaques 96 puits (Hard\_Shell® PCR Plates WHT/WHT, Bio-rad, Belgique). Afin de catalyser la réaction, 16 µl de IQ™ SYBR® Green Supermix (Biorad, Belgique) a été ajouté à chacun des puits. Il comprend la Taq polymérase, les désoxynucléotides, du MgCl<sub>2</sub> et le SYBR® Green.

De plus, des amorces, spécifiques des ARNm ou des lncARNs étudiés, ont été utilisées. Elles ont été conçues grâce au logiciel Beacon Designer (Premier Biosoft, USA) puis mises au point afin de déterminer leur température optimale d'hybridation/élongation et leur efficacité de PCR (**Tableau 5**). Pour les miARNs, l'une des amorces est une amorce spécifique du miARN étudié et l'autre est une amorce universelle reconnaissant la queue polyT.

Les PCR ont été réalisées dans un appareil CFX96 (Biorad, Belgique) à l'aide du programme de température suivant :

- Dénaturation initiale de 95°C pendant 3 minutes
  - 40 cycles comprenant 30 secondes de dénaturation à 95° puis 1 minute d'hybridation/élongation à la température spécifique des amorces pour les ARNm et les lncARNs
- OU**
- 40 cycles comprenant 15 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 30 secondes à 70°C pour les miARNs.

De plus, une courbe de fusion a été réalisée en soumettant les amplicons à des températures progressant de 55°C à 95°C par palier de 0,5°C. Elle permet de déterminer le point de fusion spécifique du gène étudié et ainsi de vérifier qu'il n'y a qu'un seul produit de PCR amplifié.

Enfin, les données ont été normalisées avec le gène de ménage glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) pour les ARNm et les lncARNs et avec les miARNs synthétiques pour les miARNs. Ceci nous a permis de faire le calcul des valeurs d'expression grâce au logiciel Biorad CFX Manager avec la méthode du « 2 delta Ct » (*Cycle threshold*) :

$$\text{Expression normalisée} = 2^{[(\text{moyenne des CT de normalisateur}) - \text{CT du gène cible}]}$$

| Gènes                | N° d'accension         | Amorces sens            | Amorces antisens         | T °C |
|----------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|------|
| <b>2310075C17Rik</b> | ENSMUST000001<br>61216 | ACAACAACAGATTAGATC      | AGGACATTATAGCACTTA       | 56   |
| <b>2310015B20Rik</b> | NR_038041              | ACTGATCTCTACTACTCG      | TTGCTAGGACGTTATGAC       | 56   |
| <b>1700123M08Rik</b> | NR_040577              | ATGGCTACAGTTGTGGA       | TATCACTCACAACAGCTT       | 56   |
| <b>1810014B01Rik</b> | NR_015572              | GCTGAGTTAAGTATGTC       | CTTTCCTTCATTTCTCTC       | 56   |
| <b>2210409D07Rik</b> | NR_045360              | CTCATCTACTAATCCCAGAA    | GCAAAACATTTTAATCACAACCTG | 56   |
| <b>Speer5-ps1</b>    | NR_027506              | AATCTTCCTGGATGAATCTTCTT | CAGTCGCCTCAGTTCTCT       | 54   |
| <b>VL30</b>          | NR_002860              | ACGTTCTCAAGATAGATAA     | ACACACAATGGAATTTTC       | 56   |
| <b>9430008C03Rik</b> | NR_027887              | ATCATCTAGTGCCTGGAA      | ATGGGTTGACACAGATTT       | 56   |
| <b>5830149P10Rik</b> | NR_028427              | CTTGTTGTCTAAGTGAGTA     | TTAATCGTTCCTCTAGTTG      | 58   |
| <b>Gm10872</b>       | NR_045747              | TCAACACTTTCATAGGT       | ATTGTGAGGTCCAGATAG       | 54   |
| <b>Tgfb1</b>         | NM_011577.1            | AGACATCTCACACAGTAT      | CCAGGAATTGTTGCTATA       | 60   |
| <b>Mmp9</b>          | NM_013599.3            | GCTGACTACGATAAGGAC      | AAAGATGAACGGGAACAC       | 52   |
| <b>Ncf1</b>          | NM_010876.3            | CAGGTGAACCGTATGTAA      | CAGATACATGGATGGGAA       | 56   |
| <b>Tnf alpha</b>     | NM_013693.1            | TCTTCTATTCTGCTTGTG      | ACTTGGTGGTTTGCTACG       | 56   |
| <b>Ccr5</b>          | NM_009917.5            | AACACCTGGATTATGAAT      | CTGCTAAGTAAATTAGAGAA     | 58   |
| <b>Cxcr4</b>         | NM_009911.3            | GCATCATCATCTCTAAGC      | TAGGATGAGGATGACTGT       | 56   |
| <b>p53</b>           | NM_011640.3            | GGAGTCACAGTCGGATAT      | AAACTCCTCAACATCCTG       | 60   |
| <b>BNP</b>           | NM_008726.4            | ATGATTCTGTTTCTGCTTT     | ATTCCTCCGACTTTTCT        | 58   |

**Tableau 5:** Caractéristiques des amorces de souris utilisées pour la PCR quantitative

## 5. Analyses statistiques

Dans l'étude n°1, les statistiques ont été réalisées de la façon suivante :

Les variables catégorielles sont présentées comme des nombres et des pourcentages et les variables continues sont exprimées par la médiane et le rang interquartile. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce aux logiciels SPSS 19.0 (SPSS Inc, USA) et MedCalc 9.6.4.0 (MedCalc software, Belgique).

Les comparaisons entre plusieurs groupes ont été effectuées par la méthode du chi-2, par un test de Mann-Whitney ou par un test de Kruskal-Wallis. Les courbes ROC (*receiver operating characteristic*) et la mesure de l'aire sous la courbe (AUC) ont permis d'évaluer la sensibilité et la spécificité des miARNs, des cTnT et des hs-cTnT pour valider leur potentiel en tant que biomarqueurs pronostiques et diagnostiques.

Des analyses de régression de cox univarié ou multivarié ont permis d'évaluer la capacité des miARNs circulants à être des biomarqueurs prédictifs de la mortalité ou la survenue d'un nouvel IDM. Les courbes Kaplan-Meier ont permis de faire les analyses de survie. Le test du log rank a été utilisé pour le calcul de la significativité. L'IDI (*integrated discrimination improvement*) a été calculé pour déterminer si les miARNs amélioraient le diagnostic de l'IDM.

Dans l'étude n°2, les statistiques ont été réalisées de la façon qui suit:

Les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel d'analyse SigmaPlot v11.0. Pour toutes les analyses, les valeurs de p inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives.

Pour les données catégorielles, les comparaisons ont été effectuées par le test de Fisher. La normalité des données a été évaluée par un test de Shapiro-Wilk.

Des tests-t ont été utilisés pour comparer deux groupes non appariés suivant des distributions gaussiennes et des tests de Mann-Whitney ont été utilisés pour comparer deux groupes suivant des distributions non gaussiennes.

Les analyses de prédiction ont été réalisées avec le logiciel R version 2.14.2 et avec predictABEL. Les prédictions du remodelage ventriculaire ont été évaluées avec des régressions logistiques et les AUC ont permis d'évaluer la valeur des miARNs comme biomarqueurs pronostiques du remodelage. La valeur additive du miR-150 par rapport au Nt-proBNP a été évaluée par des analyses de déviance et le test Wald  $\chi^2$  a été utilisé pour le calcul de la significativité.

Les analyses de reclassification ont été réalisées en utilisant la valeur prédictive du miR-150 pour l'identification du remodelage par rapport à la valeur du Nt-proBNP ou par rapport à l'âge, le sexe et les autres marqueurs sanguins. Pour cela un modèle de régression logistique a été utilisé.

Dans l'étude n°3, les statistiques ont été réalisées de la façon suivante :

Les résultats ont été présentés selon la moyenne  $\pm$  déviation standard. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel d'analyse SigmaPlot v11.0.

Un test de de Shapiro-Wilk a été fait avant chaque analyse afin de déterminer la normalité des données. Des tests-t et des tests de Mann-Whitney ont été utilisés pour comparer deux groupes non appariés suivant des distributions gaussiennes ou non gaussiennes respectivement. Lors d'une comparaison entre deux groupes appariés, le test-t apparié a été utilisé pour des données distribuées de façon gaussienne et le test de Wilcoxon pour les données non-gaussiennes.

Afin de comparer plusieurs groupes entre eux, le test ANOVA a été utilisé pour les données gaussiennes et le test de Kruskal-Wallis pour les données non-gaussiennes. Les corrélations entre deux groupes ont été évaluées grâce au test de Spearman. Les valeurs de p inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives.





# Résultats

**Etude n°1** : Valeur diagnostique et pronostique des miARNs circulants chez les patients avec des douleurs thoraciques aiguës.

L'IDM, l'une des principales causes de mortalité, nécessite une prise en charge immédiate des patients. Il est donc nécessaire de réaliser un diagnostic rapide et précis. Le perfectionnement des techniques, comme la mesure sanguine des hs-TnT, a permis d'améliorer de façon importante le diagnostic<sup>49</sup>. Malgré cela, il existe toujours un manque de sensibilité, notamment dans la phase précoce suivant l'IDM. De plus, les mesures de la TnT peuvent être constatées comme positives chez des patients ayant des douleurs thoraciques mais sans une origine cardiaque<sup>225</sup>.

Le potentiel de biomarqueur des miARNs a été grandement montré depuis qu'ils sont apparus comme des molécules circulantes dans le sang périphérique. En effet cela offre un avantage considérable pour leur mesure. Ainsi, après leur découverte dans les cancers par exemple, ils se sont avérés être de potentiels biomarqueurs des maladies cardiovasculaires et notamment de l'IDM<sup>165, 226</sup>.

Les études pré-existantes sur le potentiel des miARNs à diagnostiquer ou pronostiquer l'IDM dans des cohortes de patients ont été principalement faites sur un nombre faible de patients, n'étaient pas multicentriques et surtout avaient pour contrôle des volontaires sains. Ainsi, l'objectif de cette étude a été d'évaluer la valeur diagnostique et pronostique de différents miARNs dans une cohorte importante de 1 155 patients provenant d'un recrutement multicentrique international. La découverte d'un miARN comme biomarqueur diagnostique pourrait permettre de discriminer les patients présentant une douleur thoracique d'origine cardiaque d'une origine non cardiaque et être plus efficace qu'un diagnostic réalisé avec la hs-TnT.

Les miARNs sélectionnés dans cette étude étaient pour certains des miARNs déjà connus pour être différentiellement exprimés entre des patients avec IDM et des contrôles<sup>163, 164, 166</sup> :

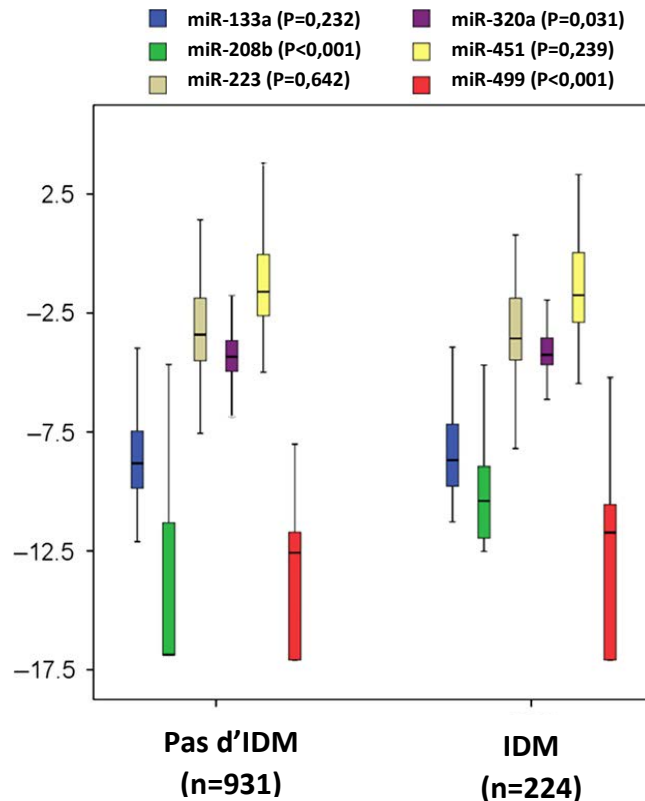
- miR-133a, miR-208b, miR-499 : enrichis dans les cardiomyocytes
- miR-223, miR-320 : enrichis dans les plaquettes
- miR-451 : largement exprimé et enrichi dans les globules rouges.

Ces miARNs ont donc été mesurés dans le plasma de patients provenant de la cohorte APACE (Advantageous Predictors of Acute Coronary syndrome Evaluation) (**Tableau 1, page 101**).

Les mesures des 6 miARNs ont été réalisées dans les plasmas des patients par PCR quantitative.

- Relation entre l'expression des miARNs et le diagnostic final des patients

Le but, dans un premier temps, a été d'étudier les expressions des miARNs chez les patients pour les comparer avec les diagnostics finaux (**Figure 21**).



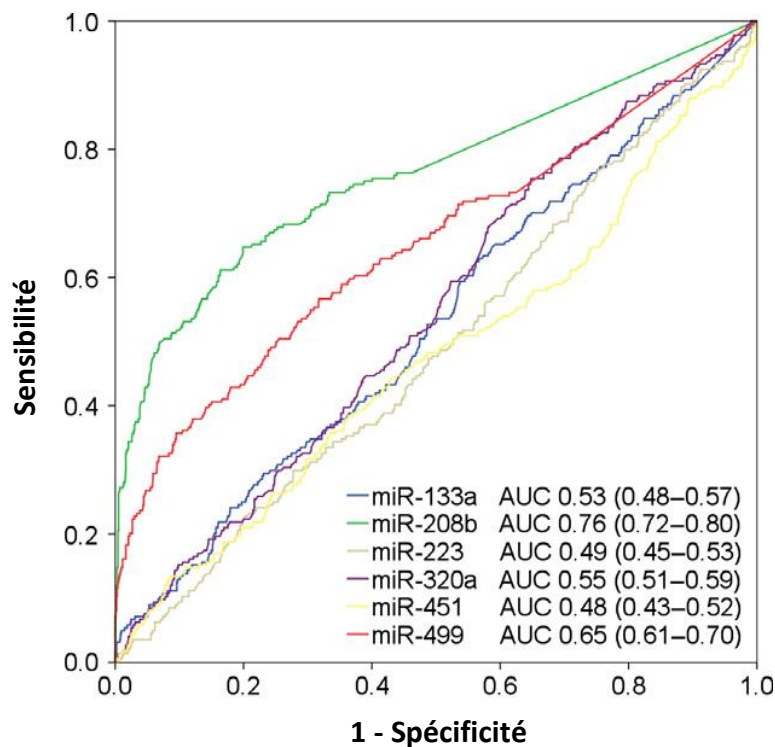
**Figure 21:** Expressions des 6 miARNs sélectionnés et mesurées par RT-PCR à l'arrivée des patients dans la cohorte APACE comportant 931 patients sans IDM et 224 patients avec IDM. Les résultats d'expression sont présentés en échelle logarithmique. La valeur P représente la significativité des différences d'expression des miARNs entre les patients avec ou sans IDM.

Parmi les 6 miARNs mesurés, 3 présentent une augmentation d'expression statistiquement significative dans les plasmas des patients avec IDM : le miR-208b ( $P < 0,001$ ), le miR-320a ( $P = 0,031$ ) et le miR-499 ( $P < 0,001$ ), les plaçant ainsi comme de potentiels biomarqueurs. Les 3 autres miARNs possèdent une expression semblable entre les 2 groupes de patients.

L'expression de ces miARNs a également été comparée à l'intérieur du groupe de patients avec IDM en séparant les patients STEMI ( $n = 45$ ) des NSTEMI ( $n = 179$ ). Chez les patients STEMI, l'expression des miR-133a ( $P = 0,004$ ), miR-208b ( $P = 0,001$ ), miR-451 ( $P = 0,044$ ) et miR-499 ( $P = 0,001$ ) est significativement plus élevée que chez les patients NSTEMI. Ces miARNs pourraient ainsi permettre de discriminer ces 2 types de patients.

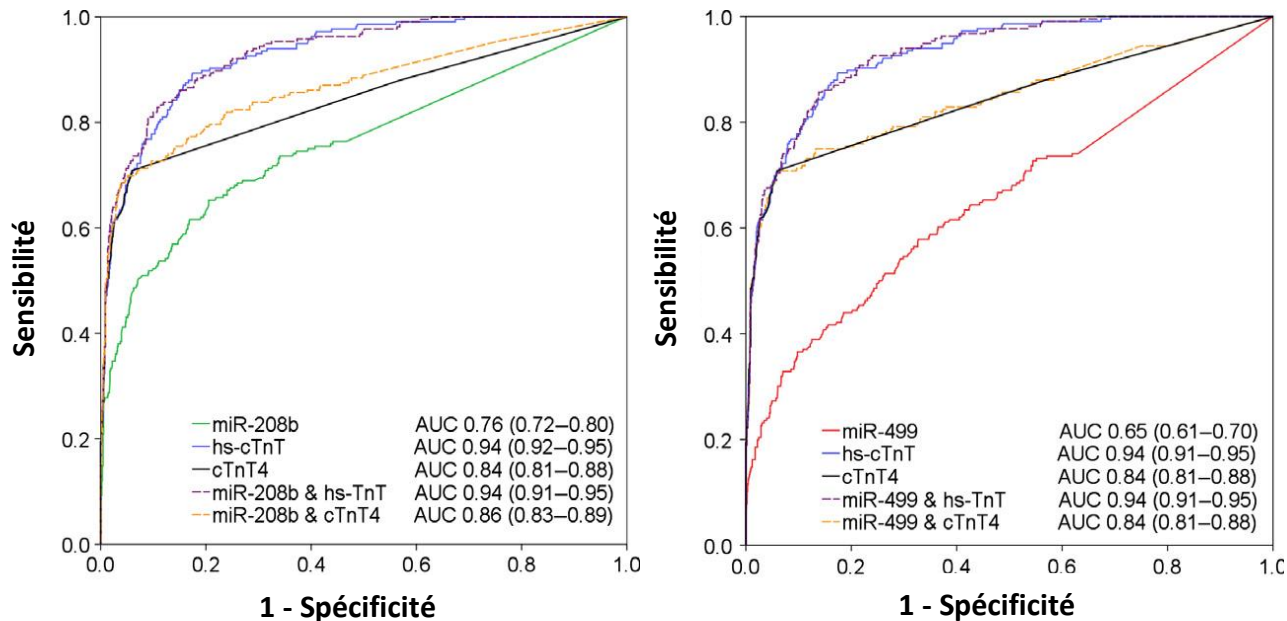
- Utilisation des miARNs comme marqueurs diagnostiques précoces

L'objectif suivant a été de voir si les mesures de ces miARNs pourraient être utiles pour un diagnostic précoce. Pour cela des courbes ROC ont été réalisées à partir des valeurs de miARNs obtenues à l'admission et les AUC ont été mesurées permettant ainsi de montrer les performances diagnostiques de chaque miARN (**Figure 22**).



**Figure 22:** Courbes ROC montrant le pouvoir diagnostique des 6 miARNs sélectionnés pour l'IDM.

Les miR-208b et miR-499 montrent des AUC de 0,76 et 0,65 respectivement. Ainsi, compte-tenu de ces résultats et des résultats précédents, les miR-208b et miR-499 semblent avoir les meilleures prédispositions pour être des marqueurs diagnostiques de l'IDM. C'est pourquoi ils ont été comparés à des marqueurs classiquement mesurés, à savoir la cTnT4 et l'hs-cTnT (**Figure 23**).



**Figure 23:** Courbes ROC montrant le pouvoir diagnostique de l’IDM par les miR-208b et miR-499 et par les marqueurs classiquement mesurés (cTnT4 et hs-TnT) ainsi que leurs combinaisons.

Les AUC des marqueurs classiques sont de 0,94 pour l’hs-cTnT et de 0,84 pour la cTnT4 et sont donc supérieures aux AUC du miR-208b et du miR-499 ( $P < 0,001$ ). La combinaison des miARNs avec ces marqueurs n’apporte pas de valeur diagnostique supplémentaire. D’autres types d’analyses grâce à des méthodes de régressions univariées et multivariées n’ont pas montré d’amélioration diagnostique de l’IDM par l’apport des miARNs.

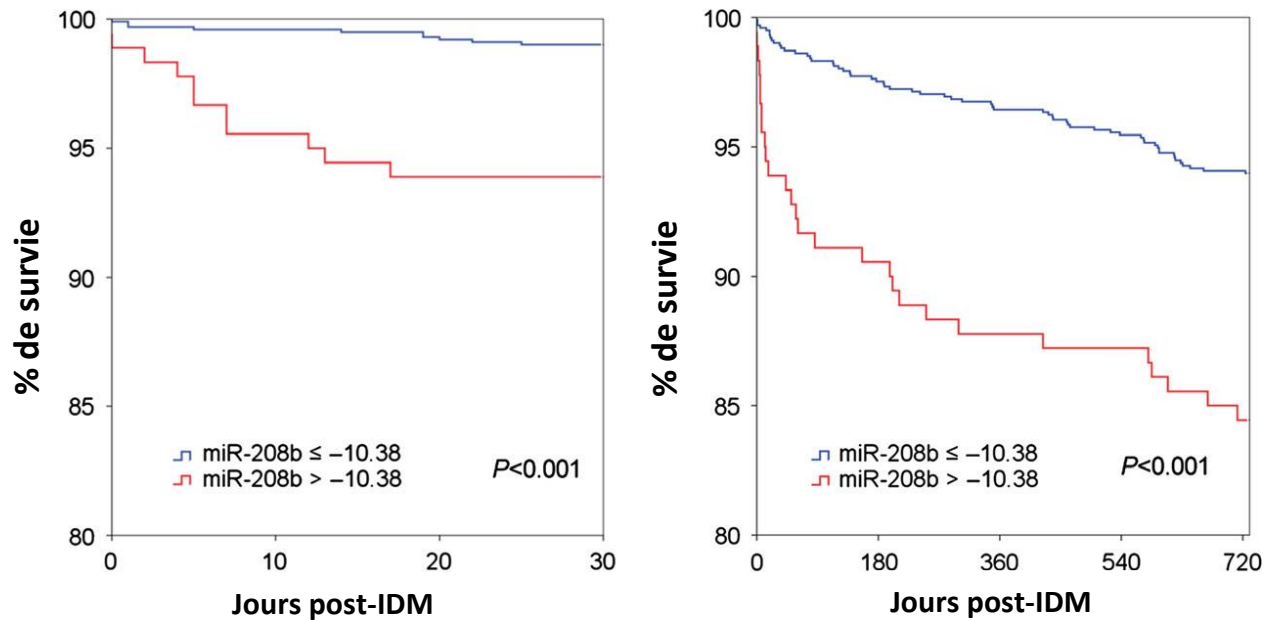
○ Utilisation des miARNs comme marqueurs pronostiques

Le dernier but de cette étude a été de montrer le pouvoir des miARNs pour pronostiquer le devenir des patients en termes de mortalité ou de survenue d’un autre IDM. Les patients ont été suivis sur une moyenne de 27 mois après leur première venue à l’hôpital et parmi tous les patients, 102 sont décédés (soit 9%) après une moyenne de 293 jours.

Les expressions des miARNs ont été comparées entre les patients encore en vie et les patients décédés et seul le miR-208b est plus exprimé de façon statistiquement significative chez les patients décédés ( $P=0,018$ ).

Des courbes ROC ont été réalisées afin de mettre en évidence la prédiction du devenir des patients grâce aux miARNs. Il s'avère que sur le court terme (30 jours), seul le miR-208b serait capable de prédire la mortalité et aucun miARN n'en serait capable sur le long terme (730 jours).

Le miR-208b a donc été sélectionné pour des analyses utilisant des courbes de Kaplan-Meier plus précises (**Figure 24**).



**Figure 24:** Courbes de survie de Kaplan-Meier présentant le taux de survie sur le court terme (30 jours) ou long terme (730 jours) après admission. Les patients ont été divisés en 2 groupes selon leur taux de miR-208b (point de coupure: -10,38).

Il en découle que les patients avec un plus faible taux de miR-208b ( $\leq -10,38$ ) ont un taux de survie supérieur aux patients avec un taux de miR-208b plus élevé ( $> -10,38$ ) et ce à court terme ( $P < 0,001$ ) ou à long terme ( $P < 0,001$ ).

Concernant la prédiction de survenue d'un IDM, aucun des miARNs n'a montré de valeur prédictive intéressante à court ou long terme.

Cette étude a permis de mettre en évidence l'augmentation de 3 miARNs, le miR-208b, le miR-320a et le miR-499 dans le plasma de patients avec IDM par rapport à des patients présentant des douleurs thoraciques sans IDM, ce qui en fait des biomarqueurs potentiels dans le diagnostic de l'IDM.

Les miR-208b et miR-499 ont montré des valeurs diagnostiques de l'IDM intéressantes mais ne sont pas meilleurs que les marqueurs classiquement mesurés (cTnT et hs-cTnT). La combinaison des miARNs avec ces marqueurs n'a pas permis d'améliorer le diagnostic.

Pour la prédiction de la survie des patients, seul le miR-208b a montré une valeur prédictive et aucun miARN n'a apporté de valeur prédictive pour pronostiquer la survenue d'un IDM.

## **Etude n°2 : Le miR-150 : Un nouveau marqueur du remodelage ventriculaire post-IDM**

Le remodelage ventriculaire post-IDM est le processus par lequel le cœur est affecté dans sa morphologie et sa fonction<sup>5</sup>. Ce remodelage, s'il est délétère, conduit à l'apparition de l'IC, une pathologie grave responsable d'un taux de mortalité élevé après l'IDM. C'est pourquoi la prédiction du remodelage ventriculaire grâce à des biomarqueurs ainsi que sa prévention grâce à des cibles thérapeutiques est un axe de recherche important. Plusieurs biomarqueurs ont été associés avec le remodelage cardiaque<sup>52</sup>, comme le BNP ou le Nt-proBNP mais ceux-ci n'apportent pas les résultats espérés notamment parce qu'ils manquent de spécificité pour l'IC ou parce que leurs concentrations plasmatiques varient beaucoup dans les phases post-IDM<sup>227</sup>.

Dans le processus complexe qu'est le remodelage ventriculaire, les cellules et les éléments extracellulaires sont impliqués et malgré le fait que l'on ne connaisse pas encore bien les mécanismes de transition vers un remodelage délétère, on sait que des modulations de l'expression génique jouent un rôle clé<sup>7</sup>.

L'implication des miARNs dans les mécanismes physiologiques et pathologiques liés aux maladies cardiovasculaires n'est plus à démontrer. En effet, ils ont montré des capacités intéressantes comme biomarqueurs diagnostiques de l'IDM<sup>165</sup> ou cibles thérapeutiques de l'IC<sup>180, 228</sup>. En revanche, ils ont été moins bien étudiés en tant que biomarqueurs pronostiques du remodelage ventriculaire, d'où l'objectif de cette étude.



- Identification de miARNs impliqués dans le remodelage ventriculaire

L'étude des miARNs dans le contexte du remodelage ventriculaire a été réalisée dans les plasmas de 90 patients présentant un IDM avec une élévation du segment ST (STEMI) (**Tableau 2, page 103**).

Parmi ces 90 patients, 60 provenant d'une première cohorte, composent le groupe de dérivation. Ces 60 patients ont été sélectionnés parmi une cohorte importante<sup>217</sup> en fonction de leur remodelage ventriculaire post-IDM. Leurs fonctions cardiaques ont été évaluées par échocardiographie 3 à 4 jours (1) après l'IDM ainsi que pendant le suivi après une moyenne de 176 jours (2). Le remodelage ventriculaire a été évalué en soustrayant les VTD des ventricules gauches à ces deux temps par la formule :

$$\Delta\text{VTD} = \text{VTD (2)} - \text{VTD (1)}.$$

Lorsque le résultat de l'opération était positif ( $\Delta\text{VTD} > 0$ ), il a été considéré que les patients présentaient un remodelage ventriculaire puisque le VTD a augmenté durant le suivi. Lorsque le résultat était nul ou inférieur à 0, il a été considéré que le patient ne présentait pas de remodelage. Ainsi, ce groupe de 60 patients était composé de 30 patients ne présentant pas de remodelage et 30 patients avec un remodelage. En moyenne, chez les 30 patients présentant un remodelage ventriculaire, le  $\Delta\text{VTD}$  était de 17,5 ml.

C'est donc sur ce groupe de dérivation que des puces à ARN dédiées à l'étude des miARNs ont été effectuées. Ceci permet d'évaluer la différence entre le profil d'expression des miARNs chez des patients avec ou sans remodelage ventriculaire.

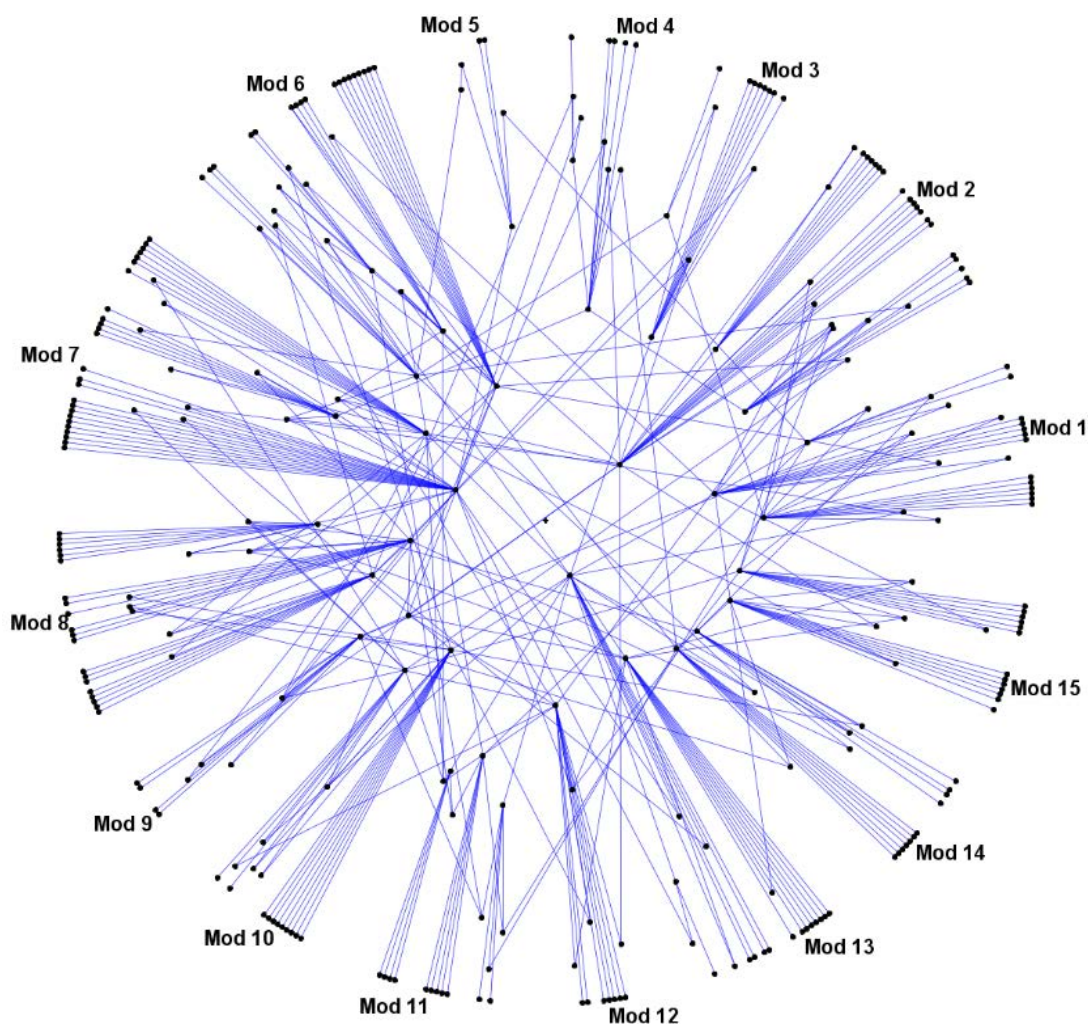
Pour cela, un même volume de prise d'échantillon de chaque patient a été prélevé afin de réaliser un pool de plasmas pour chaque groupe. Ainsi 2 groupes de plasmas ont été créés, l'un provenant de patients avec remodelage et l'autre sans remodelage. Chaque pool a été déposé sur 4 puces différentes. Parmi les 695 miARNs présents sur la puce, 160 ont été détectés dans au moins l'un des deux groupes, 74 étaient différentiellement exprimés et 29 ont été détectés uniquement dans le groupe de patients ayant un remodelage ventriculaire.

Dans un second temps et afin de mieux caractériser les miARNs qui pourraient être impliqués dans le remodelage ventriculaire, des analyses bio-informatiques ont été réalisées. Elles consistent en la sélection de gènes impliqués dans le remodelage grâce à l'association de mots clés dans la base de données NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Ces mots clés étaient « IDM » et « remodelage ventriculaire » et les recherches étaient limitées au génome humain. 13 gènes sont ressortis de ces analyses. L'étape suivante a consisté en la recherche d'interactions des protéines codées par ces 13 gènes avec d'autres protéines. Parmi les 13, 11 protéines ont des interactions avec 26 autres protéines. Ensuite, les miARNs prédits pour interagir avec les 13 et les 26 gènes codant pour ces protéines ont été extraits apportant une liste de 265 miARNs.

Ces résultats ont permis de créer un réseau d'interactions protéines/protéines et protéines/miARNs où chaque nœud représente une protéine ou un miARN et où chaque trait représente une interaction (**Figure 25**). L'analyse des miARNs les plus impliqués dans ce réseau a permis d'isoler 10 miARNs candidats qui représentent des molécules potentiellement impliquées dans la régulation des gènes du remodelage ventriculaire chez l'homme :

miR-27a ; miR-133a ; miR-625 ; miR-296-3p ; miR-31 ;  
miR-23a ; miR-204 ; miR-19a ; miR-101 ; miR-150



**Figure 25:** Réseau représentant les interactions entre les protéines connues pour être impliquées dans le remodelage ventriculaire et les 265 miARNs pouvant interagir avec ces protéines. Chaque nœud (point noir) représente une protéine ou un miARN et chaque trait, une interaction protéine/protéine ou protéine/miARN. Ce réseau a été créé avec le logiciel Polar Mapper

○ Sélection du miR-150

Parmi ces 10 candidats, les miR-27a, miR-23a, miR-19a, miR-101, et miR-150 étaient les 5 miARNs les plus exprimés dans les puces. De façon très intéressante, le miR-101 et le miR-150 sont les seuls miARNs qui sont exprimés chez les patients ne présentant pas de remodelage et ne sont absolument pas exprimés chez les patients avec un remodelage.

Enfin, parmi ces 2 candidats, le miR-150 était le plus différenciellement exprimé entre les 2 groupes de patients ce qui a motivé le choix de ce candidat pour les analyses suivantes. Ces résultats ont été confirmés par PCR quantitative dans le groupe de dérivation montrant une augmentation significative de 11,5 fois chez les patients ne remodelant pas par rapport aux patients avec un remodelage cardiaque.

Une seconde cohorte a été utilisée dans cette étude comprenant les 30 autres patients et formant le groupe de validation (**Tableau 2, page 103**). L'expression du miR-150 a été mesurée par PCR quantitative chez ces patients et les mesures valident les résultats précédents, c'est-à-dire une plus faible expression chez les patients avec un remodelage ventriculaire avec une différence de 2 fois entre les 2 groupes ( $P=0,03$ ). Ceci valide le fait que le miR-150 est bien associé au remodelage ventriculaire.

Les analyses informatiques précédemment réalisées avec les gènes impliqués dans le remodelage ont montré des interactions entre le miR-150 et les gènes codants pour la protéine C réactive (CRP) et pour le récepteur adrénergique beta 1 ( $ADR\beta 1$ ).

Des manipulations cellulaires utilisant des plasmides contenant à la fois un gène rapporteur et le promoteur du gène de la CRP ou de l' $ADR\beta 1$  ont permis de confirmer leur régulation par le miR-150. Ceci montre l'implication du miR-150 dans les processus conduisant au remodelage ventriculaire ce qui suggère que le miR-150 pourrait être une cible thérapeutique pour prévenir ce remodelage.

Afin de déterminer le pouvoir pronostique du miR-150 dans le contexte du remodelage, des courbes ROC ont été réalisées et les AUC en découlant ont été comparées et combinées avec celle du Nt-proBNP. L'AUC du Nt-proBNP est de 0,60 alors que celle du miR-150 est de 0,74 ce qui montre que le miR-150 a une meilleure valeur pronostique. Enfin, la combinaison des 2 donne une AUC de 0,77, potentialisant ainsi les valeurs des 2 marqueurs seuls.

Des analyses de reclassification des patients ont également été réalisées pour évaluer la capacité du miR-150 à reclasser des patients mal classés par le Nt-proBNP, seul ou avec plusieurs paramètres cliniques (âge, sexe, troponine, créatine kinase et Nt-proBNP). Le miR-150 a permis de reclasser 54% des patients mal classés par le Nt-proBNP seul et 59% des patients mal classés par le modèle incluant le Nt-proBNP et les variables clinique.

○ Etude du miR-150 dans le cœur de souris

Enfin, nous avons étudié l'origine du miR-150. Pour cela des études chez des souris ont été réalisées. Un groupe de souris a subi une ligature coronaire afin d'induire un IDM et un autre groupe de souris a subi une opération *sham*. Les souris ont été mises à mort 15 jours après l'IDM afin qu'elles développent un remodelage ventriculaire. Les paramètres cardiaques de ces souris ont été évalués par TEP dédiée au petit animal et ont permis de caractériser l'étendue de la zone infarctée ainsi que d'évaluer le remodelage. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 6**.

|                     | <b>IDM</b>  | <b><i>sham</i></b> | <b>P (IDM vs <i>sham</i>)</b> |
|---------------------|-------------|--------------------|-------------------------------|
| <b>2 jours</b>      | (n=5)       | (n=5)              |                               |
| Taille de l'IDM (%) | 19 ± 8      | 0 ± 0              | 0,002                         |
| VTS (µl)            | 70 ± 18     | 21 ± 16            | 0,001                         |
| VTD (µl)            | 143 ± 16    | 75 ± 40            | 0,005                         |
| FE (%)              | 52 ± 8      | 75 ± 9             | 0,001                         |
| <b>15 jours</b>     | (n=5)       | (n=5)              |                               |
| Taille de l'IDM (%) | 22 ± 15     | 0 ± 0              | 0,002                         |
| VTS (µl)            | 143 ± 25 ** | 35 ± 13            | 0,004                         |
| VTD (µl)            | 211 ± 30 *  | 115 ± 23           | 0,001                         |
| FE (%)              | 33 ± 5 **   | 70 ± 9             | 0,001                         |

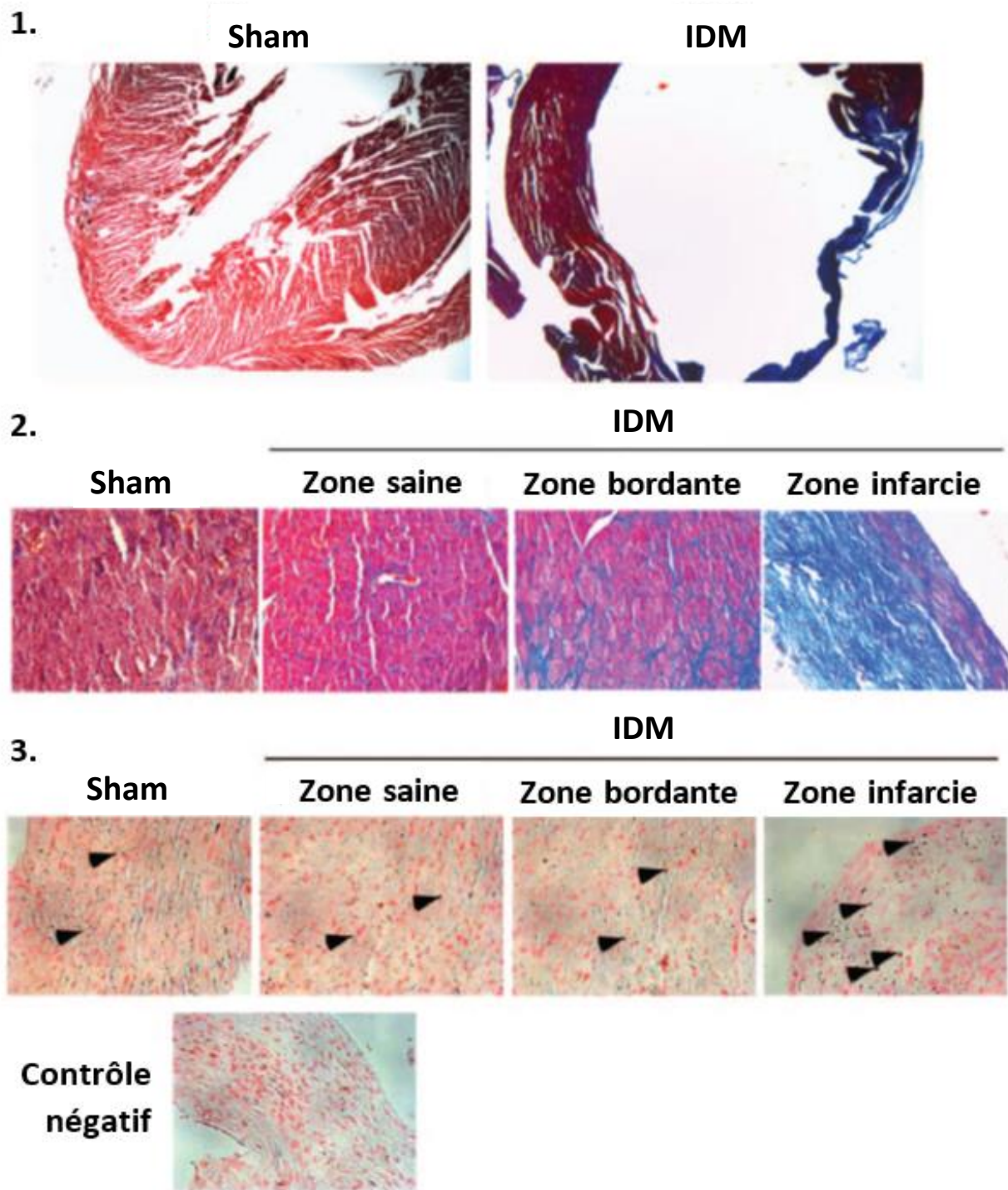
**Tableau 6:** Paramètres cardiaques des souris avec IDM et des souris *sham*, 2 jours et 15 jours post-opération. Les IDM ont été obtenus grâce à la technique de ligature coronaire et les paramètres ont été obtenus par examen TEP. \*P<0,05 vs 48h ; \*\*P<0,01 vs 48h

Dès 48 heures, une augmentation très nette des volumes ventriculaires a été observée chez les souris ligaturées par rapport aux souris *sham*. Ces volumes ont continué d'augmenter de façon significative chez les souris ligaturées entre 48 heures et 15 jours et ces changements de volumes ventriculaires ont entraîné une chute de la FE. Les cœurs des souris ont été extraits 15 jours après l'induction de l'IDM ou de l'opération *sham* afin de réaliser des coupes en paraffine pour des analyses histologiques de fibrose et localisation du miR-150.

L'étude la fibrose dans les cœurs de souris a été réalisée grâce à la technique du trichrome de Masson qui colore les fibres de collagène en bleu. La **Figure 26.1.** présente les images obtenues après coloration d'un cœur de souris *sham* et d'un cœur avec IDM. Les changements morphologiques sont très visibles puisque l'on observe un amincissement important de la paroi, une hypertrophie ventriculaire et un ventricule gauche fibrosé, caractéristique du remodelage cardiaque. A un plus fort grossissement (X400, **Figure 26.2.**), il est également clair que la fibrose, après 15 jours, a complètement envahi la zone infarctée. Ceci nous permet de délimiter les différentes zones du cœur atteintes par l'IDM.

L'expression du miR-150 a été observée dans le cœur grâce à l'hybridation *in situ*. Cette technique, utilisant une sonde contre le miR-150 ainsi qu'un anticorps reconnaissant la sonde et couplé à la phosphatase alcaline, permet la formation de précipités sombres à l'endroit où le miR-150 est exprimé (flèches noires; **Figure 26.3.**) . Ces images permettent d'observer l'expression du miR-150 dans le cœur, particulièrement forte dans la zone infarctée. En effet, le nombre de précipités est beaucoup plus élevé dans la zone infarctée par rapport à la zone bordante, à la zone saine, à la souris *sham* ou encore comparé au contrôle négatif.

Cette étude a permis de mettre en évidence le miR-150 comme associé au remodelage ventriculaire post-IDM et de l'envisager comme une cible thérapeutique mais surtout comme un potentiel biomarqueur pronostique. Ces capacités de pronostic sont apparues supérieures à celle du Nt-proBNP, le marqueur classiquement mesuré pour prédire l'apparition de l'IC après l'IDM.



**Figure 26:** Images représentatives de coupes de cœur d'une souris avec IDM ou d'une souris *sham*, 15 jours après l'opération. La fibrose présente dans le ventricule gauche a été observée grâce à une coloration au Trichrome de Masson et apparaît en bleu sur les coupes à un grossissement 25 (1.) ou à un grossissement 400 (2.). L'hybridation *in situ* (3.) montre l'augmentation d'expression du miR-150 dans la zone infarctée grossie 400X (points noirs montrés par les flèches).

### **Etude n°3 : Identification de lncARNs associés à l'IDM**

Les études sur les ARNs ne codants pas pour des protéines n'ont cessé de se multiplier révélant ainsi leur importance dans tous les mécanismes physiologiques et pathologiques. L'arrivée des ARNs non codants dans la sphère scientifique a été particulièrement marquée par des études sur les miARNs et aujourd'hui des milliers de miARNs ont été découverts.

Ces découvertes ont mené à penser que les lncARNs pourraient aussi bien être impliqués dans des processus physiologiques que pathologiques, et les études sur les lncARNs sont en pleine émergence. Ces études apparaissent comme étant plus difficiles que celles des miARNs du fait de leur moindre stabilité mais surtout du fait de la complexité de leurs mécanismes d'action<sup>12</sup>. Cette complexité les rend cependant plus intéressants d'un point de vue thérapeutique puisqu'à la différence des miARNs<sup>101</sup>, ils sont capables de réguler l'expression de leurs gènes cibles de façon positive ou négative et peuvent agir à des niveaux de régulation différents.

Seules quelques études avaient déjà montré une association entre les lncARNs et la pathophysiologie cardiaque comme par exemple l'étude sur le lncARN *Braveheart*<sup>196</sup> ou encore celle sur le lncARN *MIAT*<sup>198</sup>. Ainsi, c'est tout naturellement qu'après l'étude des miARNs, nous nous sommes intéressés à l'étude des lncARNs dans le contexte de l'IDM et du remodelage ventriculaire.

Pour cela, nous avons étudié le transcriptome et caractérisé les profils d'expression des lncARNs grâce à des puces à ARN effectuées sur des cœurs de souris avec IDM. Ces expressions ont ensuite été mises en relation avec les paramètres cardiaques des souris ainsi qu'avec des gènes impliqués dans le remodelage ventriculaire.

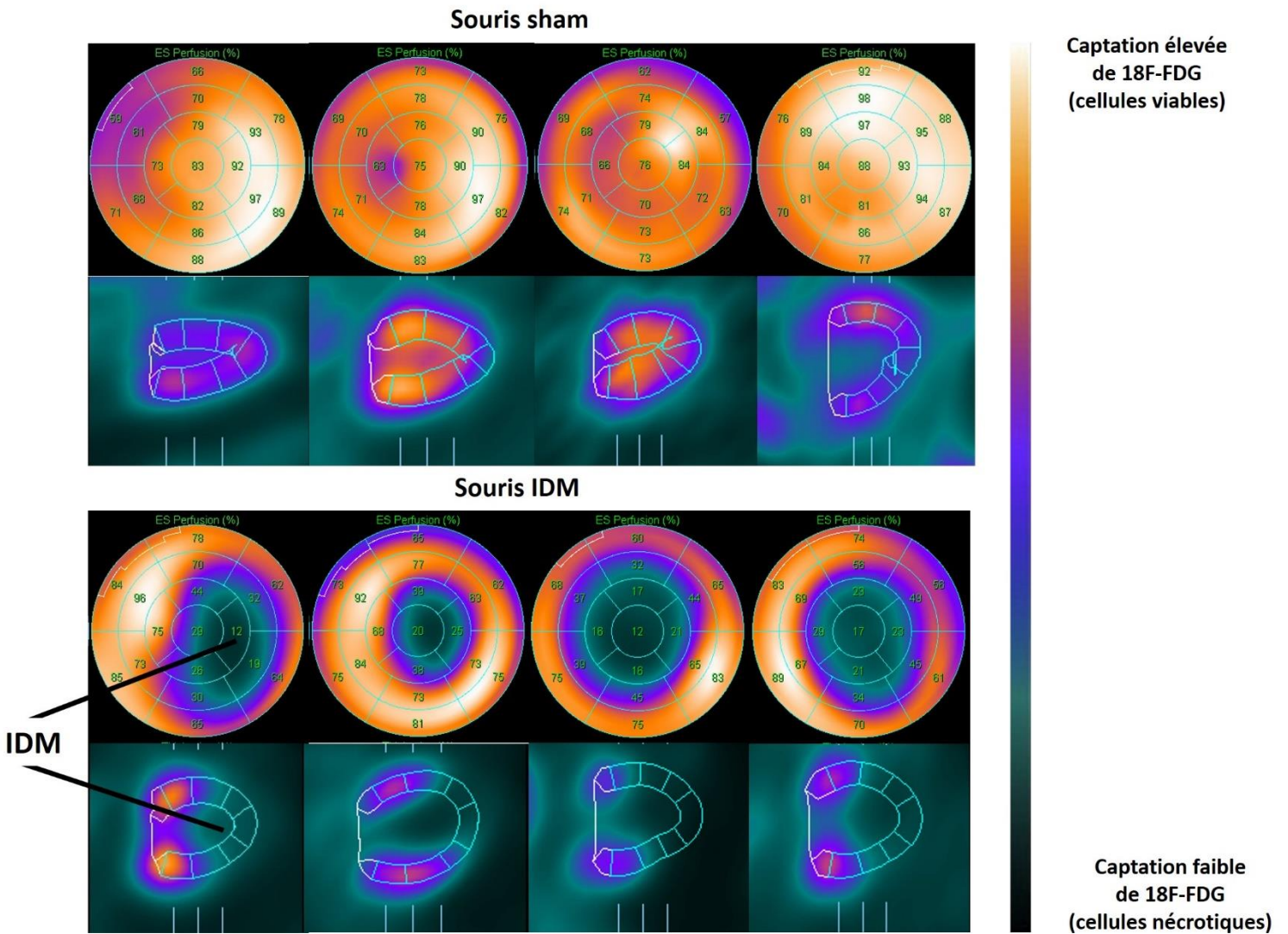


- Etude des paramètres cardiaques chez les souris après 24 heures d'IDM

Dans un premier groupe, appelé groupe de dérivation, 4 souris ont subi une ligature de l'artère coronaire afin d'induire un IDM et 4 souris ont subi une opération *sham*. 24h après la ligature, ces souris ont été soumises à un examen de TEP avec le traceur radioactif 18F-FDG.

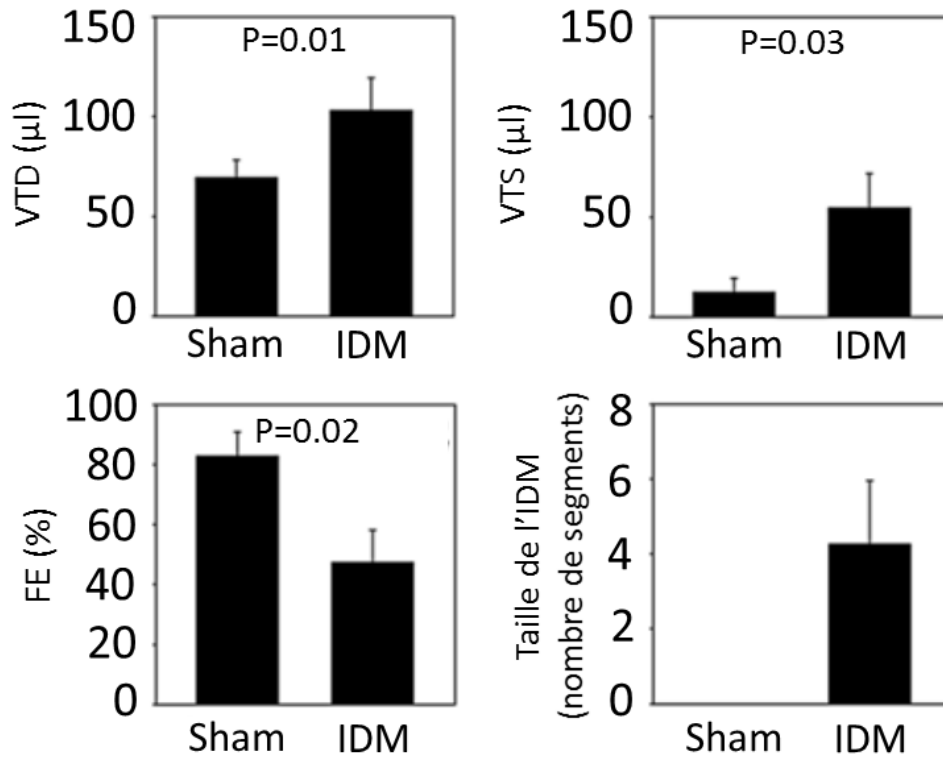
Les images obtenues par TEP chez les souris ligaturées et *sham* du groupe de dérivation sont présentées en **Figure 27**. Elles permettent de visualiser les valeurs de la captation du FDG au niveau du ventricule gauche et ainsi de définir les segments infarctés, c'est-à-dire les segments dont le pourcentage de captation du FDG est inférieur à 50%. Les parties présentant une coloration vive témoignent d'une captation de FDG élevée et donc de zones tissulaires saines ayant une activité métabolique importante. A l'inverse, les zones noires représentent les parties du cœur nécrosées, où l'activité métabolique est très faible.

Le cœur est communément divisé en 17 segments sur les cartes polaires<sup>224</sup> permettant de compter le nombre de segments sains ou de segments nécrosés afin d'établir le pourcentage du ventricule gauche atteint par l'IDM. Sur les images, l'activité du 18F-FDG (en pourcentage) est indiquée sur chacun des segments. L'IDM apparaît sur l'apex du ventricule gauche des souris ayant subi une ligature coronaire. Les souris *sham* ne présentent aucun segment avec une valeur de captation du 18F-FDG inférieure à 50% et donc pas de cellules nécrosées.



**Figure 27:** Résultats de la TEP 24 heures après l’opération chez les souris appartenant au groupe de dérivation. Pour chaque souris, une carte polaire (en haut) et une coupe selon le grand axe horizontale (en bas) sont présentées. Les ventricules gauches sont divisés en 17 segments et le chiffre indiqué dans chaque segment correspond au % de captation du 18F-FDG. Un segment avec un pourcentage inférieur à 50 est considéré comme nécrotique. Les couleurs sombres représentent un faible taux de captation et les couleurs vives un taux élevé.

Cet examen permet ainsi de calculer la taille de l'IDM et nous donne différents paramètres cardiaques présentés dans la **Figure 28**.



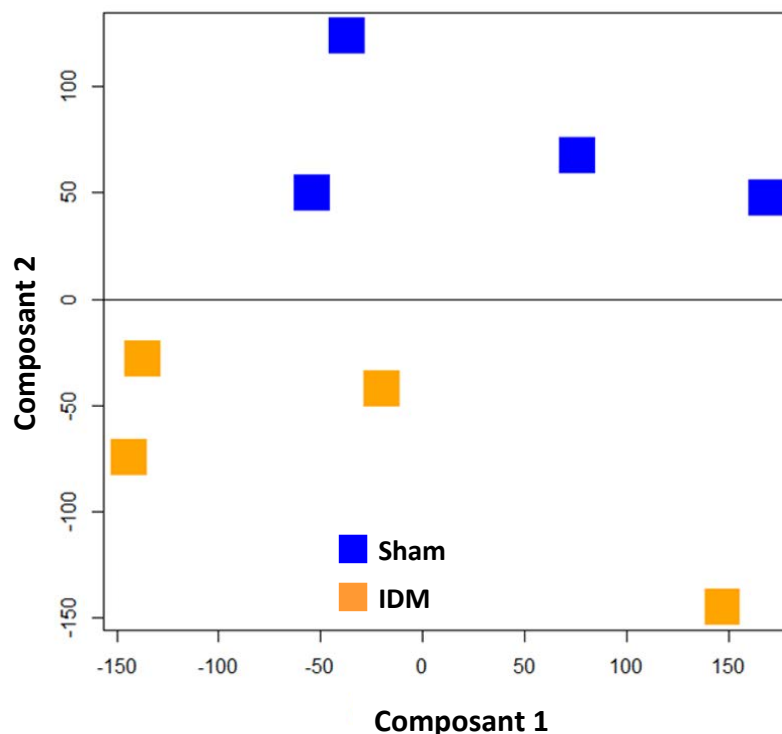
**Figure 28:** Paramètres cardiaques des souris *sham* et souris avec IDM du groupe de réplication évalués par TEP à 24 heures. Les VTD et VTS sont représentés en µl et ont permis de calculer la FE en %. La taille de l'IDM est caractérisée par le nombre de segments ayant un pourcentage de captation inférieur à 50%.

Les souris ayant subi une ligature coronaire présentent donc un IDM d'une moyenne de 4 segments, ce qui représente 24% du ventricule gauche. Dès 24 heures, les paramètres cardiaques ont évolué entre les deux groupes montrant une augmentation ventriculaire de par l'augmentation des VTS et VTD. Ceci se répercute inévitablement sur la FE puisqu'elle a été calculée de la façon suivante :  $(VTD-VTS)/VTD*100$ . Ainsi après 24 heures, on a pu observer une diminution significative de la FE de 36%. Ceci nous montre que les souris utilisées pour la suite des analyses présentent une hypertrophie cardiaque.

- Etude de l'expression des lncARNs dans le cœur de souris post-IDM

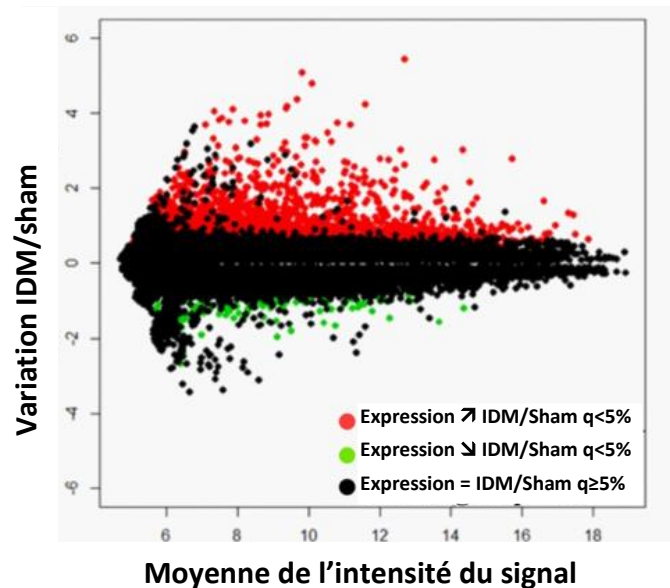
Immédiatement après l'examen par TEP, réalisé 24 heures après ligature, les souris ont été sacrifiées afin de prélever le cœur. Les ARNs cardiaques ont été extraits et déposés sur des puces à ARN contenant les sondes de tout le génome de la souris. Ces puces possèdent 55 681 sondes qui reconnaissent à la fois des ARNs codants et non codants. Nous avons choisi ce type de puces afin de pouvoir évaluer la modulation des lncARNs ainsi que celle des gènes codants.

Pour l'analyse des données, les sondes contrôles ont été retirées ainsi que les sondes détectées dans moins de 4 souris. 34 049 sondes ont donc été retenues. L'analyse en composantes principales de ces sondes a permis de discriminer, de façon très claire, les 2 groupes de souris (**Figure 29**).



**Figure 29:** Analyse en composantes principales des données des puces à ARN montrant la discrimination entre les souris avec IDM et les souris *sham*, grâce à l'expression génique.

Ensuite, seuls les gènes ayant une différence statistiquement significative (valeur de  $q$  inférieure à 0,05) et avec une différence d'expression d'au moins 2 fois entre les 2 groupes ont été considérés comme différentiellement exprimés. Ceci a permis de mettre en évidence 704 gènes (**Figure 30**).



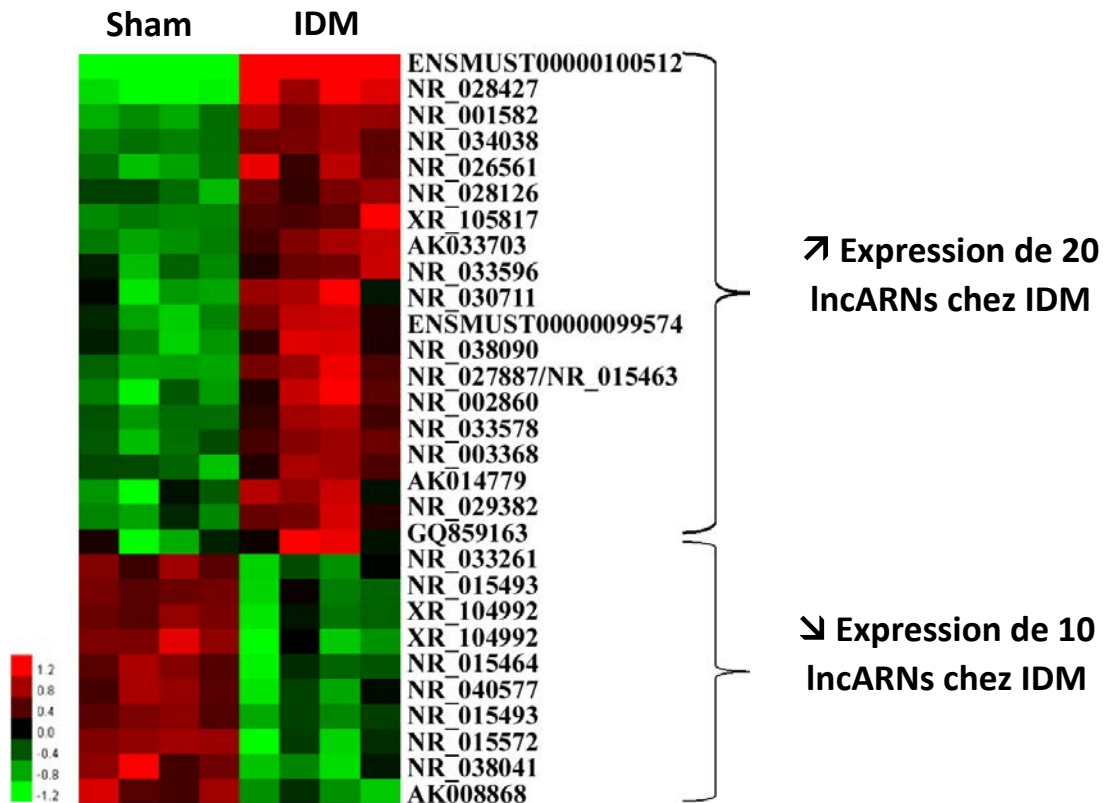
**Figure 30:** Graphique M-A représentant la différence d'expression pour chaque gène par rapport à l'intensité d'expression du gène. Les points noirs représentent les gènes dont la différence d'expression n'est pas statistiquement significative. Les points verts représentent les gènes qui sont sous exprimés de façon significative chez les souris avec IDM par rapport aux souris *sham* et les points rouges ceux qui sont surexprimés de façon significative. Le seuil de significativité (valeur  $q$ ) a été fixé à 5% et la différence d'expression à 2 fois.

Ces puces à ARN ont été conçues pour l'étude du génome entier de la souris. Ainsi il a été nécessaire de développer un processus analytique permettant d'extraire les données des lncARNs depuis les données totales.

Brièvement, ceci a été réalisé de la façon suivante : parmi les 55 691 sondes de départ, environ la moitié ont été exclues puisque ces sondes reconnaissaient des gènes codants pour des protéines, c'est-à-dire portant un nom d'identification avec un préfixe NM dans les bases de données. 29 146 sondes reconnaissant donc des gènes sans préfixe NM ont été retenues.

Ces séquences ont été blastées avec des séquences de lncARNs répertoriées dans les bases de données *lncRNADB*, *RefSeq* et *Ensembl*.

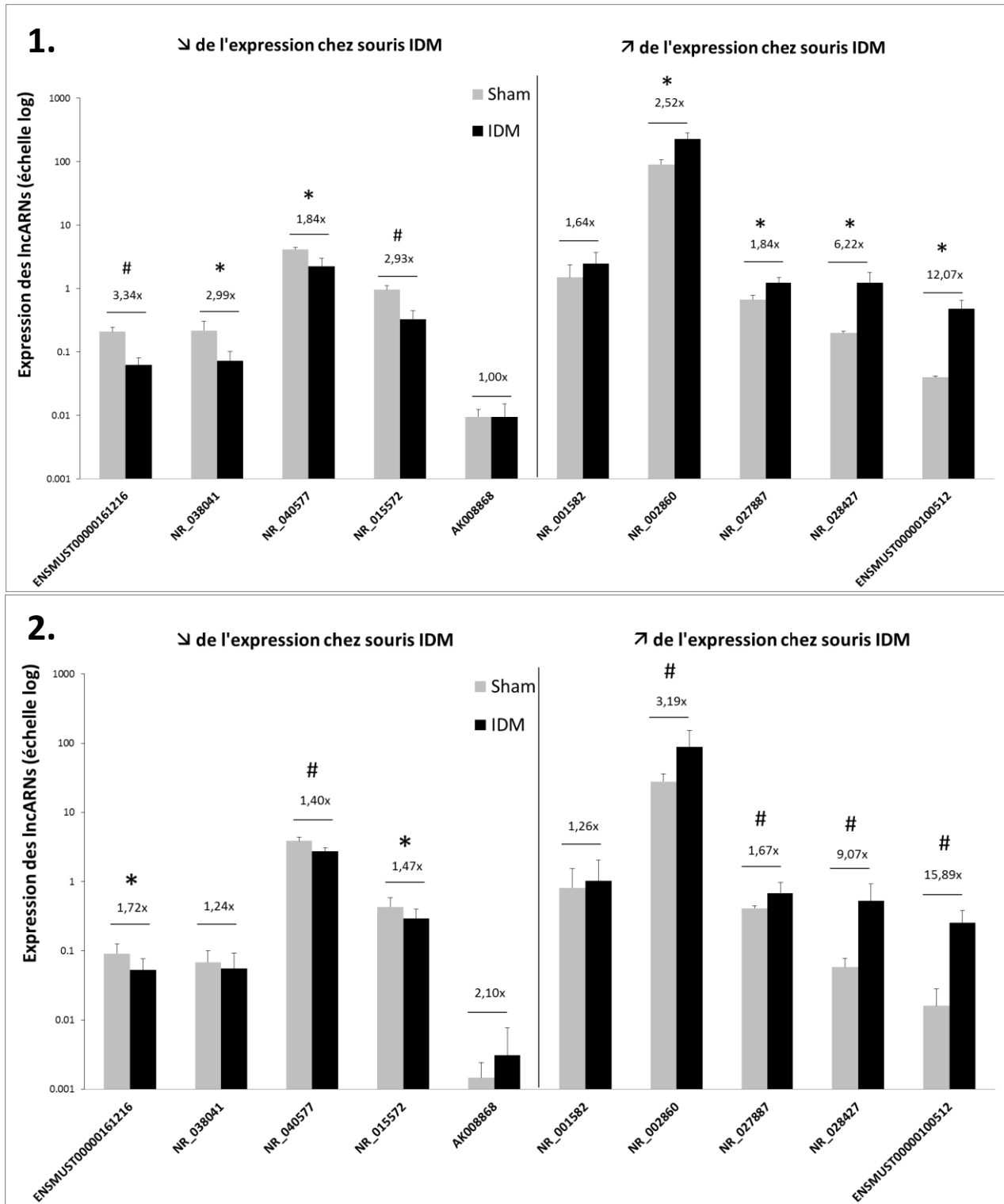
2 831 sondes reconnaissant des lncARNs ont donc été mises en évidence, soit environ 5% des sondes totales. Nous avons donc ensuite extrait, parmi ces 2 831 sondes, les lncARNs différentiellement exprimés de façon statistiquement significative ( $q < 5\%$ ) et avec une différence d'au moins 2 fois entre les 2 groupes. 30 lncARNs ont été ainsi identifiés (**Figure 31**).



**Figure 31:** Carte d'expression des lncARNs différentiellement exprimés entre souris *sham* et souris avec IDM. La couleur rouge représente la surexpression et la couleur verte la sous-expression entre les 2 groupes. Le seuil de significativité (valeur  $q$ ) a été fixé à 5% et la différence d'expression à 2 fois.

10 lncARNs ont ensuite été sélectionnés : les 5 plus surexprimés et les 5 plus sous-exprimés chez les souris avec IDM par rapport aux souris *sham*. Il a été ensuite nécessaire de valider la différence d'expression de ces lncARNs entre les 2 groupes.

Pour cela, des PCR quantitatives ont été réalisées dans les cœurs de souris utilisées pour les puces à ARN (**Figure 32.1.**). De plus, un nouveau groupe de souris, nommé groupe de validation, a été inclus dans l'étude. Ce groupe est composé de 8 souris *sham* et 8 souris avec IDM. Des PCR quantitatives ont été également effectuées sur ce groupe de validation permettant de valider les résultats du premier groupe (**Figure 32.2.**).



**Figure 32:** Quantification des lncARNs par PCR quantitative dans les cœurs de souris du groupe de dérivation (1.) et de validation (2.). Le groupe de dérivation contient 4 souris avec IDM et 4 souris sham et le groupe de validation contient 8 souris avec IDM et 8 souris sham. Les données sont présentées en échelle logarithmique et normalisées par rapport à la GAPDH.

\*P<0,05 et #P<0,001

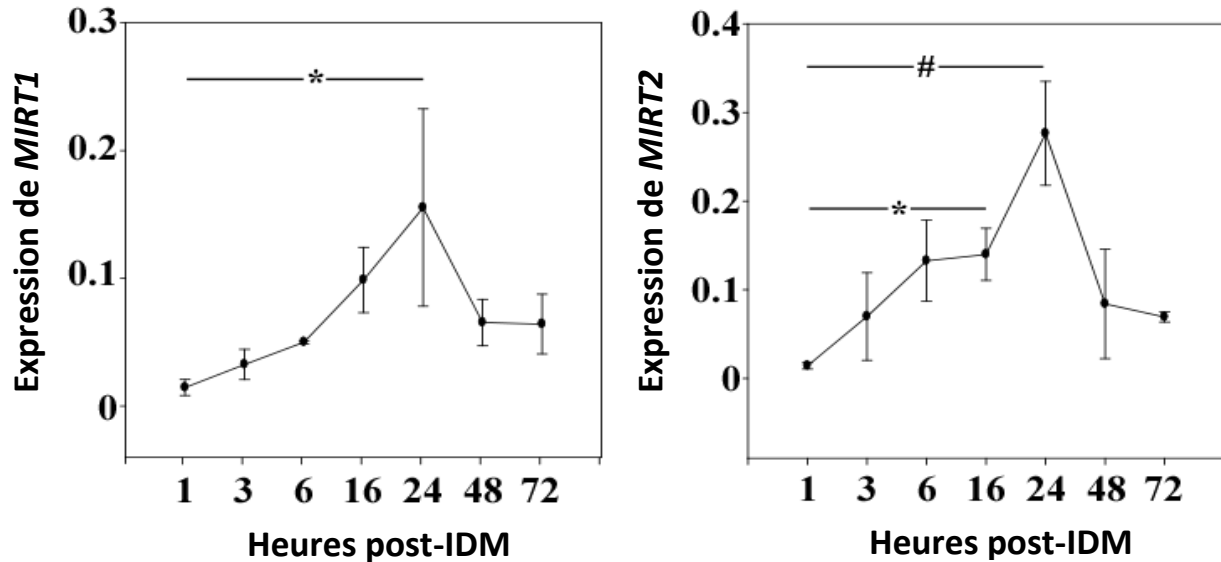


Dans ces analyses, l'échelle logarithmique a été choisie pour pouvoir visualiser les 10 lncARNs sur un même graphique. En effet, il existe une grande différence entre les niveaux d'expression de certains lncARNs. Par exemple, le NR\_002860 est le plus exprimé dans le cœur et il est en moyenne 10 000 fois plus exprimé que le lncARN AK008868. Celui-ci est le moins exprimé, ce qui explique probablement pourquoi on ne retrouve pas la différence d'expression entre les 2 groupes obtenue dans les puces. Dans le groupe de dérivation, la différence d'expression du NR\_001582 est bien présente mais n'est pas statistiquement significative. En revanche, pour les 8 autres lncARNs, on retrouve bien les différences d'expression de façon significative entre les souris avec IDM et les souris *sham*.

Dans le groupe de validation, on retrouve des résultats similaires à ceux obtenus dans le groupe de dérivation, à la différence que le lncARN NR\_038041 ne montre pas de différence statistiquement significative entre les souris *sham* et les souris avec IDM.

Dans le groupe de dérivation et dans le groupe de validation, 2 lncARNs se démarquent de par leur grande différence d'expression entre souris avec IDM et souris *sham*. En effet, le NR\_028427 présente une différence de 6 fois dans le premier groupe ( $p=0,03$ ) et une différence de 9 fois dans le second ( $p<0,001$ ). Le lncARN ENSMUST00000100512 quant à lui présente une différence encore plus élevée puisqu'elle est de 12 fois dans le premier groupe ( $p=0,03$ ) et de 16 fois dans le deuxième ( $p<0,001$ ). Ces 2 lncARNs, se démarquant des autres, ont été sélectionnés et nommés *myocardial infarction-related transcript 1 (MIRT1)* pour le lncARN NR\_028427 et *MIRT2* pour le lncARN ENSMUST00000100512.

Afin d'étudier l'évolution de l'expression de *MIRT1* et *MIRT2*, 21 nouvelles souris ont subi une ligature de l'artère interventriculaire afin d'induire un IDM et ont été sacrifiées à différents temps après chirurgie : 1, 3, 6, 16, 24, 48, et 72 heures (n=3 par temps) (**Figure 33**).



**Figure 33:** Expressions de *MIRT1* et *MIRT2* à différents temps après l'IDM (n=3 par temps). Les données sont normalisées par rapport à la GAPDH.  
\*:P<0,05 et # :P<0,001 vs 1 heure

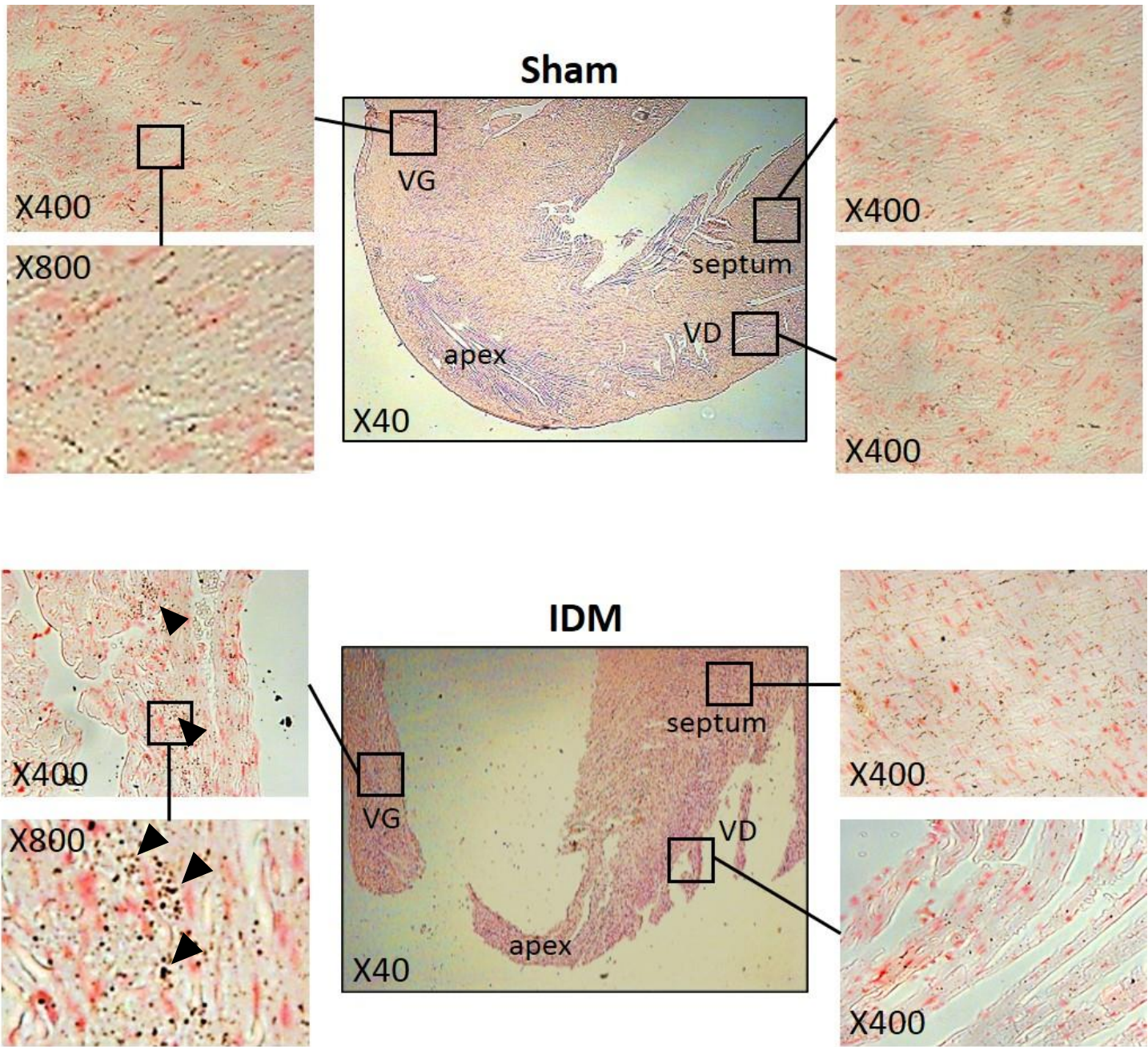
*MIRT1* et *MIRT2* montrent une augmentation progressive de leur expression jusqu'à 24 heures atteignant un maximum de 10 fois pour *MIRT1* et de 19 fois pour *MIRT2*. L'expression de *MIRT1* reste assez élevée après 24 heures alors que l'expression de *MIRT2* retourne à un niveau basal après 48 heures.

Ainsi, ces données nous montrent que l'IDM induit des changements importants de l'expression des lncARNs dans le cœur de souris.

- Etude de la localisation de *MIRT1* dans le cœur de souris après IDM

L'objectif suivant a consisté en l'étude de la localisation du *MIRT1* dans le cœur de souris avec l'IDM. Pour cela, des hybridations *in situ* ont été réalisées permettant la détection de lncARNs grâce à une sonde. Cette sonde, couplée à la digoxigénine, est reconnue par un anticorps lui-même couplé à la phosphatase alcaline formant un précipité brun lors de la présence de son substrat. Ainsi, un nouveau groupe de souris contenant 3 souris avec IDM et 3 souris *sham* a été créé et les souris ont été sacrifiées après 24 heures afin de récupérer le cœur pour réaliser des coupes en paraffine.

Cette manipulation a permis de mettre en évidence une plus forte expression du *MIRT1* dans le ventricule gauche de souris avec IDM (**Figure 34**). En effet, les résultats de l'hybridation *in situ* montrent un plus grand nombre de précipités noirs attestant d'une forte expression dans le ventricule gauche par rapport aux autres parties du cœur comme le ventricule droit, le septum ou l'apex et également par rapport au cœur de la souris *sham*.

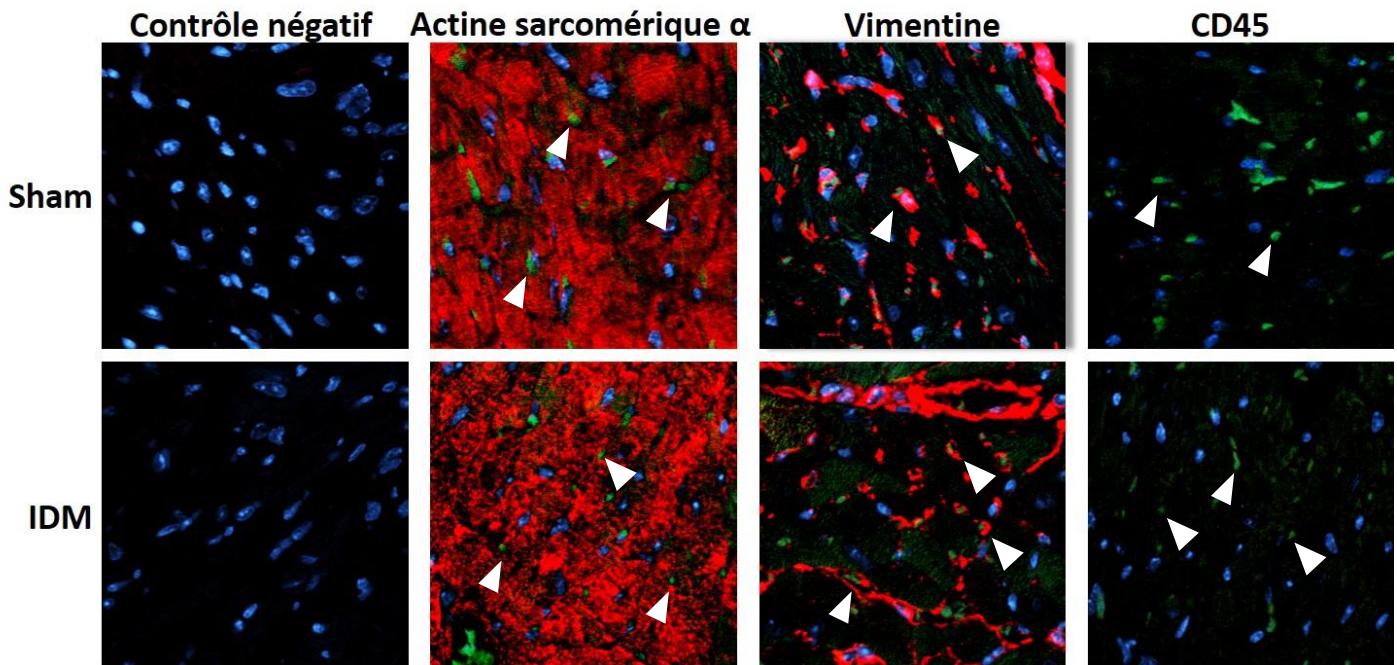


**Figure 34:** Images représentatives de l'hybridation *in situ* révélant la localisation de *MIRT1* sur des coupes de cœurs de souris *sham* et souris avec IDM. Les flèches noires indiquent une forte expression du *MIRT1*.

VG: Ventricule gauche et VD: Ventricule droit. Grossissement X40, X400 et X800

Afin de préciser le type cellulaire exprimant *MIRT1* dans le ventricule gauche, nous avons réalisé un couplage entre une hybridation *in situ* en fluorescence et une immunofluorescence marquant les cellules de façon spécifique (**Figure 35**).

L'actine sarcomérique  $\alpha$  est une protéine permettant la contraction des cellules et est donc une protéine spécifique, dans le cœur, des cardiomyocytes. La vimentine est une protéine constituant le cytosquelette des cellules et est particulièrement abondante dans les fibroblastes. Enfin, le CD45 est un marqueur membranaire des cellules hématopoïétiques avec noyaux c'est-à-dire des leucocytes. Le contrôle négatif a été réalisé en ne mettant pas d'anticorps primaire durant l'immunofluorescence.



**Figure 35:** Images représentatives de l'hybridation *in situ* couplée à l'immunofluorescence permettant d'identifier les cellules exprimant *MIRT1* dans les cœurs de souris *sham* et souris avec IDM. Les flèches blanches montrent l'expression de *MIRT1* coloré en vert. Les points bleus représentent les noyaux. Les marqueurs cellulaires sont en rouge: l'actine sarcomérique  $\alpha$  représente les cardiomyocytes, la vimentine représente les fibroblastes et le marqueur CD45 représente les leucocytes. Grossissement: X400



Ces analyses nous permettent d'observer une colocalisation de *MIRT1* avec la vimentine suggérant ainsi que *MIRT1* est exprimé par les fibroblastes dans les cœurs de souris. *MIRT1* ne semble pas être colocalisé avec l'actine sarcomérique  $\alpha$  malgré sa forte présence dans le cœur. Le marquage CD45 n'a révélé aucune cellule positive à ce marqueur.

○ Association entre *MIRT1*, *MIRT2* et le remodelage ventriculaire post-IDM

Dans l'étude des paramètres cardiaques, nous avons pu observer, déjà après 24 heures, une modification de la morphologie cardiaque de par une augmentation des volumes en diastole et en systole. Ceci nous montre une hypertrophie ventriculaire du cœur. Afin d'étudier la potentielle association entre *MIRT1*, *MIRT2* et cette hypertrophie, nous avons dans un premier temps réalisé des corrélations entre l'expression de ces 2 lncARNs et les paramètres cardiaques obtenus par TEP dans le groupe de dérivation (**Tableau 7**).

|              | Taille de l'IDM |      | VTD   |      | VTS   |      | FE   |      |
|--------------|-----------------|------|-------|------|-------|------|------|------|
|              | R               | P    | R     | P    | R     | P    | R    | P    |
| <i>MIRT1</i> | -0,8            | 0,33 | -0,48 | 0,52 | -0,75 | 0,25 | 0,85 | 0,15 |
| <i>MIRT2</i> | -0,8            | 0,33 | 0,6   | 0,42 | 0     | 1    | 0,8  | 0,33 |

**Tableau 7:** Corrélations entre *MIRT1*, *MIRT2* et les paramètres cardiaques obtenus par TEP 24 heures après l'IDM dans le groupe de dérivation. Les chiffres en rouge représentent les corrélations potentiellement intéressantes. R: Coefficient de corrélation ; P: valeur P

*MIRT1* et *MIRT2* sont fortement corrélés avec la taille de l'IDM de façon négative (*MIRT1*:  $R = -0,8$ ;  $P = 0,33$ ; *MIRT2*:  $R = -0,8$ ;  $P = 0,33$ ) et avec la FE de façon positive (*MIRT1*:  $R = 0,85$ ;  $P = 0,15$ ; *MIRT2*:  $R = 0,8$ ;  $P = 0,33$ ). Cependant les coefficients de corrélation ne sont pas statistiquement significatifs. Ceci est probablement dû au faible nombre d'animaux inclus dans cette étude. L'expression de ces 2 lncARNs n'est pas corrélée avec les 2 volumes ventriculaires. Ceci nous montre que ces 2 lncARNs sont bien associés avec la fonction ventriculaire et ne sont pas uniquement le reflet de la taille de l'IDM.

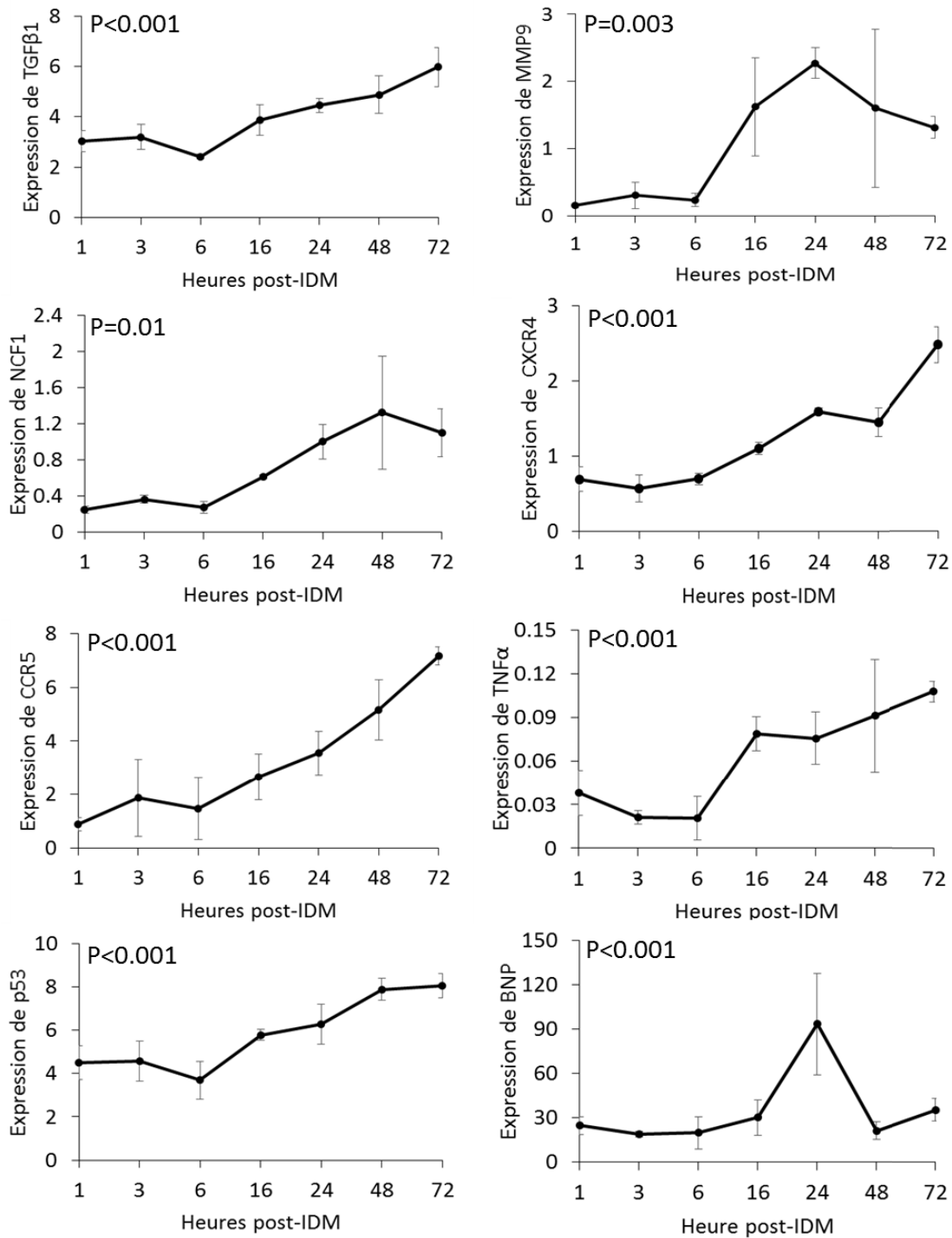
Pour approfondir cette association entre les lncARNs choisis et le remodelage ventriculaire, nous avons choisi de réaliser des corrélations entre les lncARNs et des gènes connus pour être impliqués dans le remodelage ventriculaire. Comme dans l'étude précédente, grâce à une combinaison de mots clés, nous avons extrait, de la banque de données NCBI, une liste de 47 gènes connus pour être impliqués dans le remodelage. Ces mots clés étaient « IDM » et « remodelage ventriculaire » restreints au génome de la souris. Parmi ces 47 gènes, 38 ont été détectés sur les puces à ARN et leurs expressions ont été corrélées avec les expressions de *MIRT1* et de *MIRT2*, nous permettant de construire un réseau (**Figure 36**).

*MIRT1* a montré de fortes corrélations avec 18 gènes de façon statistiquement significative et *MIRT2* avec 17 gènes. Dans le réseau associant les 2 lncARNs et les gènes, les 38 gènes sont représentés dans les cercles à la périphérie. Plus les lignes sont épaisses entre les lncARNs et les gènes, plus les corrélations entre eux sont fortes. Les traits en pointillé représentent une absence de corrélation. Plus la couleur à l'intérieur des cercles est foncée, plus les gènes sont différentiellement exprimés entre les souris avec IDM et les souris *sham*.





Pour finir, l'expression de plusieurs gènes, associés à *MIRT1* et *MIRT2*, a été mesurée par PCR quantitative dans les cœurs de souris sacrifiées à différents temps après l'IDM (**Figure 37**).



**Figure 37:** Expressions des gènes du remodelage mesurés au cours du temps par PCR quantitative dans le cœur de souris après IDM (n=3 par temps). Les données sont normalisées par rapport à la GAPDH. \*P<0.05 et #P<0.001 (test ANOVA).

Tous les gènes du remodelage ont une expression augmentant progressivement après l'IDM. Le gène codant pour NCF1 montre une stabilisation de son expression à partir de 24 heures et le gène du TNF $\alpha$  à partir de 16 heures. Les gènes codant pour TGF $\beta$ 1, CXCR4, CCR5 et p53 ne cessent d'augmenter jusqu'à au moins 72 heures. Le gène de la MMP9 montre un pic d'expression à 24 heures et redescend légèrement dans les jours suivants.

Le gène codant pour le BNP montre un pic d'expression à 24 heures, avec une augmentation d'environ 3 fois par rapport à l'état basal. A 48 heures, son expression est revenue à la normale. Ce gène n'était pas corrélé avec *MIRT1* et *MIRT2* dans les analyses précédentes à 24 heures mais nous l'avons sélectionné car c'est un marqueur essentiel et très connu dans le remodelage. De façon intéressante, il montre un profil d'expression similaire à ceux de *MIRT1* et *MIRT2* au cours du temps (**Figure 33, page 155**).

Ces dernières analyses nous montrent l'association entre les 2 lncARNs sélectionnés et les gènes du remodelage motivant l'hypothèse de leur implication dans le processus de remodelage post-IDM.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence la régulation des lncARNs après l'IDM dans le cœur de souris. Les puces à ARN nous ont, en effet, permis d'observer une modulation intéressante de 30 lncARNs dans le cœur après l'IDM. 2 d'entre eux ont été caractérisés et associés avec le remodelage ventriculaire de par leur corrélation avec les paramètres cardiaques et les gènes connus pour être impliqués dans le remodelage. Ces 2 lncARNs deviennent ainsi de potentielles cibles thérapeutiques pour contrer le remodelage ventriculaire post-IDM.

# Discussion

La recherche scientifique dans le domaine biomédical a pour objectif premier de développer les connaissances de notre organisme, principalement pour améliorer notre qualité de vie. Cette notion de qualité de vie est difficile à définir car elle est multiparamétrique mais elle comporte en tout cas une approche médicale. Ainsi l'amélioration de l'état de santé général d'une population influe sur sa qualité de vie. Ceci montre l'importance de la recherche à agir dans le domaine de la santé.

Afin d'améliorer les traitements de pathologies, la recherche se concentre perpétuellement sur la découverte de nouvelles molécules. Celles-ci peuvent être vues sous différents aspects :

- un aspect pronostique permettant de prédire le développement d'une pathologie
- un aspect diagnostique permettant de déceler une maladie
- un aspect thérapeutique visant à soigner ou de recouvrer un phénotype sain.

Quoiqu'il en soit, ces molécules, utilisées dans la vie quotidienne, sont essentiellement des protéines. D'un point de vue thérapeutique, on s'intéresse également aux gènes codants pour ces protéines depuis un certain temps. Cependant, les récentes découvertes ayant démontré que seul 2% du génome est transcrit en ARNs codants pour des protéines, pourraient faire basculer cette tendance. En effet, ces dernières années les études montrant les pouvoirs pronostiques, diagnostiques et thérapeutiques des ARNs non codants se sont multipliées.

Les maladies cardiovasculaires sont l'un des grands fléaux de notre époque puisqu'il s'agit de la première cause de mortalité dans le monde. Il apparaît donc comme essentiel de s'investir dans ce domaine. C'est pourquoi notre laboratoire, prenant en compte ces données, se consacre à l'étude des ARNs non codants dans le domaine cardiovasculaire.

Comme expliqué précédemment, les ARNs non codants sont divisés en 2 catégories : les petits ARNs (comme les miARNs) et les lncARNs. Ainsi, cette discussion sera divisée en 2, à savoir une première partie sur nos résultats concernant les miARNs et une seconde sur les lncARNs.

- Valeur pronostique, diagnostique et thérapeutique des miARNs

Notre première étude a porté sur l'évaluation de la valeur pronostique et diagnostique de 6 miARNs (miR-133a, miR-208b, miR-223, miR-320a, miR-451 et miR-499) dans le contexte de l'IDM. Ces miARNs ont été mesurés chez des patients se présentant à l'hôpital avec des douleurs thoraciques aiguës formant la cohorte APACE de 1 155 patients. Les données ont été comparées aux valeurs pronostiques et diagnostiques des marqueurs habituels, la cTnT et l'hs-cTnT.

Les études sur les miARNs étaient déjà très nombreuses dans tous les domaines de recherche et évidemment aussi dans le domaine cardiovasculaire. Nous ne sommes donc pas les seuls à avoir étudié la possibilité que certains miARNs pourraient servir de marqueurs diagnostiques de l'IDM et avoir un meilleur potentiel que la cTnT ou la hs-cTnT<sup>226, 229</sup>. Cela-dit, dans la littérature, aucune autre étude n'a utilisé de cohorte aussi importante et celle-ci possède l'avantage d'être multicentrique et internationale<sup>230, 231</sup>.

Hormis le nombre de patients inclus dans cette étude, un avantage intéressant est la façon dont les patients ont été sélectionnés. En effet, les miARNs ont été mesurés dans le sang de patients présentant des douleurs thoraciques aiguës, signe d'un potentiel IDM mais sans un diagnostic défini, à la différence de la majorité des études qui mesurent habituellement des marqueurs dans le sang de patients présentant un IDM. Ceci permet de discriminer les patients et de savoir réellement si les miARNs sont capables d'apporter une valeur additive aux diagnostics effectués en routine.

Cette étude a donc permis de répondre à plusieurs questions par rapport à notre hypothèse de départ.

Tout d'abord, lors des mesures des miARNs dans les plasmas, les miR-208b, miR-320a et miR-499 ont montré une augmentation chez les patients avec IDM par rapport à des patients présentant des douleurs thoraciques sans IDM. Ces résultats sont intéressants car ils montrent une association entre les miARNs sélectionnés et l'IDM et cette association les place comme des marqueurs diagnostiques éventuels.

Les expressions de ces miARNs ont également été mesurées à l'intérieur du groupe des patients avec IDM pour étudier la différence d'expression entre les patients STEMI et les NSTEMI. Des augmentations significatives des miR-133a, miR-208b, miR-451 et miR-499 ont été observées ce qui pourrait permettre de discriminer les 2 groupes, leur donnant une dimension de biomarqueur intéressante.

Le pouvoir diagnostique de ces 6 miARNs a ensuite été mesuré grâce à des courbes ROC et il s'avère que le miR-208b et le miR-499, 2 miARNs montrant des résultats intéressants dans les 2 analyses précédentes, sont à nouveau les miARNs sortants du lot. En effet, leurs AUC sont les plus élevées. Cela dit, c'est peu surprenant puisqu'ils ont justement été sélectionnés pour leur potentiel à diagnostiquer l'IDM<sup>163, 164</sup>.

Malheureusement la comparaison entre le pouvoir diagnostique de ces miARNs et ceux de la cTnT et de l'hs-cTnT, réalisée ensuite, montre que les 2 miARNs n'ont pas une capacité supérieure à celle des cTnT pour diagnostiquer l'IDM et encore moins à celle de l'hs-TnT. De plus, l'association entre 2 marqueurs, comme par exemple le miR-208b et l'hs-cTnT qui présentent les meilleures AUC, ne surpasse pas le diagnostic déterminé par les marqueurs classiques seuls.

Ces résultats sont bien sûr décevants puisque le but était de trouver un marqueur plus spécifique que ceux déjà existants. Cependant, ces résultats sont biaisés par le fait que le diagnostic des patients a été réalisé en accord avec la définition de l'IDM impliquant le dosage des troponines<sup>23, 232</sup>.

Brièvement, la définition explique que l'IDM peut être diagnostiqué lorsqu'il y a l'évidence d'une nécrose cardiaque associée avec des paramètres cardiaques anormaux. La nécrose est décelée grâce à une augmentation, au-delà d'une valeur seuil, des cTnT ou des hs-cTnT. L'angine de poitrine est diagnostiquée lorsque les symptômes sont semblables à ceux de l'IDM mais lorsque le taux de cTnT est normal. Ainsi, le diagnostic de l'IDM est réalisé en fonction de la cTnT et de l'hs-cTnT, ce qui les positionne inévitablement comme les meilleurs biomarqueurs.

En effet, dans d'autres études, les résultats sont similaires aux nôtres. C'est le cas de l'étude de Li et al.<sup>169</sup> qui montre une augmentation des miR-1, miR-133a, miR-208b et miR-499 chez les patients atteints d'IDM par rapport à des volontaires sains. L'étude de Gidlöf et al.<sup>231</sup> montre les mêmes résultats que les nôtres concernant le miR-208b et le miR-499. Mais dans chacune de ces études, les miARNs ne sont pas capables de battre le pouvoir diagnostique des cTnT. Une solution à envisager serait de classer les patients avec ou sans IDM sans tenir compte de leur taux de troponine mais en observant d'autres paramètres, de mesurer le pouvoir diagnostique des miARNs et ensuite de le comparer à celui des cTnT.

Dans l'espoir de voir un jour un miARN devenir un biomarqueur mesuré dans le diagnostic de l'IDM, un point important est à prendre en compte. En effet, les miARNs ont l'inconvénient, par rapport aux cTnT, d'être mesurés par des techniques plutôt longues et fastidieuses. La technique de mesure des troponines s'effectue directement dans le sang et est réalisée en moins d'une heure. Au contraire, une mesure de miARNs nécessite plusieurs étapes dont une extraction d'ARN, une RT et une PCR. Ces techniques sont bien établies et sont fiables mais nécessitent en moyenne une demi-journée.

Cet élément n'est pas négligeable car la prise en charge des patients suspectés d'être atteints par d'IDM ne peut pas attendre une demi-journée. C'est pour cela que plusieurs compagnies pharmaceutiques (Nanostring Technologies ou HTG Molecular Diagnostics Incorporation par exemple) se concentrent sur la recherche de nouvelles techniques qui pourraient permettre de mesurer les miARNs de façon plus rapide.

En ce qui concerne le pouvoir pronostique des miARNs sur la survie des patients après IDM, ce sujet a été moins abordé. Matsumoto et al.<sup>233</sup> ont travaillé sur la signature des miARNs circulants chez des patients ayant survécu ou non à un IDM pour étudier le pouvoir pronostique des miARNs. Ils ont identifié 11 miARNs différentiellement exprimés chez des patients avec un risque de mortalité élevé et particulièrement le miR-155 et le miR-380, significativement élevés chez les patients décédés par la suite.

Pour revenir à notre étude, des courbes de Kaplan-Meier ont été réalisées en s'intéressant au miR-208b. Il en découle que les patients ayant un faible taux de miR-208b auraient un meilleur taux de survie que les patients avec un taux élevé et ce, à court terme ou à long terme. Malheureusement, une fois encore, ce résultat n'est pas tout à fait satisfaisant car cette capacité pronostique est très modeste.

Cette étude est la première à inclure une cohorte aussi importante et surtout à se mettre dans les conditions réelles de ce qui se passe en clinique de façon routinière. Malheureusement elle n'a pas permis d'obtenir les résultats escomptés, ce qui tempère l'utilisation des miARNs comme biomarqueurs diagnostiques ou pronostiques dans l'IDM. Cela dit, nous ne pouvons exclure le fait que d'autres miARNs pourraient avoir cette capacité. En effet, nous avons limité cette étude à 6 miARNs sélectionnés par rapport aux études précédemment effectuées mais il est tout à fait possible que d'autres miARNs non connus aient des propriétés cliniques intéressantes.

C'est pour cette raison que l'étude n°2 a été mise en place. En effet, l'objectif de cette étude présentée en un deuxième temps dans ce manuscrit a été d'identifier des miARNs impliqués dans le remodelage ventriculaire post-IDM afin de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs ou cibles thérapeutiques. Pour cela, 2 approches ont été accomplies, une approche de biologie moléculaire par l'utilisation de puces à ARN et une approche de bio-informatique par l'utilisation de réseaux basés sur les systèmes cellulaires.

Ainsi, dans un premier temps, 60 patients ont été sélectionnés selon leurs critères de remodelage et répartis sur 2 groupes, avec ou sans remodelage. Des puces à ARN ont été effectuées et ont pu mettre en avant près de 200 miARNs détectés chez les patients. Cependant, il réside une limitation dans ces analyses de par le faible nombre de patients inclus mais aussi par le fait de mélanger les différents plasmas.

La stratégie de mélanger les échantillons de plusieurs patients pour former un pool est souvent utilisée dans les technologies de criblage à haut débit qui permettent d'étudier un grand nombre de molécules. En effet, ce sont des procédés qui sont très coûteux et l'une des stratégies, lorsqu'un grand nombre d'individus est à étudier, est de créer un pool. Le problème avec cette technique est la perte de variabilité interindividuelle. Chaque individu n'est plus considéré comme tel et les mesures prises en compte sont des mesures moyennes. Ceci pourrait entraîner des distorsions de la réalité, c'est-à-dire faire ressortir des données non représentatives de la population totale ou à l'inverse, dissimuler des données intéressantes dans la moyenne.

C'est le cas de l'étude de Sadiq et al. qui, lors de leur étude sur des biomarqueurs protéiques, perdent 50% de leurs données en mélangeant les patients par rapport aux analyses sur des patients individuels<sup>234</sup>.



Dans notre étude, le groupe de patients présentant un remodelage ventriculaire est caractérisé par un  $\Delta$ VTD supérieur à 0 et contient donc des individus avec un remodelage ventriculaire différent ayant un  $\Delta$ VTD de 10 à 48ml. Il est donc clair qu'en fonction de la répartition des  $\Delta$ VTD à l'intérieur du groupe, les résultats d'expression des miARNs seront différents dans un pool.

Ensuite, de façon indépendante, une approche de bio-informatique a été utilisée afin d'identifier les miARNs potentiellement impliqués dans le remodelage. Cette approche est basée sur des systèmes cellulaires de par la création de réseaux. Pour cela, des gènes impliqués dans le remodelage ont été sélectionnés grâce à l'association de mots clés (IDM ; remodelage ventriculaire, homme) dans la base de données NCBI. 13 gènes ont émergé de ces analyses. Ensuite, une recherche d'interactions des protéines codées par ces 13 gènes avec d'autres protéines a été réalisée et 26 autres protéines ont été mises en avant. Les miARNs prédits pour interagir avec ces 39 gènes ont été extraits, apportant une nouvelle liste de 265 miARNs potentiellement impliqués dans le remodelage ventriculaire. Enfin, ces résultats ont permis de créer des réseaux d'interactions protéines/protéines et protéines/miARNs et les 10 miARNs les plus impliqués ont été présentés comme les 10 meilleurs candidats.

Cette étude est la première étude identifiant des miARNs comme marqueurs du remodelage post-IDM en utilisant une approche basée sur les systèmes. Notre équipe a précédemment montré tout l'intérêt de cette approche pour la découverte de biomarqueurs cardiovasculaires<sup>44</sup>. Cependant cette approche se base sur des connaissances déjà acquises puisqu'elle débute par la sélection de 13 gènes déjà connus pour être impliqués dans le remodelage et limite donc la découverte de miARNs qui pourraient être impliqués dans le remodelage sans réguler ces gènes.

L'association des deux approches a permis ensuite de sélectionner le miR-150. En effet, le miR-150 est l'un des 10 meilleurs miARNs candidats identifiés grâce aux analyses de bio-informatique. C'est également l'un des 200 miARNs détectés dans les puces à ARN et il est exprimé chez les patients n'ayant pas de remodelage ventriculaire mais est totalement absent chez les patients avec remodelage.

De plus, les analyses bio-informatiques ont montré des interactions entre le miR-150 et les gènes codants pour la CRP et ADR $\beta$ 1. Des manipulations cellulaires utilisant des plasmides ont permis de confirmer leurs régulations par le miR-150. Ceci montre l'implication du miR-150 dans les processus conduisant au remodelage ventriculaire mais montre également l'efficacité de l'approche basée sur les systèmes cellulaires.

Cette combinaison des deux approches est un bon exemple de biologie systémique qui consiste à intégrer plusieurs niveaux d'information pour comprendre le fonctionnement d'un système biologique grâce à l'étude d'interactions entre les différents éléments du système. Pour notre étude, cette démarche a permis de mettre en avant le miR-150 comme un biomarqueur véritablement intéressant dans le contexte du remodelage ventriculaire.

De ce fait, nous avons souhaité étudier sa capacité à pronostiquer la survenue d'un remodelage ventriculaire. Pour cela, des courbes ROC ont été réalisées et les AUC ont été comparées et combinées à celle du Nt-proBNP montrant que le miR-150 a une meilleure valeur pronostique. De plus, la combinaison des 2 ajoute encore une valeur au pronostic. Le miR-150 a également montré des capacités de reclassification de patients dont les pronostics étaient mauvais avec le Nt-proBNP seul ou avec des paramètres cliniques.

Notre étude a donc montré que le miR-150 serait un biomarqueur pronostique après IDM de par sa faible concentration chez les patients avec un remodelage ventriculaire et ce, dans 2 cohortes différentes. Ceci suggère que le miR-150 a un rôle protecteur dans le remodelage. Ceci est en accord avec de précédentes études montrant un faible taux de miR-150 chez des patients avec une hypertrophie<sup>191</sup> ou rupture ventriculaire post-IDM<sup>235</sup>. De plus, il a été montré récemment, chez des souris, que le miR-150 aurait un rôle central dans la protection du cœur contre l'IDM en agissant sur la migration des monocytes et la production de cytokines pro-inflammatoires<sup>236</sup> mais également en agissant sur la survie des cardiomyocytes<sup>237</sup>.

Cependant, il est possible que le design de notre étude tende à surestimer la capacité pronostique du miR-150 puisqu'il a été mesuré chez des patients déjà discriminés en 2 groupes, avec ou sans remodelage, grâce aux paramètres cardiaques. Enfin, une étude récente a montré que le miR-150 pourrait également être un biomarqueur diagnostique de l'IDM<sup>238</sup>.

Le miR-150 a ensuite été étudié dans le cœur de souris, et montre une augmentation de son expression 15 jours après l'IDM. Ceci est en désaccord avec nos données précédentes qui montrent un taux faible de miR-150 dans le plasma de patients ayant développé un remodelage post-IDM. Cela-dit les compartiments étudiés ne sont pas les mêmes puisque dans un cas, le cœur est étudié et dans l'autre, le plasma. Le miR-150 est particulièrement élevé dans la zone infarctée. De plus, les temps sélectionnés sont différents puisque chez la souris le miR-150 est mesuré une fois le remodelage ventriculaire établi, après 15 jours, alors que chez l'homme le miR-150 a été mesuré quelques jours après l'IDM et ensuite mis en relation avec le devenir du cœur.

Il faut également prendre en compte que le miR-150 retrouvé dans le plasma ne provient pas uniquement du cœur, mais qu'il peut aussi provenir des cellules inflammatoires puisqu'il a été montré que le miR-150 est sécrété par les monocytes<sup>239</sup>. L'étude du miR-150 nécessite ainsi encore des recherches mécanistiques plus précises. Quoi qu'il en soit, malgré des points à clarifier, le miR-150 est retrouvé à une faible concentration dans le plasma de patients avec un remodelage ventriculaire post-IDM, ce qui lui confère la qualité de biomarqueur pronostique pour le devenir des patients après un IDM.

Pour finir sur l'étude des miARNs, qu'ils soient considérés comme des cibles thérapeutiques ou comme des biomarqueurs, la normalisation reste un problème technique important. En effet, il n'existe pas de consensus à propos de la normalisation des PCR sur les miARNs car il n'existe pas de miARNs de ménage permettant de normaliser l'expression des miARNs comme le fait par exemple la GAPDH pour la normalisation des gènes.

La solution utilisée la plus couramment est d'ajouter des contrôles exogènes et invariants par le biais de miARNs synthétiques, avant l'extraction des miARNs. Cependant cette technique permet uniquement de normaliser les manipulations à partir de l'extraction sans prendre en compte la quantité de miARN de départ. Ce normalisateur doit être stable pour ne pas masquer les variations réelles. Nous avons donc utilisé une copie synthétique du miR-39 provenant de *C. elegans*, facilement détectable par PCR comme conseillé par le fournisseur du kit d'extraction utilisé.

- Valeur pronostique, diagnostique et thérapeutique des lncARNs

Les résultats précédemment décrits ainsi que d'autres études menées au laboratoire nous ont poussé à étudier les lncARNs, en pleine émergence, dans les mêmes contextes d'intérêt. L'étude présentée en troisième position dans ce manuscrit a eu pour objectif d'étudier l'expression des lncARNs dans le contexte de l'IDM et du remodelage ventriculaire afin de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques.

La stratégie d'étude a été similaire à l'étude précédente puisque nous avons commencé par réaliser des puces à ARN permettant d'avoir une grande quantité de gènes candidats et nous avons ensuite, grâce à des approches de bio-informatique, mis en relation nos résultats avec le remodelage ventriculaire.

Cette étude a été réalisée dans des cœurs de souris présentant un IDM et récupérés 24 heures après ligature coronaire.

La technique de ligature coronaire est une méthode de référence classiquement utilisée puisqu'elle mime les effets d'un IDM. En effet, lors de la ligature coronaire, la circulation dans une artère est stoppée grâce à un nœud autour de cette artère, tout comme un thrombus pourrait le faire dans une artère chez l'homme causant un IDM « naturel ». Pour avoir des souris contrôles (*sham*), la chirurgie est sensiblement la même, à l'exception du nœud mais le fil est tout de même passé autour de l'artère. Cela permet d'obtenir une différence entre les 2 groupes uniquement au niveau de l'IDM car l'inflammation due à la chirurgie est la même dans les 2 groupes. Les différences d'expression observées entre les 2 groupes sont ainsi réellement dues à l'IDM et non à la chirurgie, comme ce serait le cas si des souris saines étaient prises comme contrôles.

Cette technique est très difficile à réaliser chez la souris, de par la taille de l'animal et a nécessité une longue période d'entraînement et de mise au point. Cette technique est couramment et plus aisément réalisée chez le rat, mais dans des études de biologie moléculaire, la souris est privilégiée pour faciliter la production d'animaux transgéniques et pour réduire le coût d'administration de drogue.

Ainsi, un premier groupe de 8 souris (4 *sham* et 4 avec IDM) a été réalisé afin de mener les expériences de puces à ARN. En effet, une lame contient 8 puces à ARN, ce qui a permis d'étudier chaque souris indépendamment des autres sans avoir les limitations qu'un pool pourrait entraîner.

Dans ce premier groupe de souris, nous avons souhaité étudier les paramètres cardiaques des souris afin de pouvoir mettre en relation les résultats d'expression des gènes avec les données cardiaques après l'IDM. Pour cela, nous avons utilisé la technique de TEP. Nous avons eu la chance de pouvoir collaborer avec une équipe nancéenne qui possède un appareil de TEP dédié au petit animal. Cette technique n'est pas la technique de référence utilisée chez l'animal pour mesurer les paramètres cardiaques puisque l'échocardiographie est plus couramment utilisée. Cependant, la TEP permet d'obtenir, en plus des paramètres cardiaques tels que les volumes d'éjection, la caractérisation de l'IDM. Ceci est très intéressant puisqu'elle nous a permis de connaître les tailles d'IDM chez les souris.

Chez l'homme, cette technique a largement montré son efficacité à distinguer un tissu sain d'un tissu nécrosé et chez le rat, la technique a été optimisée précédemment en collaboration avec notre laboratoire<sup>223</sup>. Mais chez la souris, la TEP a été très peu utilisée dans le domaine cardiovasculaire. Une fois de plus, la taille de la souris pose un problème. En effet, la résolution du TEP pour petits animaux est de l'ordre du millimètre et le cœur de souris ne mesure que quelques millimètres. Ainsi, la précision a nécessité une amélioration. De plus, la fréquence cardiaque des petits animaux étant très élevée, il est très difficile d'obtenir une image nette.

La précision du TEP a été augmentée grâce à la mise au point chez la souris du protocole utilisé précédemment chez le rat pour une meilleure captation du  $^{18}\text{F}$ -FDG. L'acipimox a été utilisé car il inhibe la lipolyse endogène et provoque donc la diminution du taux d'acides gras libres dans le sang des animaux. Ceci limite l'utilisation des acides gras comme substrat énergétique par la cellule en faveur du traceur radioactif  $^{18}\text{F}$  couplé au glucose (FDG). Pour avoir une meilleure captation du  $^{18}\text{F}$ -FDG chez la souris, 2 injections ont donc été réalisées, une première une heure avant l'injection du traceur et une avec le traceur, une heure avant l'examen. De plus, l'examen a été allongé à une durée de 40 minutes, au lieu de 10 minutes chez le rat, pour permettre d'obtenir un nombre d'images supérieures et ainsi rendre les résultats plus précis.

Le problème lié à la fréquence cardiaque avait déjà été résolu précédemment chez le rat grâce à une synchronisation avec l'ECG<sup>240</sup>. Malheureusement, chez la souris, la synchronisation uniquement avec l'ECG n'est pas suffisante et ne permet pas d'avoir des images convenables du fait de leur fréquence extrêmement rapide (400 battements par minute en moyenne). A cela s'ajoutent les mouvements de la cage thoracique lors de la respiration. C'est pourquoi, en plus de la synchronisation avec l'ECG, nous avons synchronisé les images avec la respiration. Ceci a permis d'avoir des images plus nettes et précises, et d'obtenir les volumes ventriculaires.

Un examen de TEP a donc été effectué dans le premier groupe de souris juste avant leur sacrifice 24 heures après la chirurgie. En moyenne, les souris ayant subi une ligature coronaire présentent 4 segments nécrosés, c'est-à-dire 24% du ventricule gauche. La FE des souris avec IDM montre une diminution de 36% en moyenne déjà 24 heures après l'IDM, ce qui atteste d'une perte de fonction du ventricule gauche. Ceci est étroitement lié à l'augmentation des volumes d'éjection qui montre une dilatation.

Tous ces éléments sont le signe d'un remodelage cardiaque mais il est clair qu'un remodelage ne peut se faire en 24 heures si l'on prend en compte toutes les étapes aboutissant au remodelage. Ainsi, on parlera d'hypertrophie compensatoire plutôt que de remodelage à ce stade. En effet, le cœur, pour palier à la perte d'une partie de son muscle, va s'hypertrophier pour augmenter les volumes et éjecter un volume de sang plus grand.

24 heures après la chirurgie, les souris ont été sacrifiées. Nous avons choisi ce temps court pour étudier les mécanismes se produisant juste après l'IDM et avant le remodelage ventriculaire. Ainsi, ceci nous a permis d'étudier les mécanismes par lesquels pourraient passer la transition de l'IDM au remodelage et donc de cibler ces mécanismes pour prévenir d'un remodelage délétère.

Les cœurs de ces souris ont été récupérés afin d'extraire les ARNs totaux et de réaliser des puces à ARN pour une première phase de découverte. Des puces possédant des sondes pour le génome entier ont été utilisées. Nous avons choisi d'étudier le génome entier afin de pouvoir étudier, en plus de l'expression des lncARNs, l'expression des gènes codants impliqués dans le remodelage et de les mettre en relation. Nous avons pu identifier 30 lncARNs dont l'expression était différenciellement exprimée avec une différence d'au moins 2 fois. Parmi ceux-là, 12 montraient également une modulation d'expression dans l'étude de Li et al<sup>210</sup>.

Nous avons ensuite sélectionné 10 lncARNs, les 5 lncARNs les plus sous exprimés et les 5 les plus surexprimés dans les souris avec IDM par rapport aux souris *sham*. 8 de ces 10 lncARNs ont été validés dans le premier groupe grâce à la PCR. Dans un second groupe de 16 nouvelles souris, 7 de ces 10 lncARNs ont été validés. Il faut préciser que le premier et le second groupe de souris ont été réalisés à des moments et à des lieux différents mais montrent tout de même des résultats similaires.



Les 2 lncARNs les plus différenciellement exprimés, appelés *MIRT1* et *MIRT2*, ont été choisis et étudiés plus en détail, notamment en les associant avec les paramètres cardiaques et les gènes du remodelage.

*MIRT1* et *MIRT2* apparaissent comme fortement corrélés avec la taille de l'IDM de façon négative et avec la FE de façon positive. Cependant les coefficients de corrélation ne sont pas statistiquement significatifs. Ceci serait dû au faible nombre d'animaux inclus dans cette étude. C'est une limitation à notre étude. Ceci suggère que ces 2 lncARNs sont associés avec la fonction ventriculaire et ne sont pas uniquement dus à la perte cellulaire causée par l'IDM.

Cette association entre les lncARNs choisis et l'hypertrophie ventriculaire a été renforcée par des corrélations entre les lncARNs et des gènes connus pour être impliqués dans le remodelage ventriculaire. *MIRT1* et *MIRT2* ont montré de fortes corrélations avec ces gènes.

Parmi ces gènes, beaucoup sont impliqués dans l'inflammation. Ceci n'est pas étonnant puisque 24 heures après l'IDM, les processus d'inflammation sont très importants et il y a une infiltration des cellules inflammatoires dans le cœur. D'ailleurs dans les puces à ARN, on observe une augmentation du marqueur leucocytaire CD45 et du marqueur des macrophages CD68. Ainsi, une partie des modulations des lncARNs après 24 heures peut être attribuée aux cellules inflammatoires. L'hybridation *in situ* de *MIRT1* couplée à l'immunofluorescence montre une colocalisation de *MIRT1* avec les fibroblastes. L'hybridation *in situ* montre également une absence de marqueurs CD45 dans le cœur plus difficilement explicable compte-tenu des résultats des puces à ARN.

De plus, il apparait que *MIRT1* et *MIRT2* sont corrélés avec des gènes non impliqués dans l'inflammation, comme *p53* impliqué dans l'apoptose, *TGF $\beta$ 1* dans la fibrose, *MMP9* dans le renouvellement de la MEC ou encore avec *Lgals3*, un gène codant pour la galectine-3, nouveau marqueur de l'IC<sup>55, 241</sup>. *MIRT1* est également corrélé avec le gène codant pour le BNP montrant un profil d'expression au cours du temps tout à fait similaire à celui de *MIRT1*, c'est-à-dire une augmentation de l'expression avec un pic 24 heures après l'IDM. Les autres gènes étudiés ont montré des augmentations progressives au cours du temps se poursuivant souvent au moins jusqu'à 72 heures.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence la régulation des lncARNs dans le cœur après IDM. Elle nous a permis également d'entrevoir l'implication des lncARNs dans des voies de signalisation engagées dans le remodelage ventriculaire impliquant par exemple la MMP9, p53, TNF $\alpha$  ou encore TGF $\beta$ . Notre première étude sur les lncARNs est une étude préliminaire mais qui génère de nouvelles pistes pour la découverte de cibles thérapeutiques potentielles du remodelage ventriculaire. Moduler ces cibles pourrait donc permettre de prévenir le remodelage ventriculaire délétère et ainsi l'IC. Des travaux supplémentaires sont donc à réaliser.

Il serait judicieux par exemple d'étudier plus précisément les implications de *MIRT1* et *MIRT2* dans le cœur humain. Malheureusement, nous avons déjà envisagé ces pistes et il s'avère que ces 2 lncARNs ne possèdent pas d'orthologue dans le génome humain.

En effet, l'un des grands problèmes dans l'étude des lncARNs est leur faible conservation entre les différentes espèces, au contraire des miARNs qui sont très bien conservés. De plus, même s'il y a une homologie de séquence, la fonction ou la cible peuvent être différentes. Ainsi, il est plus intéressant de trouver des homologies de fonction pour un même lncARN mais pour cela, il faut le caractériser indépendamment dans les 2 espèces. Une solution qui paraît limiter ce problème est la recherche de cibles directement sur des cellules humaines.

Cela dit, dans les maladies cardiovasculaires, des lncARNs ont tout de même été identifiés chez la souris et il a été montré que ces lncARNs possèdent des orthologues chez l'homme. C'est le cas dans l'étude d'Ounzain et al. dans laquelle de nouveaux lncARNs spécifiques du cœur et impliqués dans des mécanismes de remodelage maladaptatif ont été identifiés<sup>13</sup>. Ces lncARNs apparaissent en effet comme régulés après remodelage ventriculaire post-IDM et leurs expressions sont corrélées avec les paramètres cardiaques des souris. 73% de ces nouveaux lncARNs possèdent une séquence orthologue chez l'homme.

De plus, 2 d'entre eux ont montré une différence d'expression significative dans des cœurs de patients avec une pathologie cardiaque. Ce sont des études comme celles-ci qui montrent le potentiel intéressant des lncARNs en tant que cibles thérapeutiques mais de nombreuses questions restent encore à explorer.

D'un point de vue clinique, c'est-à-dire en étudiant les lncARNs comme biomarqueurs pronostiques ou diagnostiques, notre étude ne s'est pas focalisée sur le sujet, bien que certains des lncARNs détectés pourraient avoir des rôles en tant que marqueurs diagnostiques dans l'IDM ou de pronostics dans le remodelage ventriculaire. Mais n'oublions pas que notre étude a été réalisée sur des cœurs de souris et qu'un biomarqueur doit posséder la propriété d'être circulant. Nous aurions donc pu récupérer le sang des souris afin d'extraire les ARNs et mesurer les lncARNs circulants.

Envisager que des lncARNs puissent être circulants est assez étonnant puisque ce sont des ARNs de grandes tailles, facilement dégradables. En revanche, tout comme les miARNs, ils peuvent tout à fait être encapsulés dans des vésicules telles que les exosomes et ce à raison de 3%<sup>212</sup>. Le lncARN *LIPCAR*, un lncARN d'origine mitochondriale, a été le premier à montrer une régulation de son expression dans le plasma ainsi qu'une association avec le développement du remodelage cardiaque. *LIPCAR* serait donc un biomarqueur très prometteur car capable de prédire le devenir des patients avec un remodelage ventriculaire post-IDM<sup>14</sup>. De plus, au laboratoire, nous avons récemment montré que l'expression de 4 lncARNs (*ANRIL*, *aHIF*, *kcnq1ot1* et *MALAT1*) est régulée de façon significative dans le sang total de patients avec IDM par rapport à des volontaires sains. Ces lncARNs apparaissent donc comme des biomarqueurs potentiels de l'IDM<sup>201</sup>.

# Conclusions et Perspectives

L'objectif, tout au long de ce travail de thèse, a été de montrer l'utilité des ARNs non codants en tant que biomarqueurs diagnostiques et pronostiques ainsi qu'en tant que cibles thérapeutiques dans le contexte de l'IDM et du remodelage post-IDM conduisant à l'IC. Ces études se sont axées autour des miARNs et des lncARNs.

Notre première étude s'est concentrée sur le pouvoir diagnostique des miARNs dans l'IDM ainsi que leur pouvoir pronostique pour le devenir des patients après IDM. Sur une cohorte de plus de 1 000 patients, le miR-208b a montré une bonne capacité diagnostique, ne dépassant malheureusement pas celle des hs-cTnT. Le miR-208b possède également une capacité modeste à prédire la mortalité des patients après IDM mais ce, de façon très modeste. Cette étude modère le fait que les miARNs étudiés possèdent une capacité de biomarqueur intéressante mais n'exclut pas la possibilité que d'autres miARNs peuvent avoir ce rôle.

L'objectif de la seconde étude a été de découvrir de nouveaux miARNs biomarqueurs et/ou cibles thérapeutiques dans le remodelage ventriculaire gauche post-IDM. Le miR-150 a montré une capacité de prédiction du remodelage ventriculaire intéressante. Sa mesure pourrait ainsi faciliter l'identification précoce des patients à risque de développer un remodelage ventriculaire délétère et donc une IC. La valeur pronostique du miR-150 doit être confirmée dans une cohorte indépendante plus importante.

Cette étude a également montré une modulation de l'expression du miR-150 dans le cœur de souris avec un remodelage ventriculaire. Ainsi, le miR-150 pourrait également être une cible thérapeutique. Des études mécanistiques visant à moduler l'expression du miR-150 seraient à réaliser pour étudier son rôle de façon plus précise et ainsi conclure sur son utilité.

La troisième étude s'est arrêtée sur les lncARNs. En effet, nous avons étudié l'expression des lncARNs dans le contexte de l'IDM chez la souris et leur association avec le remodelage ventriculaire. Ce travail a permis de montrer une modulation de façon importante de plusieurs lncARNs dans le cœur de souris après l'IDM et 2 lncARNs, *MIRT1* et *MIRT2*, ont été identifiés comme associés avec le remodelage.

Cependant, *MIRT1* et *MIRT2* ne possèdent pas d'orthologue chez l'homme, ce qui les rend peu attractifs. En revanche, un autre lncARN mis en évidence lors de cette étude, que nous avons appelé TRT (*Tenascin related transcript*), possède un orthologue de localisation génomique chez l'homme. Des études sur son mécanisme d'action sont en cours et pourraient permettre de comprendre son mécanisme d'action et son utilité thérapeutique.

Cette étude est un préambule à l'utilisation des lncARNs en tant que cibles thérapeutiques. Elle nous montre leur implication dans l'IDM et le remodelage. Dans une autre étude menée au laboratoire, la valeur des lncARNs comme biomarqueurs de l'IDM a été démontrée<sup>201</sup>.

En conclusion, ce travail de thèse a permis d'améliorer la compréhension de l'implication des ARNs non codants dans les maladies cardiovasculaires. Il offre de nombreuses perspectives pour des études futures visant à déterminer la valeur de biomarqueur et thérapeutique de ces ARNs.

# Bibliographie

- 1 World Health Organization. World health statistics annual. Annuaire de statistiques sanitaires mondiales.
- 2 Mathers CD and Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS medicine*. 2006;3:e442.
- 3 Mendis S, Puska P, Norrving B, World Health Organization., World Heart Federation. and 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.
- 4 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, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *European heart journal*. 2012;33:2551-2567.
- 5 McKay RG, Pfeffer MA, Pasternak RC, Markis JE, Come PC, Nakao S, Alderman JD, Ferguson JJ, Safian RD and Grossman W. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation*. 1986;74:693-702.
- 6 McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, 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. *European heart journal*. 2012;33:1787-847.
- 7 Gidh-Jain M, Huang B, Jain P, Gick G and El-Sherif N. Alterations in cardiac gene expression during ventricular remodeling following experimental myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1998;30:627-37.
- 8 Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409:860-921.
- 9 Kataoka M and Wang DZ. Non-Coding RNAs Including miRNAs and lncRNAs in Cardiovascular Biology and Disease. *Cells*. 2014;3:883-98.
- 10 van Rooij E and Olson EN. MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles. *Nature reviews Drug discovery*. 2012;11:860-72.

- 11 Creemers EE, Tijssen AJ and Pinto YM. Circulating MicroRNAs: Novel Biomarkers and Extracellular Communicators in Cardiovascular Disease? *Circulation research*. 2012;110:483-95.
- 12 Wang KC and Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Molecular cell*. 2011;43:904-14.
- 13 Ounzain S, Micheletti R, Beckmann T, Schroen B, Alexanian M, Pezzuto I, Crippa S, Nemir M, Sarre A, Johnson R, et al. Genome-wide profiling of the cardiac transcriptome after myocardial infarction identifies novel heart-specific long non-coding RNAs. *European heart journal*. 2014.
- 14 Kumarswamy R, Bauters C, Volkman I, Maury F, Fetisch J, Holzmann A, Lemesle G, Degroote P, Pinet F and Thum T. The Circulating Long Non-Coding RNA LIPCAR Predicts Survival in Heart Failure Patients. *Circulation research*. 2014.
- 15 Netter FH. *Atlas of human anatomy*. Sixth edition. ed.
- 16 World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases.v.
- 17 Libby P, Ridker PM and Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473:317-25.
- 18 Glass CK and Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001;104:503-16.
- 19 Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, Shih DM, Van Lenten BJ, Frank JS, Demer LL, et al. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1996;16:831-42.
- 20 Yamada Y, Doi T, Hamakubo T and Kodama T. Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 1998;54:628-40.
- 21 Hansson GK. Cell-mediated immunity in atherosclerosis. *Current opinion in lipidology*. 1997;8:301-11.
- 22 Colles SM, Irwin KC and Chisolm GM. Roles of multiple oxidized LDL lipids in cellular injury: dominance of 7 beta-hydroperoxycholesterol. *Journal of lipid research*. 1996;37:2018-28.
- 23 Thygesen K, Mair J, Katus H, Plebani M, Venge P, Collinson P, Lindahl B, Giannitsis E, Hasin Y, Galvani M, et al. Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. *European heart journal*. 2010;31:2197-204.
- 24 Armstrong PW, Collen D and Antman E. Fibrinolysis for acute myocardial infarction: the future is here and now. *Circulation*. 2003;107:2533-7.



- 25 Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014;129:e28-e292.
- 26 Torabi A, Cleland JG, Khan NK, Loh PH, Clark AL, Alamgir F, Caplin JL, Rigby AS and Goode K. The timing of development and subsequent clinical course of heart failure after a myocardial infarction. *European heart journal*. 2008;29:859-70.
- 27 Ezekowitz JA, Kaul P, Bakal JA, Armstrong PW, Welsh RC and McAlister FA. Declining in-hospital mortality and increasing heart failure incidence in elderly patients with first myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;53:13-20.
- 28 Pfeffer MA and Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81:1161-72.
- 29 Sadoshima J, Jahn L, Takahashi T, Kulik TJ and Izumo S. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267:10551-60.
- 30 Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y and Olivetti G. Myocardial response to infarction in the rat. Morphometric measurement of infarct size and myocyte cellular hypertrophy. *Am J Pathol*. 1985;118:484-92.
- 31 Dunlay SM and Roger VL. Gender differences in the pathophysiology, clinical presentation, and outcomes of ischemic heart failure. *Current heart failure reports*. 2012;9:267-76.
- 32 Matsui Y, Morimoto J and Uede T. Role of matricellular proteins in cardiac tissue remodeling after myocardial infarction. *World journal of biological chemistry*. 2010;1:69-80.
- 33 McCurdy S, Baicu CF, Heymans S and Bradshaw AD. Cardiac extracellular matrix remodeling: fibrillar collagens and Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC). *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2010;48:544-9.
- 34 Ma Y, de Castro Bras LE, Toba H, Iyer RP, Hall ME, Winniford MD, Lange RA, Tyagi SC and Lindsey ML. Myofibroblasts and the extracellular matrix network in post-myocardial infarction cardiac remodeling. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2014;466:1113-27.
- 35 Frangogiannis NG. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxidants & redox signaling*. 2006;8:1907-39.
- 36 Sutton MG and Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*. 2000;101:2981-8.
- 37 Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y and Heymans S. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovascular research*. 2006;69:604-13.

- 38 Braunwald E. Heart failure. *JACC Heart failure*. 2013;1:1-20.
- 39 Daga LC, Kaul U and Mansoor A. Approach to STEMI and NSTEMI. *The Journal of the Association of Physicians of India*. 2011;59 Suppl:19-25.
- 40 Elashoff MR, Wingrove JA, Beineke P, Daniels SE, Tingley WG, Rosenberg S, Voros S, Kraus WE, Ginsburg GS, Schwartz RS, et al. Development of a blood-based gene expression algorithm for assessment of obstructive coronary artery disease in non-diabetic patients. *BMC medical genomics*. 2011;4:26.
- 41 Wingrove JA, Daniels SE, Sehnert AJ, Tingley W, M. E, Rosenberger S, Buellfeld L, Grube E, Newby LK, Ginsburg GS, et al. Correlation of Peripheral-Blood Gene Expression With the Extent of Coronary Artery Stenosis. *Circ Cardiovasc Genet*. 2008;1:31-38.
- 42 Devaux Y, Azuaje F, Vausort M, Yvorra C and Wagner DR. Integrated protein network and microarray analysis to identify potential biomarkers after myocardial infarction. *Funct Integr Genomics*. 2010;10:329-37.
- 43 Devaux Y, Bousquenaud M, Rodius S, Marie P-Y, Maskali F, Zhang L, Azuaje F and Wagner D. Transforming growth factor beta receptor 1 is a new candidate prognostic biomarker after acute myocardial infarction. *BMC medical genomics*. 2011;4:83.
- 44 Azuaje FJ, Dewey FE, Brutsaert DL, Devaux Y, Ashley EA and Wagner DR. Systems-Based Approaches to Cardiovascular Biomarker Discovery. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2012;5:360-367.
- 45 Goretti E, Wagner DR and Devaux Y. miRNAs as biomarkers of myocardial infarction: a step forward towards personalized medicine? *Trends Mol Med*. 2014;20:716-25.
- 46 Mueller M, Vafaie M, Biener M, Giannitsis E and Katus HA. Cardiac troponin T: from diagnosis of myocardial infarction to cardiovascular risk prediction. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2013;77:1653-61.
- 47 Parmacek MS and Solaro RJ. Biology of the troponin complex in cardiac myocytes. *Progress in cardiovascular diseases*. 2004;47:159-76.
- 48 Giannitsis E, Kurz K, Hallermayer K, Jarausch J, Jaffe AS and Katus HA. Analytical validation of a high-sensitivity cardiac troponin T assay. *Clin Chem*. 2010;56:254-61.
- 49 Reichlin T, Hochholzer W, Bassetti S, Steuer S, Stelzig C, Hartwiger S, Biedert S, Schaub N, Buergel C, Potocki M, et al. Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. *The New England journal of medicine*. 2009;361:858-67.
- 50 Chan D and Ng LL. Biomarkers in acute myocardial infarction. *BMC medicine*. 2010;8:34.
- 51 Danchin N, Durand E, Decalf V and Chaib A. [Risk stratification of acute coronary syndromes]. *Annales de cardiologie et d'angiologie*. 2007;56 Suppl 1:S16-20.

- 52 Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *The New England journal of medicine*. 2008;358:2148-59.
- 53 Jourdain P, Lefevre G, Oddoze C, Sapin V, Dievert F, Jondeau G, Meune C and Galinier M. [NT-proBNP in practice: from chemistry to medicine]. *Annales de cardiologie et d'angiologie*. 2009;58:165-79.
- 54 Authors/Task Force M, Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP, Lundqvist CB, Borger MA, Di Mario C, Dickstein K, Ducrocq G, 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). *European heart journal*. 2012;33:2569-619.
- 55 Hrynchyshyn N, Jourdain P, Desnos M, Diebold B and Funck F. Galectin-3: a new biomarker for the diagnosis, analysis and prognosis of acute and chronic heart failure. *Archives of cardiovascular diseases*. 2013;106:541-6.
- 56 Jiang H, Zhang L, Yu Y, Liu M, Jin X, Zhang P, Yu P, Zhang S, Zhu H, Chen R, et al. A pilot study of angiogenin in heart failure with preserved ejection fraction: a novel potential biomarker for diagnosis and prognosis? *Journal of cellular and molecular medicine*. 2014;18:2189-97.
- 57 Gruson D, Buglioni A and Burnett JC, Jr. PTH: Potential role in management of heart failure. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2014;433:290-6.
- 58 Zhu F, Shi Z, Qin C, Tao L, Liu X, Xu F, Zhang L, Song Y, Liu X, Zhang J, et al. Therapeutic target database update 2012: a resource for facilitating target-oriented drug discovery. *Nucleic acids research*. 2012;40:D1128-36.
- 59 Rajagopalan S and Pitt B. Aldosterone antagonists in the treatment of hypertension and target organ damage. *Current hypertension reports*. 2001;3:240-8.
- 60 Stier CT, Jr., Chander PN and Rocha R. Aldosterone as a mediator in cardiovascular injury. *Cardiology in review*. 2002;10:97-107.
- 61 Bicket DP. Using ACE inhibitors appropriately. *American family physician*. 2002;66:461-8.
- 62 Spencer FA and Becker RC. Novel inhibitors of factor X for use in cardiovascular diseases. *Current cardiology reports*. 2000;2:395-404.
- 63 Lal H, Ahmad F, Woodgett J and Force T. The GSK-3 family as therapeutic target for myocardial diseases. *Circulation research*. 2015;116:138-49.

- 64 Jessup M, Greenberg B, Mancini D, Cappola T, Pauly DF, Jaski B, Yaroshinsky A, Zsebo KM, Dittrich H, Hajjar RJ, et al. Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation*. 2011;124:304-13.
- 65 Penn MS, Mendelsohn FO, Schaer GL, Sherman W, Farr M, Pastore J, Rouy D, Clemens R, Aras R and Losordo DW. An open-label dose escalation study to evaluate the safety of administration of nonviral stromal cell-derived factor-1 plasmid to treat symptomatic ischemic heart failure. *Circulation research*. 2013;112:816-25.
- 66 Wolfram JA and Donahue JK. Gene therapy to treat cardiovascular disease. *Journal of the American Heart Association*. 2013;2:e000119.
- 67 Prazeres DM, Ferreira GN, Monteiro GA, Cooney CL and Cabral JM. Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks. *Trends in biotechnology*. 1999;17:169-74.
- 68 Buchlis G, Podsakoff GM, Radu A, Hawk SM, Flake AW, Mingozi F and High KA. Factor IX expression in skeletal muscle of a severe hemophilia B patient 10 years after AAV-mediated gene transfer. *Blood*. 2012;119:3038-41.
- 69 Kass-Eisler A, Falck-Pedersen E, Alvira M, Rivera J, Buttrick PM, Wittenberg BA, Cipriani L and Leinwand LA. Quantitative determination of adenovirus-mediated gene delivery to rat cardiac myocytes in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90:11498-502.
- 70 Donahue JK, Kikkawa K, Thomas AD, Marban E and Lawrence JH. Acceleration of widespread adenoviral gene transfer to intact rabbit hearts by coronary perfusion with low calcium and serotonin. *Gene therapy*. 1998;5:630-4.
- 71 Kikuchi K, McDonald AD, Sasano T and Donahue JK. Targeted modification of atrial electrophysiology by homogeneous transmural atrial gene transfer. *Circulation*. 2005;111:264-70.
- 72 Comings DE. The structure and function of chromatin. *Advances in human genetics*. 1972;3:237-431.
- 73 Erdmann VA, Szymanski M, Hochberg A, de Groot N and Barciszewski J. Collection of mRNA-like non-coding RNAs. *Nucleic acids research*. 1999;27:192-5.
- 74 Consortium EP, Dunham I, Kundaje A, Aldred SF, Collins PJ, Davis CA, Doyle F, Epstein CB, Frietze S, Harrow J, et al. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012;489:57-74.
- 75 Mercer TR, Dinger ME and Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*. 2009;10:155-9.

- 76 Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435:834-8.
- 77 Swaminathan G, Navas-Martin S and Martin-Garcia J. MicroRNAs and HIV-1 infection: antiviral activities and beyond. *Journal of molecular biology*. 2014;426:1178-97.
- 78 Maciotta S, Meregalli M and Torrente Y. The involvement of microRNAs in neurodegenerative diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2013;7:265.
- 79 Thum T, Catalucci D and Bauersachs J. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovascular research*. 2008;79:562-70.
- 80 Bronze-da-Rocha E. MicroRNAs expression profiles in cardiovascular diseases. *BioMed research international*. 2014;2014:985408.
- 81 Sibley CR, Seow Y, Saayman S, Dijkstra KK, El Andaloussi S, Weinberg MS and Wood MJ. The biogenesis and characterization of mammalian microRNAs of mirtron origin. *Nucleic acids research*. 2012;40:438-48.
- 82 Vasudevan S, Tong Y and Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*. 2007;318:1931-4.
- 83 Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI and Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology*. 2009;11:228-34.
- 84 Mall C, Rocke DM, Durbin-Johnson B and Weiss RH. Stability of miRNA in human urine supports its biomarker potential. *Biomarkers in medicine*. 2013;7:623-31.
- 85 Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:10513-8.
- 86 Winter J and Diederichs S. Argonaute proteins regulate microRNA stability: Increased microRNA abundance by Argonaute proteins is due to microRNA stabilization. *RNA biology*. 2011;8:1149-57.
- 87 Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108:5003-8.
- 88 Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD and Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology*. 2011;13:423-33.

- 89 Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan ML, Karlsson JM, Baty CJ, Gibson GA, Erdos G, Wang Z, et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*. 2012;119:756-66.
- 90 Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS ONE*. 2008;3:e3694.
- 91 Zerneck A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, Hristov M, Koppel T, Jahantigh MN, Lutgens E, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Science signaling*. 2009;2:ra81.
- 92 Gilad S, Meiri E, Yogeve Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholakh H, Melamed N, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One*. 2008;3:e3148.
- 93 Caroli A, Cardillo MT, Galea R and Biasucci LM. Potential therapeutic role of microRNAs in ischemic heart disease. *Journal of cardiology*. 2013;61:315-20.
- 94 Montgomery RL and van Rooij E. Therapeutic advances in MicroRNA targeting. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2011;57:1-7.
- 95 Grunweller A and Hartmann RK. Locked nucleic acid oligonucleotides: the next generation of antisense agents? *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2007;21:235-43.
- 96 van Rooij E, Marshall WS and Olson EN. Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense. *Circulation research*. 2008;103:919-28.
- 97 Dangwal S and Thum T. microRNA therapeutics in cardiovascular disease models. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2014;54:185-203.
- 98 Ebert MS, Neilson JR and Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nature methods*. 2007;4:721-6.
- 99 Amaral PP, Clark MB, Gascoigne DK, Dinger ME and Mattick JS. lncRNADB: a reference database for long noncoding RNAs. *Nucleic acids research*. 2011;39:D146-51.
- 100 Xie C, Yuan J, Li H, Li M, Zhao G, Bu D, Zhu W, Wu W, Chen R and Zhao Y. NONCODEv4: exploring the world of long non-coding RNA genes. *Nucleic acids research*. 2014;42:D98-103.
- 101 Guo H, Ingolia NT, Weissman JS and Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010;466:835-840.
- 102 Ma L, Bajic VB and Zhang Z. On the classification of long non-coding RNAs. *RNA biology*. 2013;10:925-33.

- 103 Pang KC, Frith MC and Mattick JS. Rapid evolution of noncoding RNAs: lack of conservation does not mean lack of function. *Trends in genetics : TIG*. 2006;22:1-5.
- 104 Khalil AM, Guttman M, Huarte M, Garber M, Raj A, Rivea Morales D, Thomas K, Presser A, Bernstein BE, van Oudenaarden A, et al. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106:11667-72.
- 105 Yoon JH, Abdelmohsen K, Srikantan S, Yang X, Martindale JL, De S, Huarte M, Zhan M, Becker KG and Gorospe M. LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation. *Molecular cell*. 2012;47:648-55.
- 106 Kapranov P, Cheng J, Dike S, Nix DA, Dutttagupta R, Willingham AT, Stadler PF, Hertel J, Hackermuller J, Hofacker IL, et al. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science*. 2007;316:1484-8.
- 107 Romito A and Rougeulle C. Origin and evolution of the long non-coding genes in the X-inactivation center. *Biochimie*. 2011;93:1935-42.
- 108 Mancini-Dinardo D, Steele SJ, Levorse JM, Ingram RS and Tilghman SM. Elongation of the Kcnq1ot1 transcript is required for genomic imprinting of neighboring genes. *Genes & development*. 2006;20:1268-82.
- 109 Pandey RR, Mondal T, Mohammad F, Enroth S, Redrup L, Komorowski J, Nagano T, Mancini-Dinardo D and Kanduri C. Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Molecular cell*. 2008;32:232-46.
- 110 Peters AH, Kubicek S, Mechtler K, O'Sullivan RJ, Derijck AA, Perez-Burgos L, Kohlmaier A, Opravil S, Tachibana M, Shinkai Y, et al. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Molecular cell*. 2003;12:1577-89.
- 111 Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A and Pirrotta V. Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell*. 2002;111:185-96.
- 112 Mohammad F, Pandey GK, Mondal T, Enroth S, Redrup L, Gyllensten U and Kanduri C. Long noncoding RNA-mediated maintenance of DNA methylation and transcriptional gene silencing. *Development*. 2012;139:2792-803.
- 113 Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*. 2007;129:1311-23.
- 114 Schorderet P and Duboule D. Structural and functional differences in the long non-coding RNA hotair in mouse and human. *PLoS genetics*. 2011;7:e1002071.

- 115 Huarte M, Guttman M, Feldser D, Garber M, Koziol MJ, Kenzelmann-Broz D, Khalil AM, Zuk O, Amit I, Rabani M, et al. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell*. 2010;142:409-19.
- 116 Swiezewski S, Liu F, Magusin A and Dean C. Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an Arabidopsis Polycomb target. *Nature*. 2009;462:799-802.
- 117 Matera AG, Izaguirre-Sierra M, Praveen K and Rajendra TK. Nuclear bodies: random aggregates of sticky proteins or crucibles of macromolecular assembly? *Developmental cell*. 2009;17:639-47.
- 118 Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ and Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet*. 2008;40:1413-5.
- 119 Ji P, Diederichs S, Wang W, Boing S, Metzger R, Schneider PM, Tidow N, Brandt B, Buerger H, Bulk E, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2003;22:8031-41.
- 120 Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT, Freier SM, Bennett CF, Sharma A, Bubulya PA, et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Molecular cell*. 2010;39:925-38.
- 121 Azzalin CM, Reichenbach P, Khoriantuli L, Giulotto E and Lingner J. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science*. 2007;318:798-801.
- 122 Redon S, Reichenbach P and Lingner J. The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucleic acids research*. 2010;38:5797-806.
- 123 Porro A, Feuerhahn S, Reichenbach P and Lingner J. Molecular dissection of telomeric repeat-containing RNA biogenesis unveils the presence of distinct and multiple regulatory pathways. *Mol Cell Biol*. 2010;30:4808-17.
- 124 Wang K, Liu F, Zhou LY, Long B, Yuan SM, Wang Y, Liu CY, Sun T, Zhang XJ and Li PF. The long noncoding RNA CHRF regulates cardiac hypertrophy by targeting miR-489. *Circulation research*. 2014;114:1377-88.
- 125 Grote P and Herrmann BG. The long non-coding RNA Fendrr links epigenetic control mechanisms to gene regulatory networks in mammalian embryogenesis. *RNA biology*. 2013;10:1579-85.
- 126 Feng J, Bi C, Clark BS, Mady R, Shah P and Kohtz JD. The Evf-2 noncoding RNA is transcribed from the Dlx-5/6 ultraconserved region and functions as a Dlx-2 transcriptional coactivator. *Genes & development*. 2006;20:1470-84.



- 127 Aguiló F, Zhou MM and Walsh MJ. Long noncoding RNA, polycomb, and the ghosts haunting INK4b-ARF-INK4a expression. *Cancer research*. 2011;71:5365-9.
- 128 Kim TK, Hemberg M, Gray JM, Costa AM, Bear DM, Wu J, Harmin DA, Laptewicz M, Barbara-Haley K, Kuersten S, et al. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature*. 2010;465:182-7.
- 129 Natoli G and Andrau JC. Noncoding transcription at enhancers: general principles and functional models. *Annual review of genetics*. 2012;46:1-19.
- 130 Li W, Notani D, Ma Q, Tanasa B, Nunez E, Chen AY, Merkurjev D, Zhang J, Ohgi K, Song X, et al. Functional roles of enhancer RNAs for oestrogen-dependent transcriptional activation. *Nature*. 2013;498:516-20.
- 131 Xiang JF, Yin QF, Chen T, Zhang Y, Zhang XO, Wu Z, Zhang S, Wang HB, Ge J, Lu X, et al. Human colorectal cancer-specific CCAT1-L lncRNA regulates long-range chromatin interactions at the MYC locus. *Cell research*. 2014;24:513-31.
- 132 Ounzain S, Pezzuto I, Micheletti R, Burdet F, Sheta R, Nemir M, Gonzales C, Sarre A, Alexanian M, Blow MJ, et al. Functional importance of cardiac enhancer-associated noncoding RNAs in heart development and disease. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2014;76C:55-70.
- 133 Ounzain S and Pedrazzini T. The promise of enhancer-associated long noncoding RNAs in cardiac regeneration. *Trends in cardiovascular medicine*. 2015.
- 134 Lam MT, Li W, Rosenfeld MG and Glass CK. Enhancer RNAs and regulated transcriptional programs. *Trends in biochemical sciences*. 2014;39:170-82.
- 135 Sasaki YT, Ideue T, Sano M, Mituyama T and Hirose T. MENepsilon/beta noncoding RNAs are essential for structural integrity of nuclear paraspeckles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106:2525-30.
- 136 Hirose T, Virnicchi G, Tanigawa A, Naganuma T, Li R, Kimura H, Yokoi T, Nakagawa S, Benard M, Fox AH, et al. NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies. *Molecular biology of the cell*. 2014;25:169-83.
- 137 Sone M, Hayashi T, Tarui H, Agata K, Takeichi M and Nakagawa S. The mRNA-like noncoding RNA Gomafu constitutes a novel nuclear domain in a subset of neurons. *Journal of cell science*. 2007;120:2498-506.
- 138 Orozco AF and Lewis DE. Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2010;77:502-14.
- 139 Record M, Subra C, Silvente-Poirot S and Poirot M. Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochemical pharmacology*. 2011;81:1171-82.

- 140 Reis EM and Verjovski-Almeida S. Perspectives of Long Non-Coding RNAs in Cancer Diagnostics. *Frontiers in genetics*. 2012;3:32.
- 141 Shappell SB. Clinical utility of prostate carcinoma molecular diagnostic tests. *Reviews in urology*. 2008;10:44-69.
- 142 Panzitt K, Tschernatsch MM, Guelly C, Moustafa T, Stradner M, Strohmaier HM, Buck CR, Denk H, Schroeder R, Trauner M, et al. Characterization of HULC, a novel gene with striking up-regulation in hepatocellular carcinoma, as noncoding RNA. *Gastroenterology*. 2007;132:330-42.
- 143 Scheen AJ. [Pharmacokinetics of insulin administered subcutaneously. Application to treatment by portable pump (1)]. *Diabete & metabolisme*. 1989;15:128-38.
- 144 Ferla R, Claudiani P, Cotugno G, Saccone P, De Leonibus E and Auricchio A. Similar therapeutic efficacy between a single administration of gene therapy and multiple administrations of recombinant enzyme in a mouse model of lysosomal storage disease. *Human gene therapy*. 2014;25:609-18.
- 145 Waehler R, Russell SJ and Curiel DT. Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*. 2007;8:573-87.
- 146 Wahlestedt C. Targeting long non-coding RNA to therapeutically upregulate gene expression. *Nature reviews Drug discovery*. 2013;12:433-46.
- 147 Wahlestedt C. Natural antisense and noncoding RNA transcripts as potential drug targets. *Drug discovery today*. 2006;11:503-8.
- 148 Lee JE, Bennett CF and Cooper TA. RNase H-mediated degradation of toxic RNA in myotonic dystrophy type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109:4221-6.
- 149 Lloyd A. Vector construction for gene overexpression as a tool to elucidate gene function. *Methods in molecular biology*. 2003;236:329-44.
- 150 Zacchigna S, Zentilin L and Giacca M. Adeno-associated virus vectors as therapeutic and investigational tools in the cardiovascular system. *Circulation research*. 2014;114:1827-46.
- 151 Kozomara A and Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research*. 2014;42:D68-73.
- 152 Bernstein E, Kim S, Carmell M, Murchison E, Alcorn H, Li M, Mills A, Elledge S, Anderson K and Hannon G. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*. 2003;35:215 - 217.
- 153 Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, Tsuchihashi T, McManus MT, Schwartz RJ and Srivastava D. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*. 2007;129:303-17.

- 154 da Costa Martins PA, Bourajjaj M, Gladka M, Kortland M, van Oort RJ, Pinto YM, Molkentin JD and De Windt LJ. Conditional *dicer* gene deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling. *Circulation*. 2008;118:1567-76.
- 155 Heidersbach A, Saxby C, Carver-Moore K, Huang Y, Ang YS, de Jong PJ, Ivey KN and Srivastava D. microRNA-1 regulates sarcomere formation and suppresses smooth muscle gene expression in the mammalian heart. *eLife*. 2013;2:e01323.
- 156 Wei Y, Peng S, Wu M, Sachidanandam R, Tu Z, Zhang S, Falce C, Sobie EA, Lebeche D and Zhao Y. Multifaceted roles of miR-1s in repressing the fetal gene program in the heart. *Cell research*. 2014;24:278-92.
- 157 van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Kelm RJ, Jr. and Olson EN. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Developmental cell*. 2009;17:662-73.
- 158 van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J and Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*. 2007;316:575-9.
- 159 Rao PK, Toyama Y, Chiang HR, Gupta S, Bauer M, Medvid R, Reinhardt F, Liao R, Krieger M, Jaenisch R, et al. Loss of cardiac microRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circulation research*. 2009;105:585-94.
- 160 Eulalio A, Mano M, Dal Ferro M, Zentilin L, Sinagra G, Zacchigna S and Giacca M. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature*. 2012;492:376-81.
- 161 Meder B, Keller A, Vogel B, Haas J, Sedaghat-Hamedani F, Kayvanpour E, Just S, Borries A, Rudloff J, Leidinger P, et al. MicroRNA signatures in total peripheral blood as novel biomarkers for acute myocardial infarction. *Basic research in cardiology*. 2011;106:13-23.
- 162 Cheng Y, Tan N, Yang J, Liu X, Cao X, He P, Dong X, Qin S and Zhang C. A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. *Clinical science*. 2010;119:87-95.
- 163 Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, Nishimura K, Hirokawa G, Goto Y, Nonogi H and Iwai N. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin Chem*. 2010;56:1183-5.
- 164 Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen JA, Heymans S and Schroen B. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010;3:499-506.
- 165 Devaux Y, Vausort M, Goretti E, Nazarov PV, Azuaje F, Gilson G, Corsten MF, Schroen B, Lair ML, Heymans S, et al. Use of Circulating MicroRNAs to Diagnose Acute Myocardial Infarction. *Clin Chem*. 2012;58:559-67.

- 166 Bostjancic E, Zidar N, Stajer D and Glavac D. MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction. *Cardiology*. 2010;115:163-9.
- 167 Ji X, Takahashi R, Hiura Y, Hirokawa G, Fukushima Y and Iwai N. Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem*. 2009;55:1944-9.
- 168 Ward JA, Esa N, Pidikiti R, Freedman JE, Keaney JF, Tanriverdi K, Vitseva O, Ambros V, Lee R and McManus DD. Circulating Cell and Plasma microRNA Profiles Differ between Non-ST-Segment and ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction. *Family medicine & medical science research*. 2013;2:108.
- 169 Li YQ, Zhang MF, Wen HY, Hu CL, Liu R, Wei HY, Ai CM, Wang G, Liao XX and Li X. Comparing the diagnostic values of circulating microRNAs and cardiac troponin T in patients with acute myocardial infarction. *Clinics*. 2013;68:75-80.
- 170 Weber M, Baker MB, Moore JP and Searles CD. MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;393:643-8.
- 171 Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT and Lowenstein CJ. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:1516-21.
- 172 Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuffi AG, Pepys MB and Maseri A. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *The New England journal of medicine*. 1994;331:417-24.
- 173 Nazari-Jahantigh M, Wei Y, Noels H, Akhtar S, Zhou Z, Koenen RR, Heyll K, Gremse F, Kiessling F, Grommes J, et al. MicroRNA-155 promotes atherosclerosis by repressing Bcl6 in macrophages. *J Clin Invest*. 2012;122:4190-202.
- 174 Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ and Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103:12481-6.
- 175 Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, Lee TH, Miano JM, Ivey KN and Srivastava D. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*. 2009;460:705-10.
- 176 Liu X, Cheng Y, Zhang S, Lin Y, Yang J and Zhang C. A necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Circulation research*. 2009;104:476-87.
- 177 Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev K, Tuschl T, Manoharan M and Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*. 2005;438:685 - 689.

- 178 Wang K, Liu F, Zhou LY, Ding SL, Long B, Liu CY, Sun T, Fan YY, Sun L and Li PF. miR-874 regulates myocardial necrosis by targeting caspase-8. *Cell death & disease*. 2013;4:e709.
- 179 Small EM and Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature*. 2011;469:336-42.
- 180 Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW, Doevendans PA, Mummery CL, Borlak J, Haverich A, et al. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation*. 2007;116:258-67.
- 181 Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*. 2008;456:980-4.
- 182 Montgomery RL, Hullinger TG, Semus HM, Dickinson BA, Seto AG, Lynch JM, Stack C, Latimer PA, Olson EN and van Rooij E. Therapeutic Inhibition of miR-208a Improves Cardiac Function and Survival During Heart Failure / Clinical Perspective. *Circulation*. 2011;124:1537-1547.
- 183 Seok HY, Chen J, Kataoka M, Huang ZP, Ding J, Yan J, Hu X and Wang DZ. Loss of MicroRNA-155 protects the heart from pathological cardiac hypertrophy. *Circulation research*. 2014;114:1585-95.
- 184 Fiedler J, Jazbutyte V, Kirchmaier BC, Gupta SK, Lorenzen J, Hartmann D, Galuppo P, Kneitz S, Pena JT, Sohn-Lee C, et al. MicroRNA-24 regulates vascularity after myocardial infarction. *Circulation*. 2011;124:720-30.
- 185 Lewis BP, Burge CB and Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120:15-20.
- 186 Hullinger TG, Montgomery RL, Seto AG, Dickinson BA, Semus HM, Lynch JM, Dalby CM, Robinson K, Stack C, Latimer PA, et al. Inhibition of miR-15 protects against cardiac ischemic injury. *Circulation research*. 2012;110:71-81.
- 187 Bernardo BC, Gao X-M, Winbanks CE, Boey EJH, Tham YK, Kiriazis H, Gregorevic P, Obad S, Kauppinen S, Du X-J, et al. 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.
- 188 Goretti E, Zangrando J, Wagner DR and Devaux Y. Unity is strength - A panel of 4 microRNAs decreases cardiomyocyte hypertrophy. *International journal of cardiology*. 2015;182:62-4.
- 189 Hinkel R, Penzkofer D, Zuhlke S, Fischer A, Husada W, Xu QF, Baloch E, van Rooij E, Zeiher AM, Kupatt C, et al. Inhibition of MicroRNA-92a Protects Against Ischemia/Reperfusion Injury in a Large-Animal Model. *Circulation*. 2013;128:1066-1075.

- 190 Miyata S, Minobe W, Bristow MR and Leinwand LA. Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circulation research*. 2000;86:386-90.
- 191 van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA and Olson EN. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103:18255-60.
- 192 Sucharov C, Bristow MR and Port JD. miRNA expression in the failing human heart: functional correlates. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2008;45:185-92.
- 193 Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE and Pinto YM. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circulation research*. 2010;106:1035-9.
- 194 Yue F, Cheng Y, Breschi A, Vierstra J, Wu W, Ryba T, Sandstrom R, Ma Z, Davis C, Pope BD, et al. A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature*. 2014;515:355-64.
- 195 Wu H, Nord AS, Akiyama JA, Shoukry M, Afzal V, Rubin EM, Pennacchio LA and Visel A. Tissue-specific RNA expression marks distant-acting developmental enhancers. *PLoS genetics*. 2014;10:e1004610.
- 196 Klattenhoff CA, Scheuermann JC, Surface LE, Bradley RK, Fields PA, Steinhauser ML, Ding H, Butty VL, Torrey L, Haas S, et al. Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment. *Cell*. 2013;152:570-83.
- 197 Korostowski L, Sedlak N and Engel N. The Kcnq1ot1 Long Non-Coding RNA Affects Chromatin Conformation and Expression of Kcnq1, but Does Not Regulate Its Imprinting in the Developing Heart. *PLoS genetics*. 2012;8:e1002956.
- 198 Ishii N, Ozaki K, Sato H, Mizuno H, Saito S, Takahashi A, Miyamoto Y, Ikegawa S, Kamatani N, Hori M, et al. Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction. *Journal of human genetics*. 2006;51:1087-99.
- 199 Sheik Mohamed J, Gaughwin PM, Lim B, Robson P and Lipovich L. Conserved long noncoding RNAs transcriptionally regulated by Oct4 and Nanog modulate pluripotency in mouse embryonic stem cells. *RNA*. 2010;16:324-37.
- 200 Aprea J, Prenninger S, Dori M, Ghosh T, Monasor LS, Wessendorf E, Zocher S, Massalini S, Alexopoulou D, Lesche M, et al. Transcriptome sequencing during mouse brain development identifies long non-coding RNAs functionally involved in neurogenic commitment. *EMBO J*. 2013;32:3145-60.
- 201 Vausort M, Wagner DR and Devaux Y. Long noncoding RNAs in patients with acute myocardial infarction. *Circulation research*. 2014;115:668-77.

- 202 Zolk O, Solbach TF, Eschenhagen T, Weidemann A and Fromm MF. Activation of negative regulators of the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in human end-stage heart failure. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;376:315-320.
- 203 Yap KL, Li S, Munoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, Gil J, Walsh MJ and Zhou MM. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Molecular cell*. 2010;38:662-74.
- 204 McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, Hinds DA, Pennacchio LA, Tybjaerg-Hansen A, Folsom AR, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science*. 2007;316:1488-91.
- 205 Consortium CAD, Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, Farrall M, Assimes TL, Thompson JR, Ingelsson E, Saleheen D, Erdmann J, et al. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet*. 2013;45:25-33.
- 206 Bochenek G, Hasler R, El Mokthari NE, Konig IR, Loos BG, Rosenstiel P, Schreiber S and Schaefer AS. The Large Non-coding RNA ANRIL, which is Associated with Atherosclerosis, Periodontitis, and Several Forms of Cancer, regulates ADIPOR1, VAMP3, and C11ORF10. *Human molecular genetics*. 2013.
- 207 Bokil NJ, Baisden JM, Radford DJ and Summers KM. Molecular genetics of long QT syndrome. *Mol Genet Metab*. 2010;101:1-8.
- 208 Liu Y, Li G, Lu H, Li W, Li X, Liu H, Li X, Li T and Yu B. Expression profiling and ontology analysis of long noncoding RNAs in post-ischemic heart and their implied roles in ischemia/reperfusion injury. *Gene*. 2014;543:15-21.
- 209 Wang K, Long B, Zhou LY, Liu F, Zhou QY, Liu CY, Fan YY and Li PF. CARL lncRNA inhibits anoxia-induced mitochondrial fission and apoptosis in cardiomyocytes by impairing miR-539-dependent PHB2 downregulation. *Nature communications*. 2014;5:3596.
- 210 Li D, Chen G, Yang J, Fan X, Gong Y, Xu G, Cui Q and Geng B. Transcriptome analysis reveals distinct patterns of long noncoding RNAs in heart and plasma of mice with heart failure. *PLoS One*. 2013;8:e77938.
- 211 Yang KC, Yamada KA, Patel AY, Topkara VK, George I, Cheema FH, Ewald GA, Mann DL and Nerbonne JM. Deep RNA Sequencing Reveals Dynamic Regulation of Myocardial Noncoding RNA in Failing Human Heart and Remodeling with Mechanical Circulatory Support. *Circulation*. 2014;129:1009-1021.
- 212 Huang X, Yuan T, Tschannen M, Sun Z, Jacob H, Du M, Liang M, Dittmar RL, Liu Y, Liang M, et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC genomics*. 2013;14:319.

- 213 Han P, Li W, Lin CH, Yang J, Shang C, Nurnberg ST, Jin KK, Xu W, Lin CY, Lin CJ, et al. A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy. *Nature*. 2014;514:102-6.
- 214 Bell RD, Long X, Lin M, Bergmann JH, Nanda V, Cowan SL, Zhou Q, Han Y, Spector DL, Zheng D, et al. Identification and initial functional characterization of a human vascular cell-enriched long noncoding RNA. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34:1249-59.
- 215 Thum T and Kumarswamy R. The smooth long noncoding RNA SENCR. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34:1124-5.
- 216 Michalik KM, You X, Manavski Y, Doddaballapur A, Zornig M, Braun T, John D, Ponomareva Y, Chen W, Uchida S, et al. Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth. *Circulation research*. 2014;114:1389-97.
- 217 Kelly D, Cockerill G, Ng LL, Thompson M, Khan S, Samani NJ and Squire IB. Plasma matrix metalloproteinase-9 and left ventricular remodelling after acute myocardial infarction in man: a prospective cohort study. *European heart journal*. 2007;28:711-8.
- 218 Virag JA and Lust RM. Coronary artery ligation and intramyocardial injection in a murine model of infarction. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2011.
- 219 Segall G. Assessment of myocardial viability by positron emission tomography. *Nucl Med Commun*. 2002;23:323-30.
- 220 Slart RH, Bax JJ, van Veldhuisen DJ, van der Wall EE, Dierckx RA and Jager PL. Imaging techniques in nuclear cardiology for the assessment of myocardial viability. *The international journal of cardiovascular imaging*. 2006;22:63-80.
- 221 Phelps ME, Hoffman EJ, Mullani NA and Ter-Pogossian MM. Application of annihilation coincidence detection to transaxial reconstruction tomography. *J Nucl Med*. 1975;16:210-24.
- 222 Knuuti MJ, Yki-Jarvinen H, Voipio-Pulkki LM, Maki M, Ruotsalainen U, Harkonen R, Teras M, Haaparanta M, Bergman J, Hartiala J, et al. Enhancement of myocardial [fluorine-18]fluorodeoxyglucose uptake by a nicotinic acid derivative. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1994;35:989-98.
- 223 Bousquenaud M, Maskali F, Poussier S, Marie PY, Boutley H, Karcher G, Wagner DR and Devaux Y. Acipimox-enhanced (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for characterizing and predicting early remodeling in the rat infarct model. *The international journal of cardiovascular imaging*. 2012;28:1407-1415.



- 224 Cerqueira MD, Weissman NJ, Dilsizian V, Jacobs AK, Kaul S, Laskey WK, Pennell DJ, Rumberger JA, Ryan T and Verani MS. Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart: a statement for healthcare professionals from the Cardiac Imaging Committee of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association. *Circulation*. 2002;105:539-42.
- 225 Haaf P, Drexler B, Reichlin T, Twerenbold R, Reiter M, Meissner J, Schaub N, Stelzig C, Freese M, Heinzelmann A, et al. High-sensitivity cardiac troponin in the distinction of acute myocardial infarction from acute cardiac noncoronary artery disease. *Circulation*. 2012;126:31-40.
- 226 Salic K and De Windt LJ. MicroRNAs as biomarkers for myocardial infarction. *Current atherosclerosis reports*. 2012;14:193-200.
- 227 Talwar S, Squire IB, Downie PF, McCullough AM, Campton MC, Davies JE, Barnett DB and Ng LL. Profile of plasma N-terminal proBNP following acute myocardial infarction; correlation with left ventricular systolic dysfunction. *European heart journal*. 2000;21:1514-21.
- 228 Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypowy J and Abdellatif M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circulation research*. 2007;100:416-24.
- 229 D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, Rubino M, Carena MC, Spazzafumo L, De Simone M, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *European heart journal*. 2010;31:2765-73.
- 230 Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM, Bang C, Bauersachs J, Bethmann K, Kempf T, Wollert KC and Thum T. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2011;51:872-875.
- 231 Gidlof O, Smith JG, Miyazu K, Gilje P, Spencer A, Blomquist S and Erlinge D. Circulating cardio-enriched microRNAs are associated with long-term prognosis following myocardial infarction. *BMC cardiovascular disorders*. 2013;13:12.
- 232 Thygesen K, Alpert JS, White HD, Jaffe AS, Apple FS, Galvani M, Katus HA, Newby LK, Ravkilde J, Chaitman B, et al. Universal definition of myocardial infarction. *Circulation*. 2007;116:2634-53.
- 233 Matsumoto S, Sakata Y, Nakatani D, Suna S, Mizuno H, Shimizu M, Usami M, Sasaki T, Sato H, Kawahara Y, et al. A subset of circulating microRNAs are predictive for cardiac death after discharge for acute myocardial infarction. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;427:280-4.
- 234 Sadiq ST and Agranoff D. Pooling serum samples may lead to loss of potential biomarkers in SELDI-ToF MS proteomic profiling. *Proteome science*. 2008;6:16.
- 235 Zidar N, Bostjancic E, Glavac D and Stajer D. MicroRNAs, innate immunity and ventricular rupture in human myocardial infarction. *Disease markers*. 2011;31:259-65.

- 236 Liu Z, Ye P, Wang S, Wu J, Sun Y, Zhang A, Ren L, Cheng C, Huang X, Wang K, et al. MicroRNA-150 protects the heart from injury by inhibiting monocyte accumulation in a mouse model of acute myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Genet*. 2015;8:11-20.
- 237 Tang Y, Wang Y, Park KM, Hu Q, Teoh JP, Broskova Z, Ranganathan P, Jayakumar C, Li J, Su H, et al. MicroRNA-150 protects the mouse heart from ischaemic injury by regulating cell death. *Cardiovascular research*. 2015;106:387-97.
- 238 Hsu A, Chen SJ, Chang YS, Chen HC and Chu PH. Systemic approach to identify serum microRNAs as potential biomarkers for acute myocardial infarction. *BioMed research international*. 2014;2014:418628.
- 239 Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, Sun F, Lu J, Yin Y, Cai X, et al. Secreted Monocytic miR-150 Enhances Targeted Endothelial Cell Migration. *Molecular cell*. 2010;39:133-144.
- 240 Poussier S, Maskali F, Tran N, Person C, Maureira P, Boutley H, Karcher G, Lacolley P, Regnault V, Fay R, et al. ECG-triggered (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging of the rat heart is dramatically enhanced by acipimox. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2010;37:1745-1750.
- 241 Motiwala SR, Szymonifka J, Belcher A, Weiner RB, Baggish AL, Sluss P, Gaggin HK, Bhardwaj A and Januzzi JL. Serial measurement of galectin-3 in patients with chronic heart failure: results from the ProBNP Outpatient Tailored Chronic Heart Failure Therapy (PROTECT) study. *European journal of heart failure*. 2013;15:1157-1163.

# Annexes

## **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.* 2015; 277(2):260-71.

## **MicroRNA-150: a novel marker of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction.**

Devaux Y, Vausort M, McCann GP, Zangrando J, Kelly D, Razvi N, Zhang L, Ng LL, Wagner DR, Squire IB.

*Circ Cardiovasc Genet.* 2013; 6(3):290-8.

## **Identification of candidate long non-coding RNAs in response to myocardial infarction.**

Zangrando J, Zhang L, Vausort M, Maskali F, Marie PY, Wagner DR, Devaux Y.

*BMC Genomics.* 2014; 15:460.

## **Long noncoding RNAs in cardiac development and ageing.**

Devaux Y, Zangrando J, Schroen B, Creemers E, Pedrazzini T, Chang CP, Dorn II G, Thum T, Heymans S.

*Nat Rev Cardiol.* 2015; (sous presse)

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

■ Y. Devaux<sup>1,\*</sup>, M. Mueller<sup>2,\*</sup>, P. Haaf<sup>2,\*</sup>, E. Goretti<sup>1</sup>, R. Twerenbold<sup>2</sup>, J. Zangrando<sup>1</sup>, M. Vausort<sup>1</sup>, T. Reichlin<sup>2</sup>, K. Wildi<sup>2</sup>, B. Moehring<sup>2</sup>, D. R. Wagner<sup>1,3</sup> & C. Mueller<sup>2</sup>

From the<sup>1</sup>Laboratory of Cardiovascular Research, Centre de Recherche Public de la Santé, Luxembourg, Luxembourg; <sup>2</sup>Department of Cardiology, University Hospital Basel, Basel, Switzerland; and <sup>3</sup>Department 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* 2015; **277**: 260–271.

**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*

AdvantageoushePredictorsofAcuteCoronarySyndromeEvaluation(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  $\geq 14$  ng L<sup>-1</sup> 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  $-80^\circ\text{C}$  until assayed in a blinded fashion in a dedicated core laboratory. hs-cTnT was assayed in serum in a blinded fashion using the Modular<sup>®</sup> Analytics E170 analyser (Roche Diagnostics). It has been determined that the limit of blank and limit of detection of hs-cTnT are 3 and  $5\text{ ng L}^{-1}$ , respectively, with an imprecision corresponding to the 10% coefficient of variation at  $13\text{ ng L}^{-1}$  and the 99th percentile of a healthy reference population at



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

#### 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<br>(n = 1155) | Acute myocardial infarction |               | P-value<br>(AMI/non AMI) |
|--|----------------------------|-----------------------------|---------------|--------------------------|
|  |                            | Yes (n = 224)               | No (n = 931)  |                          |
| Characteristics  |                            |                             |               |                          |
| Age, years   | 63 (50–76)                 | 72 (61–80)                  | 61 (49–74)    | <0.001                   |
| Male sex – n (%)   | 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 <sup>-1</sup> 1.73 m <sup>-2</sup> ) <sup>a</sup> | 85 (68–101)                | 73.6 (59–95)                | 87 (70–102)   | <0.001                   |
| STEMI  |                            | 45 (20%)                    |               |                          |
| NSTEMI   |                            | 179 (80%)                   |               |                          |
| Risk factors – n (%)   |                            |                             |               |                          |
| 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 – n (%)  |                            |                             |               |                          |
| Coronary artery disease  | 436 (38%)                  | 106 (47%)                   | 309 (33%)     | <0.001                   |
| Previous myocardial infarction                                 | 281 (24%)                  | 72 (32%)                    | 209 (23%)     | 0.002                    |
| Previous ACB <sup>b</sup>                                      | 110 (10%)                  | 33 (15%)                    | 77 (8%)       | 0.003                    |
| Previous PTCA <sup>c</sup>                                     | 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 x h   | 5 (3–12)                   | 6 (3–14)                    | 5 (3–12)      | 0.082                    |
| Maximum before x h   | 4 (2–7)                    | 4 (2–8)                     | 4 (2–7)       | 0.123                    |
| Electrocardiographic findings – n (%)                          |                            |                             |               |                          |
| 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                   |

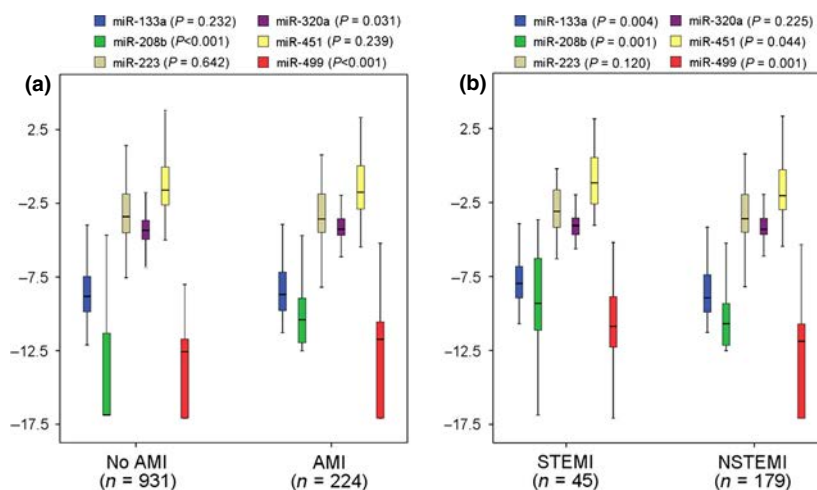
All values are reported as median (interquartile range) or numbers (%).

<sup>a</sup>eGFR, estimated glomerular filtration rate. <sup>b</sup>ACB, aortocoronary bypass. <sup>c</sup>PTCA, 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.

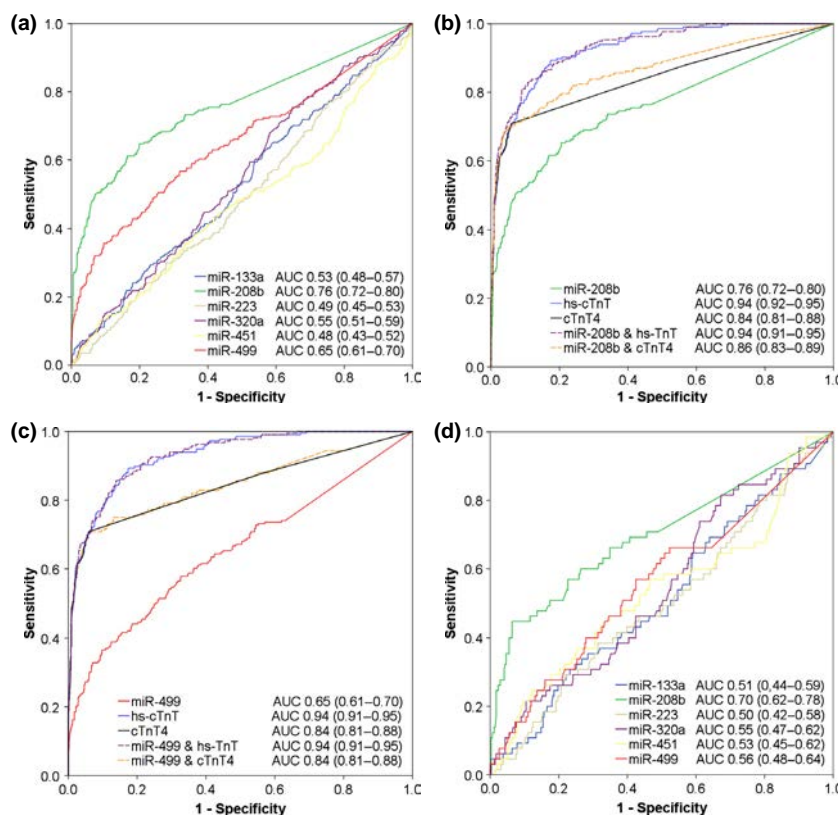
The prognostic accuracy for the prediction of short-term (30 days) and long-term mortality (730 days) by ROC curve analysis is shown in Figure S2a for all miRNAs analysed and (hs-)cTnT. Only in the case of miR-208b was there a borderline significant AUC for short-term mortality (0.67; 95% CI





**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<sup>-1</sup> and cTnT4 per increase of 1 mg L<sup>-1</sup>. 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 ( $\leq -10.38$ ), 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 the 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).

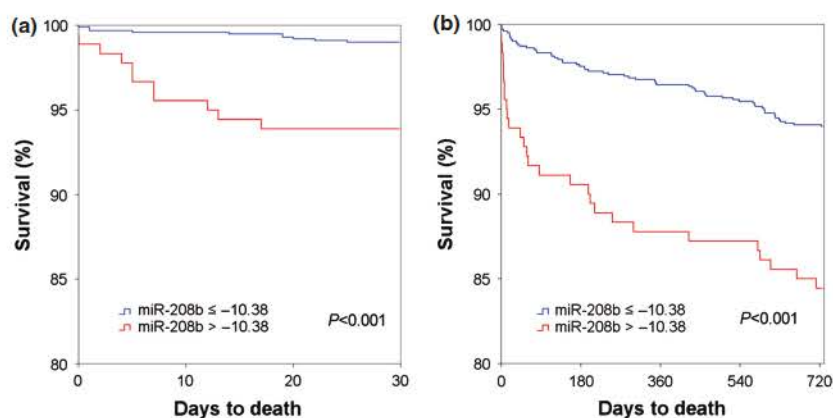
Although perhaps disappointing to some extent, these results have important clinical implications and extend previous findings on the possible clinical use of miRNAs [6–9, 23, 24]. Current hs-cTn assays [1, 2] detect troponins at concentrations approximately 10-fold lower than conventional troponin assays 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<sup>-1</sup> and cTnT4 per increase of 1 mg L<sup>-1</sup>. 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 Goet 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. ■



## MicroRNA-150

### A Novel Marker of Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction

Yvan Devaux, PhD; Melanie Vausort, MSc; Gerry P. McCann, MD; Jennifer Zangrando, MSc; Dominic Kelly, MD; Naveed Razvi, MBBS; Lu Zhang, MSc; Leong L. Ng, MD; Daniel R. Wagner, MD, PhD; Iain B. Squire, MD

**Background**—Left ventricular (LV) remodeling after acute myocardial infarction is associated with adverse prognosis. MicroRNAs (miRNAs) regulate the expression of several genes involved in LV remodeling. Our aim was to identify miRNAs associated with LV remodeling after acute myocardial infarction.

**Methods and Results**—We studied 90 patients after first ST-segment–elevation acute myocardial infarction. A derivation cohort consisted of 60 patients characterized by echocardiography pre-discharge and at 6-month follow-up. Thirty patients characterized by magnetic resonance imaging pre-discharge and at 4-month follow-up were the validation cohort. Remodeling was defined as an increase in LV end-diastolic volume ( $\Delta\text{EDV}>0$ ) between discharge and follow-up. Circulating miRNAs were measured by microarrays and polymerase chain reaction. Using a systems-based approach, we identified several miRNAs potentially involved in LV remodeling. In the derivation cohort, one of these miRNAs, miR-150, was downregulated in patients with remodeling ( $\Delta\text{EDV}>0$ ) compared with patients without remodeling ( $\Delta\text{EDV}\leq 0$ ). In the validation cohort, patients with remodeling had 2-fold lower levels of miR-150 than those without ( $P=0.03$ ). miR-150 outperformed N-terminal pro-brain natriuretic peptide to predict remodeling (area under the receiver-operating characteristic curve of 0.74 and 0.60, respectively). miR-150 reclassified 54% (95% confidence interval, 5–102;  $P=0.03$ ) of patients misclassified by N-terminal pro-brain natriuretic peptide and 59% (95% confidence interval, 9–108;  $P=0.02$ ) of patients misclassified by a multiparameter clinical model, including age, sex, and admission levels of troponin I, creatine kinase, and N-terminal pro-brain natriuretic peptide.

**Conclusions**—Low circulating levels of miR-150 are associated with LV remodeling after first ST-segment–elevation acute myocardial infarction. miR-150 has potential as a novel biomarker in this setting. (*Circ Cardiovasc Genet.* 2013;6:290-298.)

**Key Words:** biomarker ■ microRNA ■ myocardial infarction ■ remodeling

The development of heart failure after acute myocardial infarction (AMI) is the result of left ventricular (LV) remodeling. This complex process, which has a powerful association with adverse outcome, involves changes in cardiac morphology, affecting both cellular and extracellular elements of the myocardium. Early prediction of LV remodeling and the development of heart failure after AMI is challenging and may, potentially, be improved by the identification of novel biomarkers associated with this process. Several biomarkers are associated with LV remodeling and the development of heart failure.<sup>1</sup> Of these, the natriuretic peptides, in particular B-type natriuretic peptide (BNP) and the N-terminal fragment of the precursor peptide, N-terminal probrain natriuretic peptide (Nt-proBNP), have prognostic value in patients with acute coronary syndromes.<sup>2,3</sup> This use is enhanced by the

concomitant determination of other biomarkers such as troponin I and C-reactive protein (CRP).<sup>4</sup> However, the prognostic value of Nt-proBNP is limited, in part, by the fact that circulating levels fluctuate considerably in the early period after AMI.<sup>5</sup>

#### Clinical Perspective on p 298

MicroRNAs (miRNAs) are short oligonucleotides expressed in a cell- and tissue-specific manner that regulate gene expression and organ function, including the myocardium.<sup>6</sup> Because of the discovery of their presence and stability in human peripheral blood,<sup>7,8</sup> miRNAs have shown potential as circulating biomarkers of cardiovascular diseases. Several studies reported the diagnostic potential of cardiac-enriched miRNAs in the setting of AMI.<sup>9</sup> Other studies have reported the dysregulation of miRNA expression in the failing or

Received September 7, 2012; accepted March 14, 2013.

From the Laboratory of Cardiovascular Research, Centre de Recherche Public-Santé, Luxembourg (Y.D., M.V., J.Z., L.Z., D.R.W.); University of Leicester and National Institute for Health Research, Leicester Cardiovascular Biomedical Research Unit, Glenfield Hospital, Leicester, UK (G.P.M., D.K., N.R., L.L.N., I.B.S.); and Division of Cardiology, Centre Hospitalier, Luxembourg (D.R.W.).

The online-only Data Supplement is available at <http://circgenetics.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIRCGENETICS.113.000077/-/DC1>. Correspondence to Yvan Devaux, PhD, Laboratory of Cardiovascular Research, Centre de Recherche Public-Santé, 120 route d'Arlon, L-1150 Luxembourg. E-mail [yvan.devaux@crp-sante.lu](mailto:yvan.devaux@crp-sante.lu)

© 2013 American Heart Association, Inc.

*Circ Cardiovasc Genet* is available at <http://circgenetics.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.113.000077



hypertrophic heart<sup>10–13</sup> and in the circulation of patients with heart failure.<sup>14</sup> Because miRNAs play functional roles in the development of heart failure,<sup>15</sup> modulation of their expression and activity has emerged as an attractive potential tool to limit the development of this condition. However, the prognostic value of miRNAs after AMI has received less attention.

In a study by Widera et al,<sup>16</sup> circulating levels of 6 cardiac-enriched miRNAs were measured in patients with acute coronary syndrome. Levels of miR-133a and miR-208b were upregulated in patients with AMI (compared with patients with unstable angina) and were associated with the risk of death. However, this association was lost after adjustment for high-sensitivity cardiac troponin T. Interestingly, circulating miRNAs follow a typical expression profile post-AMI that may be used for prognostic purposes.<sup>17</sup> For instance, miR-208a increased 5 days post-AMI and remained elevated up to 90 days later. In a recent study evaluating the diagnostic value of circulating miRNAs in patients with AMI, we observed a weak association between cardiac-enriched miR-208b and miR-499 and LV dysfunction.<sup>18</sup>

Using a systems-based approach, combining analyses of miRNA profiles, obtained by microarrays, with networks of miRNA gene interactions, we identified novel circulating miRNAs with prognostic potential after AMI. We related concentrations of candidate miRNAs to the extent of ventricular remodeling after AMI.

## Materials and Methods

An expanded version of Methods is available in the online-only Data Supplement.

### Patients

We studied 90 patients with first ST-segment-elevation AMI (Table 1). Microarray experiments were performed on plasma from a derivation cohort of 60 patients admitted to our center between September 1, 2004, and March 31, 2005, enrolled in a prospective study of LV remodeling after AMI.<sup>19</sup> Over half of these patients were treated by thrombolysis; none received primary percutaneous coronary intervention, which was not in routine use at our center at the time. Cardiac function was evaluated by echocardiography, as described,<sup>19</sup> conducted by a single operator (D.K.) at discharge and at a median of 176 days (range, 138–262 days) after AMI.

Patients from the derivation cohort were selected according to whether they demonstrated LV remodeling post-AMI, as assessed from the change in LV end-diastolic volume ( $\Delta$ EDV) between discharge and follow-up. LV remodeling was defined as any increase in LVEDV during follow-up. During this selection, patients with diabetes mellitus or a prior AMI were excluded. Patients with or without LV remodeling were matched by age and had comparable cardiovascular risk factors. The rationale for this selection procedure was to avoid any bias attributable to a potential effect of confounding factors on circulating levels of miRNAs, as previously reported.<sup>16</sup>

Data from a distinct cohort of 30 patients with AMI were used for validation. Patients presenting with first ST-segment-elevation AMI were admitted to our center between January 4, 2010, and July 1, 2010, and treated by primary percutaneous coronary intervention. LV function and remodeling were assessed by cardiac magnetic resonance imaging as described,<sup>20</sup> at discharge and at a median of 121 days (range, 98–209 days). All cardiac magnetic resonance imaging examinations were performed under the supervision of a single investigator (G.M.), were analyzed by N.R., and interpretation was verified by G.M. All imaging assessment was performed by investigators blinded to natriuretic peptide and miRNA data.

In each study, the diagnosis of AMI was based on presentation with appropriate symptoms of myocardial ischemia, dynamic ST-segment elevation, and increase in markers of myocyte necrosis (creatinine

kinase and troponin I) to more than twice the upper limit of the normal range. Venous blood samples were collected in EDTA-anticoagulant tubes immediately before discharge (day 3–4 after AMI) and at follow-up. Samples were centrifuged within 30 minutes, and plasma was stored in aliquots at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

The protocol for each study was approved by the local research ethics committee, and written informed consent was obtained from all subjects. The conduct of the study was in keeping with the Declaration of Helsinki.

### Microarrays

Microarrays were used to obtain circulating miRNA expression profiles in patients with ( $n=30$ ) and without ( $n=30$ ) remodeling from the derivation cohort. Identical volumes of plasma obtained at discharge from the 30 patients of a group were pooled to reach a final volume of 400  $\mu\text{L}$ . Total RNA was extracted using the miRVana PARIS isolation kit (Applied Biosystems, Lennik, Belgium). Hybridization was performed on miRNA Human Microarray Release 12.0 slides (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), and 4 arrays were hybridized per group. Data are available at the Gene Expression Omnibus ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)) under the accession number GSE 34571.

Additional details are available in the online-only Data Supplement.

### Plasma miR-150 Determination

Total RNA was extracted from plasma, and quantitative polymerase chain reaction (PCR) performed with the SYBR-green PCR kit and miR-150-specific miScript primer set (Qiagen, Venlo, the Netherlands) as described.<sup>18</sup> Spiked-in synthetic *C. elegans* miRNAs were added to plasma samples for correction of extraction efficiency. Expression levels were calculated with the formula  $2^{-\text{exp}(\text{mean Ct spiked-in controls}-\text{Ct target miRNA})}$ .

### Nt-proBNP Assay

Plasma Nt-proBNP was assayed using a noncompetitive assay, as previously described,<sup>21</sup> on the basis of the assay originally described by Karl et al.<sup>22</sup> Briefly, a C-terminal-directed antibody was immobilized onto ELISA plates, and an N-terminal antibody was affinity purified and biotinylated. Aliquots (20  $\mu\text{L}$ ) of samples or Nt-proBNP standards were incubated in the C-terminal antibody-coated wells in the presence of the N-terminal biotinylated antibody. After washing, plates were incubated with streptavidin labeled with methylacridinium ester and were read on a luminometer with sequential injections of nitric acid (with  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and NaOH (with cetyl ammonium bromide). The lower limit of detection was 14.4 fmol/mL. Within and between assays, coefficients of variation were 2.3% and 4.8%, respectively. There was no cross-reactivity with atrial natriuretic peptide, BNP, or C-type natriuretic peptide.

### Luciferase Reporter Assay

Human embryonic kidney (HEK)293T cells maintained in Dulbecco modified Eagle medium supplemented with 10% FBS, 1% L-glutamine, and 1% penicillin–streptomycin were used for luciferase assay. Cells plated in 96-well plates were cotransfected using lipofectamine 2000 (Invitrogen, Merelbeke, Belgium) with 10 ng of reporter plasmids containing the 3' untranslated regions of CRP or adrenergic receptor  $\beta$ 1 (ADRB1) inserted downstream of the gaussian luciferase secreted reporter gene and the secreted alkaline phosphatase tracking gene (pEZX-MT05, GeneCopia, Labomics, Nivelles, Belgium) and 30 nmol/L of pre-miR miRNA precursor hsa-miR-150 (Applied Biosystems) or negative control. Gaussian luciferase and alkaline phosphatase activities were assessed by luminescence in conditioned medium 24 and 48 hours after transfection using the secreted-pair dual luminescence kit (GeneCopia). Gaussian luciferase activity was normalized to alkaline phosphatase activity.

### Expression of miR-150 in the Murine Heart

All mice used in the present study were C57BL/6 male mice (8–10 weeks old; 20–25 g). The investigation conformed to the *Guide for the*



**Table 1. Demographic and Clinical Features of Patients With Acute Myocardial Infarction**

|  | Derivation Cohort (n=60) |                              |                           | P Value* | Validation Cohort (n=30) |          |
|--|--------------------------|------------------------------|---------------------------|----------|--------------------------|----------|
|  | All (n=60)               | $\Delta$ EDV $\leq$ 0 (n=30) | $\Delta$ EDV $>$ 0 (n=30) |          |                          | P Value† |
| Age, median (range), y                     | 63.5 (38–86)             | 63.5 (38–86)                 | 63.5 (40–86)              | 0.99     | 62.5 (42–82)             | 0.27     |
| Men, n (%)                                 | 46 (77)                  | 20 (67)                      | 26 (87)                   | 0.08     | 28 (93)                  | 0.66     |
| Ethnicity, n (%)                           |                          |                              |                           |          |                          |          |
| White                                      | 52 (87)                  | 27 (90)                      | 25 (83)                   | 0.99     | 29 (97)                  | 0.86     |
| South Asian                                | 8 (13)                   | 3 (10)                       | 5 (17)                    | 0.71     | 1 (3)                    | 0.27     |
| Cardiovascular history/risk factors, n (%) |                          |                              |                           |          |                          |          |
| Smoker                                     | 27 (45)                  | 14 (47)                      | 13 (43)                   | 1.00     | 13 (43)                  | 0.91     |
| FH   | 20 (33)                  | 10 (33)                      | 10 (33)                   | 1.00     | 6 (20)                   | 0.45     |
| Angina                                     | 2 (3)                    | 1 (3)                        | 1 (3)                     | 1.00     | 0 (0)                    | 1.00     |
| Diabetes mellitus                          | 0 (0)                    | 0 (0)                        | 0 (0)                     | 1.00     | 0 (0)                    | 1.00     |
| Hypertension                               | 12 (20)                  | 6 (20)                       | 6 (20)                    | 1.00     | 8 (27)                   | 0.76     |
| Hypercholesterolemia                       | 12 (20)                  | 8 (27)                       | 4 (13)                    | 0.33     | 8 (27)                   | 0.76     |
| MI   | 0 (0)                    | 0 (0)                        | 0 (0)                     | 1.00     | 0 (0)                    | 1.00     |
| PCI  | 1 (1.7)                  | 0 (0)                        | 1 (3)                     | 1.00     | 0 (0)                    | 1.00     |
| CABG                                       | 0 (0)                    | 0 (0)                        | 0 (0)                     | 1.00     | 0 (0)                    | 1.00     |
| Presentation, n (%)                        |                          |                              |                           |          |                          |          |
| STEMI                                      | 60 (100)                 | 30 (100)                     | 30 (100)                  | 1.00     | 30 (100)                 | 1.00     |
| Anterior infarct                           | 28 (47)                  | 11 (37)                      | 17 (57)                   | 0.20     | 18 (60)                  | 0.63     |
| Thrombolysis                               | 34 (57)                  | 21 (70)                      | 13 (46)                   | 0.07     | 0 (0)                    | <0.001   |
| Serum markers at admission, median (range) |                          |                              |                           |          |                          |          |
| Troponin I, ng/mL‡                         | 16.9 (0.5–150)           | 22.8 (1.5–150)               | 14.3 (0.5–150)            | 0.85     | 21.9 (8.25 to >50)       | 0.84     |
| CK, U/L                                    | 1230 (56–7384)           | 1148 (56–4423)               | 1367 (216–7384)           | 0.57     | 1101 (232–6308)          | 0.77     |
| Nt-proBNP, ng/L                            | 2.82 (0.94–3.8)          | 2.85 (1.25–3.8)              | 2.8 (0.94–3.61)           | 0.47     | 0.85 (0.007–4.75)        | <0.001   |
| Medications at admission, n (%)            |                          |                              |                           |          |                          |          |
| Aspirin                                    | 5 (8)                    | 3 (10)                       | 2 (7)                     | 1        |                          |          |
| Clopidogrel                                | 1 (2)                    | 1 (3)                        | 0 (0)                     | 1        |                          |          |
| $\beta$ -Blockers                          | 5 (8)                    | 4 (13)                       | 1 (3)                     | 0.35     |                          |          |
| Calcium antagonists                        | 6 (10)                   | 2 (7)                        | 4 (13)                    | 0.67     |                          |          |
| ACE inhibitors                             | 5 (8)                    | 2 (7)                        | 3 (10)                    | 1        |                          |          |
| Angiotensin receptor blocker               | 2 (3)                    | 1 (3)                        | 1 (3)                     | 1        |                          |          |
| Statins                                    | 4 (7)                    | 3 (10)                       | 1 (3)                     | 0.61     |                          |          |
| Medications at discharge, n (%)            |                          |                              |                           |          |                          |          |
| Aspirin                                    | 51 (85)                  | 22 (73)                      | 29 (97)                   | 0.03     |                          |          |
| Clopidogrel                                | 16 (27)                  | 8 (27)                       | 8 (27)                    | 1        | 27 (90)                  | 0.002    |
| $\beta$ -Blocker                           | 56 (93)                  | 26 (87)                      | 30 (100)                  | 0.11     | 29 (97)                  | 0.96     |
| ACE inhibitor                              | 53 (8)                   | 25 (83)                      | 28 (93)                   | 0.47     | 29 (97)                  | 0.90     |
| Angiotensin receptor blocker               | 4 (7)                    | 2 (7)                        | 2 (7)                     | 1        |                          |          |
| Diuretic                                   | 5 (8)                    | 3 (10)                       | 2 (7)                     | 1        | 4 (13)                   | 0.49     |
| Statin                                     | 59 (98)                  | 29 (97)                      | 30 (100)                  | 1        | 30 (100)                 | 0.92     |
| Warfarin                                   |                          |                              |                           |          | 5 (17)                   |          |
| Aldosterone antagonist                     |                          |                              |                           |          | 2 (7)                    |          |
| End points                                 |                          |                              |                           |          |                          |          |
| Reinfarction, n (%)                        | 5 (8)                    | 3 (10)                       | 2 (7)                     | 1        |                          |          |
| CHF, n (%)                                 | 5 (8)                    | 1 (3)                        | 4 (13)                    | 0.35     | 5 (17)                   | 0.31     |
| Death, n (%)                               | 1 (2)                    | 0 (0)                        | 1 (3)                     | 1        |                          |          |

ACE indicates angiotensin-converting enzyme; CABG, coronary artery bypass grafting; CHF, congestive heart failure; CK, creatine kinase; EDV, end-diastolic volume; FH, familial hypercholesterolemia; MI, myocardial infarction; PCI, percutaneous coronary intervention; Nt-BNP, N-terminal pro-brain natriuretic peptide; and STEMI, ST-segment-elevation myocardial infarction.

\*For comparison between  $\Delta$ EDV $\leq$ 0 and  $\Delta$ EDV $>$ 0.

†For comparison between validation cohort and whole derivation cohort.

‡The troponin I assay changed between the derivation cohort and the validation cohort; hence the different upper limits.



*Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health. Animals were anesthetized with a mix of isoflurane/oxygen (2.5%–1.5%) until intubation and ventilation with 1% to 1.5% isoflurane/oxygen. Myocardial infarction was induced in 5 mice by permanently ligating the left anterior descending coronary artery after a left thoracotomy. Five mice were sham operated. Mice were euthanized 15 days after surgery. Hearts were collected, fixed in formalin during 24 hours, and embedded in paraffin. Five-micrometer-thick sections were stained for collagen deposition with Masson trichrome. Expression of miR-150 was assessed by in situ hybridization using the miRCURY LNA miRNA ISH Optimization Kit (Exiqon, Vedbaek, Denmark) according to the manufacturer's instructions. A scramble probe was used as negative control.

**Statistical Analysis**

*Patient Characteristics*

Statistical analyses were performed using SigmaPlot version 11.0. For all comparisons, a *P* value <0.05 was considered significant. For categorical data, comparisons were by Fisher exact test. Comparisons between groups of continuous data were performed with a *t* test for gaussian data and the Mann-Whitney test on ranks for nonnormally distributed data. Normality was assessed with the Shapiro-Wilk test.

*Prediction Analyses*

Prediction analyses were performed with R version 2.14.2 with the PredictABEL package. A *P* value <0.05 was considered statistically significant. Clinical features were coded as 1 for presence and 0 for absence. Prediction of LV remodeling ( $\Delta$ EDV>0) was assessed by logistic regression. The area under the receiver-operating characteristic curve was used to estimate the value of biomarkers to predict remodeling. The added value of miR-150 to Nt-proBNP was evaluated by analysis of deviance and was tested for significance using the Wald  $\chi^2$  test.

*Reclassification Analyses*

Reclassification analyses were performed, testing the predictive value for the identification of remodeling of miR-150, first together with Nt-proBNP and second together with age, sex, and admission serum markers. Logistic regression models were used for patient classification. The net reclassification index and the integrated discrimination

improvement<sup>23</sup> were used to validate the classification performance changes for miR-150. Statistical significance was evaluated as described.<sup>24</sup>

**Results**

**Patient Characteristics**

Table 1 shows the characteristics of patients in the derivation cohort, as a whole and divided by evidence of LV remodeling, and of the validation cohort. There were no clinically meaningful differences between the derivation and validation cohorts, other than those reflecting changes in therapeutic management of AMI between the periods of the 2 studies. Thus, there were differences in the mode of revascularization and in the frequency of prescription of clopidogrel. Accordingly, patients of the validation cohort had lower levels of Nt-proBNP than patients of the derivation cohort.

Table 2 shows LV function and volumes in the derivation cohort, stratified by the presence or absence of remodeling, and in the validation cohort. Because imaging modalities differed, we did not perform formal statistical comparison of LVEF and LV volumes between the cohorts.

Within the derivation cohort, patients who subsequently developed LV remodeling were less likely to have received reperfusion therapy (thrombolysis) at presentation (Table 1). Although not reaching conventional statistical significance an anterior site of AMI was more prevalent among patients with remodeling. Predischarge levels of markers of myocyte necrosis (creatine kinase) and of Nt-proBNP, as well as LV ejection fractions and volumes, were similar between patients who subsequently did, or did not, show LV remodeling (Tables 1 and 2).

In patients who showed remodeling, absolute values for LVEDV and LV end-systolic volume were greater compared

**Table 2. Echocardiographic Parameters of Patients With Acute Myocardial Infarction**

|  | Derivation Cohort (n=60) |                              |                       | <i>P</i> Value* | Validation Cohort (n=30) |
|--|--------------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------|--------------------------|
|  | All (n=60)               | $\Delta$ EDV $\leq$ 0 (n=30) | $\Delta$ EDV>0 (n=30) |                 |                          |
| Predischarge echo/MRI, median (range)                  |                          |                              |                       |                 |                          |
| LVEF, %  | 43 (20 to 64)            | 46 (20 to 57)                | 40 (20 to 64)         | 0.72            | 42 (20 to 49)            |
| LVEDV, mL  | 93 (36 to 180)           | 94 (53 to 155)               | 90 (36 to 180)        | 0.86            | 191 (143 to 287)         |
| LVESV, mL  | 51 (21 to 118)           | 51 (25 to 110)               | 55.5 (21 to 118)      | 0.89            | 113 (73 to 175)          |
| SVI  |                          |                              |                       |                 | 40 (22 to 79)            |
| Follow-up echo/MRI, median (range)                     |                          |                              |                       |                 |                          |
| LVEF, %  | 46 (18 to 67)            | 49 (18 to 67)                | 42 (18 to 63)         | 0.18            | 50 (27 to 57)            |
| LVEDV, mL  | 93 (45 to 204)           | 80.5 (45 to 132)             | 108 (51 to 204)       | <0.001          | 201 (115 to 295)         |
| LVESV, mL  | 48 (17 to 125)           | 41 (17 to 88)                | 61 (21 to 125)        | <0.001          | 102 (55 to 205)          |
| SVI  |                          |                              |                       |                 | 46 (22 to 75)            |
| Change between discharge and follow-up, median (range) |                          |                              |                       |                 |                          |
| $\Delta$ EDV, mL                                       | 4.5 (–42 to 48)          | –11.5 (–42 to –1)            | 17.5 (10 to 48)       | <0.001          | 6 (–57 to +61)           |
| $\Delta$ ESV, mL                                       | –1 (–41 to 35)           | –9 (–41 to 5)                | 11 (–21 to 35)        | <0.001          | –11 (–50 to +39)         |
| $\Delta$ EF, %   | 1 (–23 to 27)            | 2.5 (–23 to 27)              | –1 (–17 to 23)        | 0.33            | 7 (–10 to +21)           |
| $\Delta$ SVI   |                          |                              |                       |                 | 9 (–22 to +21)           |

EDV indicates end-diastolic volume; EF, ejection fraction; ESV, end-systolic volume; LVEDV, left ventricular end-diastolic volume; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVESV, left ventricular end-systolic volume; MRI, magnetic resonance imaging; and SVI, stroke volume index.

\*For comparison between  $\Delta$ EDV $\leq$ 0 and  $\Delta$ EDV>0.



with patients without remodeling, as were the changes in these parameters between discharge and follow-up. Remodeling was associated with a small mean reduction in LVEF between discharge and follow-up compared with a small increase in the absence of remodeling.

### Circulating miRNA Profiles and Remodeling After AMI

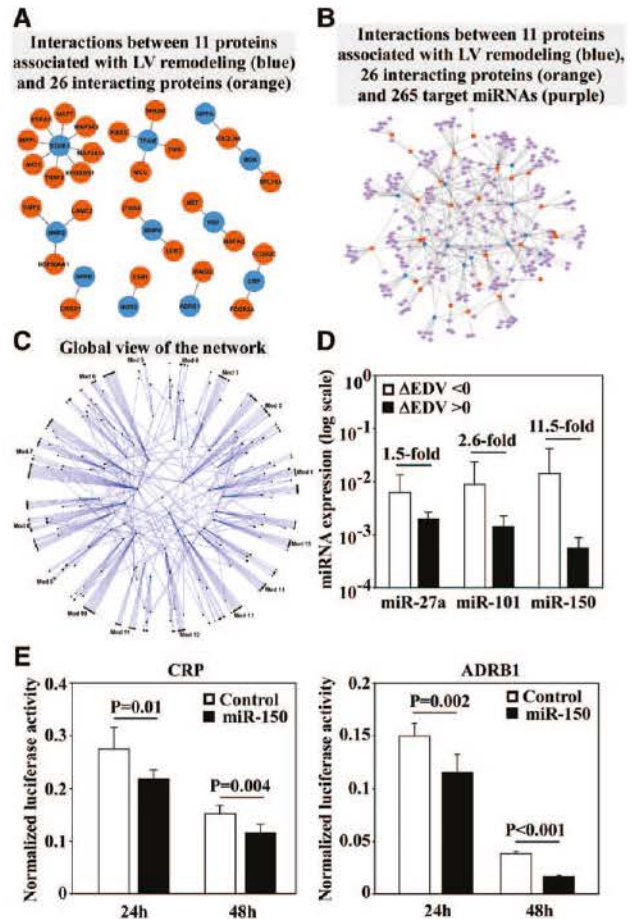
Circulating miRNAs were measured in plasma samples from all patients of the derivation cohort, stratified by the presence ( $\Delta\text{EDV}>0$ ;  $n=30$ ) or absence ( $\Delta\text{EDV}\leq 0$ ;  $n=30$ ) of remodeling. Identical volumes of plasma from each of the 30 patients of each group were pooled to reach a final volume of 400  $\mu\text{L}$  for each group and processed by microarrays. Among the 695 miRNAs on microarrays, 160 were detected in 1 or both groups of patients. Twenty-nine miRNAs were detected only in patients without remodeling. Complete data are in Table I in the online-only Data Supplement.

### Identification of miRNAs Potentially Involved in LV Remodeling

A systems-based approach was undertaken to select, using microarray data, which miRNAs would be most likely to be involved in the development of LV remodeling. Using the key words “ventricular remodeling” and “myocardial infarction” and a limit to “homo sapiens,” we retrieved from the Entrez-Gene database a set of 13 genes known to be associated with LV remodeling. These 13 seed genes were used to query protein-protein interaction databases. Eleven of these 13 genes encoded proteins known to interact with 26 other proteins (Figure 1A and Table II in the online-only Data Supplement). Then, we retrieved from miRNA-target databases a list of 265 miRNAs predicted to target the 13 seed genes or genes encoding the 26 interacting proteins (Table III in the online-only Data Supplement). Using these genes and miRNAs, we built an interaction network (Figure 1B and 1C) in which nodes represent either proteins or miRNAs and edges represent either protein-protein interactions or miRNA-target pairs. Analyses allowed isolation of the top 10 high-traffic miRNAs (hsa-miR-27a/-133a/-625/-296-3p/-31/-23a/-204/-19a/-101/-150) predicted to regulate the expression of a high number of proteins involved in LV remodeling and therefore potentially involved in the process.

### Selection of 1 Candidate miRNA

Having identified 10 miRNAs with potential role in LV remodeling, we selected miR-150 for further analysis for the following reasons. Among the top 10 high-traffic miRNAs, miR-27a, miR-23a, miR-19a, miR-101, and miR-150 were highly expressed in microarray data. In addition, miR-101 and miR-150 were readily detected in patients without remodeling and totally absent in patients with remodeling (Table I in the online-only Data Supplement). Higher levels of miR-101 and miR-150 in patients without remodeling were confirmed using quantitative PCR (Figure 1D). The observation that miR-150 was the most differentially expressed miRNA motivated its selection for further analysis. Also, it has been noted that in animal models miR-150, but



**Figure 1.** Systems-based identification of candidate miRNAs. **A**, Network of interactions between proteins known to be associated with left ventricular (LV) remodeling in humans (blue nodes) and 26 interacting proteins (orange). From the 13 proteins associated with LV remodeling, only 11 had known protein-protein interactions in at least 2 queried databases. **B**, Network of interactions among the 11 proteins associated with LV remodeling (blue), their 26 interactors (orange), and their 265 target miRNAs (purple). This network was built with Cytoscape. **C**, Global view of the network containing 15 modules. This view was built with Polar Mapper. **D**, Discharge plasma levels of miR-27a/101/150 in 60 patients with acute myocardial infarction of the derivation cohort, as measured by quantitative polymerase chain reaction. Patients with decreased end-diastolic volume (EDV) between discharge and follow-up ( $\Delta\text{EDV}<0$ ,  $n=30$ ) had higher levels of miRNAs compared with patients with increased EDV ( $\Delta\text{EDV}>0$ ,  $n=30$ ). Mean $\pm$ 95% confidence interval (CI) values are shown. **E**, HEK-293T cells were cotransfected with reporter plasmids containing the 3' untranslated regions of C-reactive protein (CRP; left) or adrenergic receptor  $\beta$ 1 (ADRB1; right) and either pre-miR control (control) or pre-miR-150 (miR-150) for 24 and 48 hours. Luciferase activity was decreased on administration of pre-miR-150. Data are mean $\pm$ 95% CI ( $n=12$ ).

not miR-101, has been shown to be regulated during cardiac hypertrophy.<sup>12,25</sup>

According to computational analysis, miR-150 was predicted to target 2 genes involved in LV remodeling, ADRB1<sup>26</sup> and CRP,<sup>27</sup> and 1 interacting gene, tumor necrosis factor receptor-associated factor 2<sup>28</sup> (Figure 1A and Table III in the online-only Data Supplement). A luciferase assay performed in cultured cells validated the downregulation of CRP and ADRB1 by miR-150 (Figure 1E).



**miR-150 and Nt-proBNP: Prediction of LV Remodeling**

We assessed the value of discharge levels of miR-150 and Nt-proBNP for the prediction of LV remodeling in an independent validation cohort of 30 patients after AMI. Again, patients in the validation cohort were categorized into remodeling ( $\Delta\text{EDV}>0$ ;  $n=19$ ) and no remodeling ( $\Delta\text{EDV}\leq 0$ ;  $n=11$ ). Levels of miR-150 at discharge, as assessed by quantitative PCR, were lower in patients with compared with those without remodeling (2-fold;  $P=0.03$ ; Figure 2A), confirming the results seen in the derivation cohort.

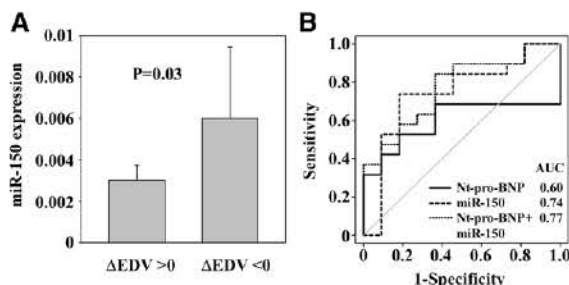
For the classification of patients into  $\Delta\text{EDV}>0$  or  $\Delta\text{EDV}\leq 0$  groups, area under the receiver-operating characteristic curve was 0.74 (95% confidence interval [CI], 0.55–0.94) for miR-150 and 0.60 (95% CI, 0.39–0.80) for Nt-proBNP (Figure 2B). The combination of Nt-proBNP and miR-150 showed an area under the receiver-operating characteristic curve of 0.77 (95% CI, 0.60–0.94). The combination of the 2 biomarkers reduced the deviance of the Nt-proBNP model by 5.6 ( $P=0.02$ ).

Reclassification analyses were performed to evaluate the capacity of miR-150 to reclassify patients misclassified by Nt-proBNP. Patients were categorized into low (<50%), intermediate (50%–75%), and high (>75%) probability of remodeling groups (Table 3). The net reclassification index was 54% (95% CI, 5–102;  $P=0.03$ ). The integrated discrimination improvement was 0.16 (95% CI, –0.01 to 0.33;  $P=0.07$ ).

Finally, reclassification analyses were performed to evaluate the added value of miR-150 over a multiparameter clinical model, including age, sex, and admission levels of troponin I, creatine kinase, and Nt-proBNP. MiR-150 was able to reclassify 59% (net reclassification index, 59%; 95% CI, 9–108;  $P=0.02$ ) of patients originally misclassified by the multiparameter clinical model into remodeling ( $\Delta\text{EDV}>0$ ) and no remodeling ( $\Delta\text{EDV}\leq 0$ ) groups (Table 4). Again, the integrated discrimination improvement was of borderline statistical significance (0.17; 95% CI, –0.02 to 0.34;  $P=0.05$ ).

**Expression of miR-150 in the Murine Heart**

To characterize the origin of miR-150, mice were subjected to MI through coronary ligation. Fifteen days after MI induction,



**Figure 2.** Predictive performances of miR-150 compared with N-terminal pro-brain natriuretic peptide (Nt-proBNP). miR-150 and Nt-proBNP plasma levels were measured at discharge in 30 patients with acute myocardial infarction of the validation cohort. **A**, miR-150 levels assessed by quantitative polymerase chain reaction are higher in patients with decreased end-diastolic volume (EDV) between discharge and follow-up ( $\Delta\text{EDV}\leq 0$ ,  $n=11$ ) compared with patients with increased end-diastolic volume between discharge and follow-up ( $\Delta\text{EDV}>0$ ,  $n=19$ ). Mean $\pm$ 95% confidence interval values are shown. **B**, Receiver-operating characteristic (ROC) curves showing the values of miR-150 and Nt-proBNP, alone or in combination, to predict  $\Delta\text{EDV}$ . Areas under the ROC curves are indicated.

**Table 3. Reclassification Performance of miR-150 Over Nt-proBNP (Validation Cohort)**

| Model With Nt-proBNP Predicted Risk   | Model With Nt-proBNP and miR-150 |          |          | % Reclassified |
|---|----------------------------------|----------|----------|----------------|
|   | <50%                             | 50%–75%  | >75%     |                |
| <b>Patients with remodeling (<math>\Delta\text{EDV}&gt;0</math>, <math>n=19</math>)</b>     |                                  |          |          |                |
| <50%  | 1                                | <b>3</b> | <b>0</b> | 75             |
| 50%–75%   | <i>1</i>                         | 6        | 3        | 40             |
| >75%  | <i>0</i>                         | <i>0</i> | 5        | 0              |
| Total   | 2                                | 9        | 8        |                |
| <b>Patients without remodeling (<math>\Delta\text{EDV}\leq 0</math>, <math>n=11</math>)</b> |                                  |          |          |                |
| <50%  | 0                                | <i>0</i> | <i>0</i> | 0              |
| 50%–75%   | <b>4</b>                         | 6        | 1        | 45             |
| >75%  | <b>0</b>                         | <b>0</b> | 0        | 0              |
| Total   | 4                                | 6        | 1        |                |

Patients were categorized into low (<50%), intermediate (50%–75%), and high (>75%) probability of remodeling. Bold numbers indicate correct classifications, and italicized numbers indicate false classifications.

EDV indicates end-diastolic volume; and Nt-BNP, N-terminal pro-brain natriuretic peptide.

the left ventricle was dilated, and an intense collagen deposition was visible in infarcted areas of the heart (Figure 3A and 3B). As revealed by in situ hybridization, miR-150 expression was increased in the infarct zone compared with the cardiac tissue of sham-operated mice and remote and border zones of MI mice hearts (Figure 3C). Using quantitative PCR, we also found a reliable expression of miR-150 in the murine heart (data not shown). Therefore, miR-150 is expressed in the heart and is upregulated in infarcted tissues.

**Discussion**

The present study is the first to report the identification of a miRNA biomarker of LV remodeling post-AMI using a

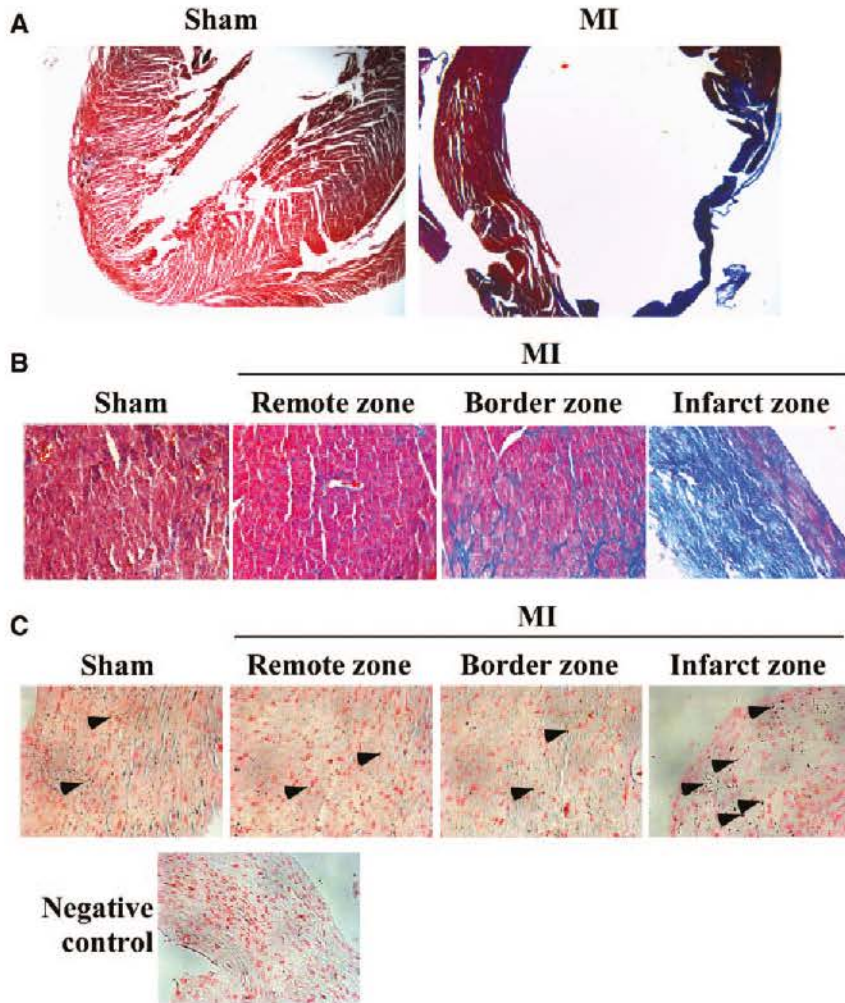
**Table 4. Reclassification Performance of miR-150 Over a Multiparameter Clinical Model (Validation Cohort)**

| Multiparameter Clinical Model Predicted Risk  | Multiparameter Clinical Model and miR-150 |          |          | % Reclassified |
|---|---|----------|----------|----------------|
|   | <50%                                      | 50%–75%  | >75%     |                |
| <b>Patients with remodeling (<math>\Delta\text{EDV}&gt;0</math>, <math>n=19</math>)</b>     |   |          |          |                |
| <50%  | 2   | <b>2</b> | <b>1</b> | 60             |
| 50%–75%   | <i>0</i>                                  | 3        | <b>4</b> | 57             |
| >75%  | <i>0</i>                                  | <i>1</i> | 6        | 14             |
| Total   | 2   | 6        | 11       |                |
| <b>Patients without remodeling (<math>\Delta\text{EDV}\leq 0</math>, <math>n=11</math>)</b> |   |          |          |                |
| <50%  | 0   | <b>1</b> | <i>0</i> | 100            |
| 50%–75%   | <b>4</b>                                  | 6        | <i>0</i> | 40             |
| >75%  | <b>0</b>                                  | <b>0</b> | 0        | 0              |
| Total   | 4   | 7        | 0        |                |

The multiparameter clinical model included age, sex, and admission levels of troponin I, creatine kinase, and N-terminal pro-brain natriuretic peptide. Patients were categorized into low (<50%), intermediate (50%–75%), and high (>75%) probability of remodeling. Bold numbers indicate correct classifications, and italicized numbers indicate false classifications.

EDV indicates end-diastolic volume.





**Figure 3.** Expression of miR-150 in the heart. Mice were subjected to myocardial infarction (MI) through coronary ligation or were sham operated (n=5 per group). After 15 days, mice were euthanized, and cardiac sections were performed after paraffin embedding. **A**, Whole heart stained with Masson trichrome (blue color) showing left ventricular (LV) dilation and increased LV volume. Magnification  $\times 25$ . **B**, Masson trichrome staining showing intense collagen deposition in necrotic areas of the heart. Magnification  $\times 400$ . **C**, In situ hybridization showing increased miR-150 in necrotic areas of the heart (dark staining indicated by arrowheads). A negative control with a scramble miRNA attests to staining specificity. Magnification,  $\times 400$ .

systems-based approach, the potential use of which to identify relevant transcriptomic or proteomic biomarkers has been reported.<sup>29–31</sup> Using these strategies, we have recently identified several candidate biomarkers of LV remodeling post-AMI.<sup>29</sup> Now, we provide evidence that systems-based approaches are suitable to identify miRNAs associated with LV remodeling that can be used for prognostication purposes. Our results indicate that miR-150 has the potential to predict LV function and remodeling after MI with power comparable or superior to that of Nt-proBNP, the current gold standard biomarker for the prediction of LV dysfunction in this setting.

The regulation of expression of miRNAs in disease states such as cardiac hypertrophy has been studied extensively.<sup>32</sup> In addition, although the diagnostic value of circulating miRNAs for acute coronary syndromes has been recently investigated,<sup>9</sup> their prognostic use has been far less studied. Widera et al<sup>16</sup> recently reported a higher risk of death for patients with elevated miR-133a or miR-208b after acute coronary syndromes. However, this predictive value was modest and was lost after adjustment for high-sensitivity troponin. We recently confirmed this finding and found a modest association between miR-208b (area under the receiver-operating characteristic curve=0.69) and LV dysfunction.<sup>18</sup> In the present study, we identified miR-150, a nonprototype cardiac miRNA, as a potential prognostic marker after AMI. Lower circulating

concentrations of miRNA-150 were associated with LV remodeling in both our derivation and validation cohorts. This suggests a protective role for miR-150, consistent with previous studies, showing that low levels of miR-150 are associated with hypertrophy<sup>12,25</sup> and LV rupture after AMI.<sup>33</sup>

Although the prognostic value of miR-150 has been described in patients with sepsis<sup>34</sup> and acute leukemias,<sup>35</sup> this is the first study to report an association with remodeling post-AMI. The association between miR-150 and sepsis suggested a link with inflammation, as also suggested by the observation that miR-150 is expressed by monocytes.<sup>36</sup> Because inflammation is a critical component of the development of LV remodeling after AMI, future studies are needed to determine the role of miR-150 in this setting.

We identified miR-150 as a node in the network of miRNAs and proteins linked to LV remodeling. According to miRNA-target databases, miR-150 is predicted to regulate the expression of 3 genes associated with LV remodeling: ADRB1,<sup>26</sup> CRP,<sup>27</sup> and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2.<sup>28</sup> Using luciferase assay, we validated that miR-150 effectively regulates the expression of CRP and ADRB1. However, the interaction between miR-150 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 was not tested because of the failure of cloning the 3' untranslated region of tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 into the reporter plasmid.



The role of miR-150 in the heart is poorly characterized. miR-150 is actively secreted by circulating monocytes, is transferred to endothelial cells, and regulates their migration in a paracrine manner.<sup>36</sup> In addition, miR-150 targets CXCR4 in bone marrow-derived mononuclear cells, thereby regulating their mobilization and migration.<sup>37</sup> These observations suggest that miR-150 plays an active role in the regulation of cardiac healing, consistent with our observation that low levels of miR-150 are associated with adverse remodeling after AMI. A functional role of miR-150 after AMI is further supported by our data-mining results predicting regulation by miR-150 of target genes of 3 categories linked to cardiomyopathy and hypertrophy.

We confirmed, using both quantitative PCR and in situ hybridization, that expression of miR-150 is high in the heart. Fifteen days after induction of MI in mice, miR-150 was increased in the infarct zone. This observation may contrast with the previous finding of decreased expression of miR-150 after MI in mice.<sup>38</sup> However, in this study, miR-150 was measured in RNA extracted from nonischemic cardiac tissue of mice 8 weeks after ligation. In our experiments, mice were euthanized 2 weeks after MI, and we observed an increase of miR-150 expression in necrotic tissues. The significance of this apparent discrepancy requires deeper mechanistic investigations. Analysis of a publicly available microarray data repository (Gene Expression Omnibus accession No. GSE 36946) revealed that miR-150 is highly expressed in cardiac tissue from patients with hypertrophic cardiomyopathy undergoing surgical myectomy and is downregulated in these patients compared with control donors. This observation is consistent with Van Rooij et al<sup>12</sup>, who reported that miR-150 is downregulated in the failing heart. Therefore, miR-150 measured in the bloodstream of patients after AMI originates, at least in part, from the heart. A participation of monocyte-derived miR-150 cannot be excluded, although this is not consistent with a low inflammation in patients without remodeling. It has to be mentioned that miRNAs other than cardiomyocyte-enriched miRNAs may also contribute to LV remodeling,<sup>39</sup> and this is in accordance with our present data.

The observed lack of prediction of LV remodeling by pre-discharge Nt-proBNP is perhaps surprising. However, our observations are consistent with previous findings from our group of a lack of association between Nt-proBNP and  $\Delta$ EDV in a study of 404 patients during follow-up after AMI, despite Nt-proBNP being predictive of the combined end point of death or heart failure during follow-up.<sup>40</sup>

Using reclassification analyses, we report the additive predictive power for LV remodeling for miRNA-150 to either Nt-proBNP or a multiparameter model, including serum markers at admission, age, and sex. This is perhaps unsurprising. Although circulating levels of the natriuretic peptides reflect myocardial wall stress and cardiac enzymes reflect myocardial damage, the end result of remodeling, miRNAs are a measure of the dysregulation of the processes leading to LV remodeling. Thus, miRNA-150 and serum markers give measures of different aspects of the remodeling process, which may in part explain the additive value of consideration of all biomarkers.

### Limitations

The present study is limited by the relatively small numbers of patients, restricting our ability to demonstrate an association

between miR-150 and clinical outcomes, which remains to be studied. Furthermore, patients of the derivation cohort were selected according to the presence or absence of remodeling during follow-up. This selection could have overestimated the discriminative capacity of miR-150. However, this is not supported by the validation of the biomarker value of miR-150 in an independent group of unselected patients. A strength of our study is the use of independent derivation and validation cohorts, the latter assessed by cardiac magnetic resonance imaging, allowing accurate assessment of LV function and volumes and reducing markedly the numbers of patients required for assessment of these parameters compared with alternative imaging modalities. Another limitation resides in the design of the systems-based approach and in the selection of the 13 genes known to be associated with LV remodeling. This selection has certainly affected the candidate miRNAs (so-called high-traffic miRNAs). Assessment of expression levels of all miRNAs in individual patients of the derivation cohort using microarrays or deep sequencing may be another approach to identify candidate miRNAs with prognostication potential.

In conclusion, miR-150 is low in the circulation of patients who experience LV remodeling after ST-segment-elevation AMI. MicroRNA-150 may be downregulated in this setting, and its measurement may facilitate early identification of patients at risk of LV remodeling, a powerful marker of adverse prognosis. The use of miRNA-150 as a clinical prognostic biomarker merits further investigation.

### Acknowledgments

We thank Christelle Nicolas, Laurent Quennery, and Bernadette Leners for expert technical assistance.

### Sources of Funding

This work was supported by the Society for Research on Cardiovascular Diseases; the Ministry of Culture, Health, and Higher Education; and the National Fund for Research of Luxembourg.

### Disclosures

Drs Ng, Squire, McCann, and Razvi received support from the National Institute for Health Research Leicester Cardiovascular Biomedical Research Unit. The other authors report no conflicts.

### References

- Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med*. 2008;358:2148–2159.
- de Lemos JA, Morrow DA, Bentley JH, Omland T, Sabatine MS, McCabe CH, et al. The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2001;345:1014–1021.
- Haecck JD, Verouden NJ, Kuijt WJ, Koch KT, Van Straalen JP, Fischer J, et al. Comparison of usefulness of N-terminal pro-brain natriuretic peptide as an independent predictor of cardiac function among admission cardiac serum biomarkers in patients with anterior wall versus nonanterior wall ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol*. 2010;105:1065–1069.
- Sabatine MS, Morrow DA, de Lemos JA, Gibson CM, Murphy SA, Rifai N, et al. Multimarker approach to risk stratification in non-ST elevation acute coronary syndromes: simultaneous assessment of troponin I, C-reactive protein, and B-type natriuretic peptide. *Circulation*. 2002;105:1760–1763.
- Talwar S, Squire IB, Downie PF, McCullough AM, Campton MC, Davies JE, et al. Profile of plasma N-terminal proBNP following acute myocardial infarction; correlation with left ventricular systolic dysfunction. *Eur Heart J*. 2000;21:1514–1521.
- van Rooij E. Introduction to the series on microRNAs in the cardiovascular system. *Circ Res*. 2012;110:481–482.

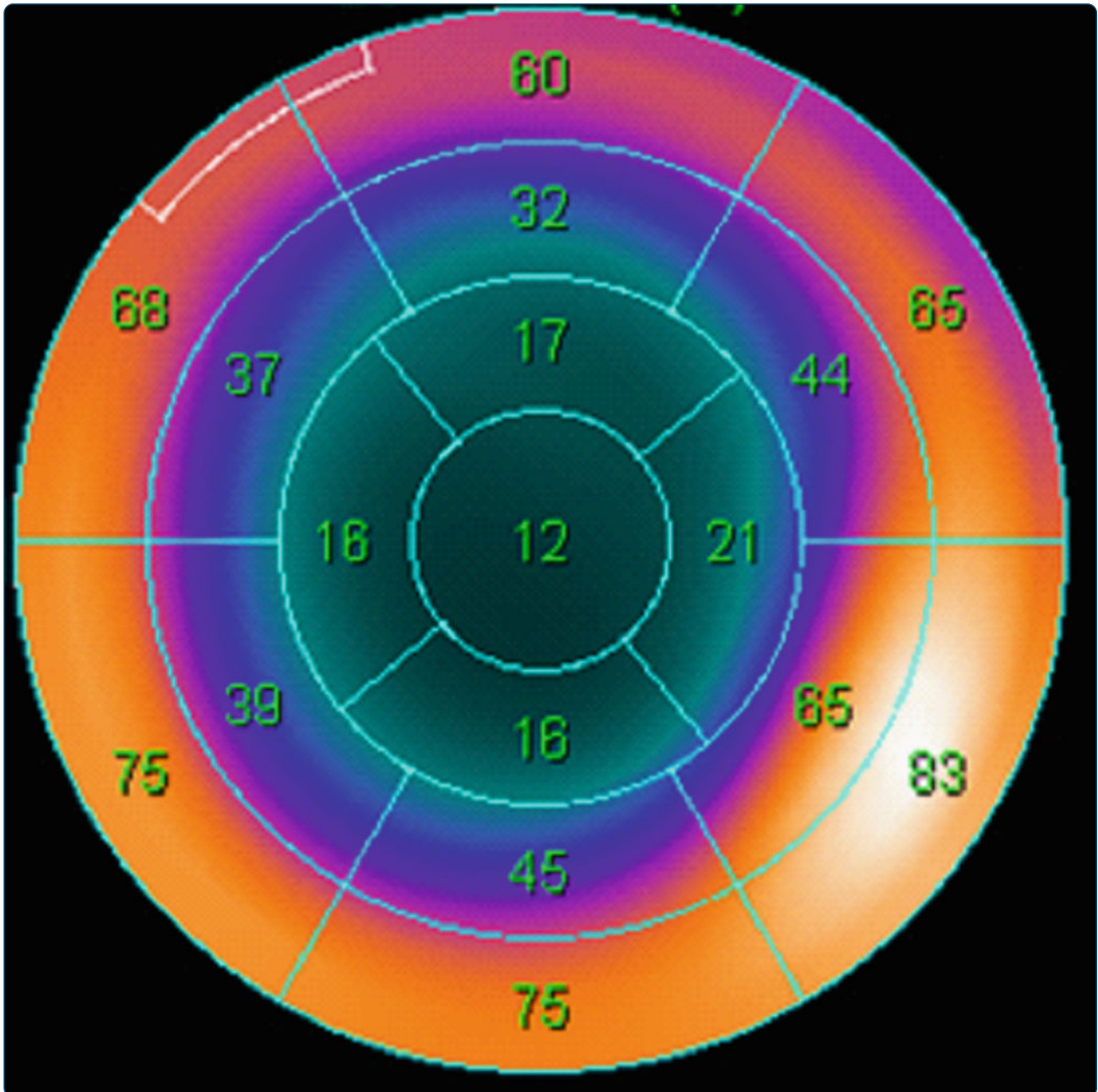


7. Gilad S, Meiri E, Yegorov Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One*. 2008;3:e3148.
8. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Poghosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:10513–10518.
9. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res*. 2012;110:483–495.
10. Divakaran V, Mann DL. The emerging role of microRNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Circ Res*. 2008;103:1072–1083.
11. 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;116:258–267.
12. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:18255–18260.
13. Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypowy J, Abdellatif M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2007;100:416–424.
14. Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, et al. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res*. 2010;106:1035–1039.
15. Latronico MV, Condorelli G. microRNAs in hypertrophy and heart failure. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2011;236:125–131.
16. Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM, Bang C, Bauersachs J, Bethmann K, et al. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51:872–875.
17. Zile MR, Mehurg SM, Arroyo JE, Stroud RE, Desantis SM, Spinale FG. Relationship between the temporal profile of plasma microRNA and left ventricular remodeling in patients following myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4:614–619.
18. Devaux Y, Vausort M, Goretti E, Nazarov PV, Azañe F, Gilson G, et al. Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction. *Clin Chem*. 2012;58:559–567.
19. Kelly D, Cockerill G, Ng LL, Thompson M, Khan S, Samani NJ, et al. Plasma matrix metalloproteinase-9 and left ventricular remodeling after acute myocardial infarction in man: a prospective cohort study. *Eur Heart J*. 2007;28:711–718.
20. Steadman CD, Jerosch-Herold M, Grundy B, Rafelt S, Ng LL, Squire IB, et al. Determinants and functional significance of myocardial perfusion reserve in severe aortic stenosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2012;5:182–189.
21. Omland T, Persson A, Ng L, O'Brien R, Karlsson T, Herlitz J, et al. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2002;106:2913–2918.
22. Karl J, Borgya A, Gallusser A, Huber E, Krueger K, Rollinger W, et al. Development of a novel, N-terminal-proBNP (NT-proBNP) assay with a low detection limit. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1999;230:177–181.
23. 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.
24. 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.
25. Tatsuguchi M, Seok HY, Callis TE, Thomson JM, Chen JF, Newman M, et al. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42:1137–1141.
26. Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, et al. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med*. 1982;307:205–211.
27. Øm S, Manhenke C, Ueland T, Damås JK, Mollnes TE, Edvardsen T, et al. C-reactive protein, infarct size, microvascular obstruction, and left-ventricular remodeling following acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2009;30:1180–1186.
28. Donners MM, Beckers L, Lievens D, Munnix I, Heemskerck J, Janssen BJ, et al. The CD40-TRAF6 axis is the key regulator of the CD40/CD40L system in neointima formation and arterial remodeling. *Blood*. 2008;111:4596–4604.
29. Azañe FJ, Dewey FE, Brutsaert DL, Devaux Y, Ashley EA, Wagner DR. Systems-based approaches to cardiovascular biomarker discovery. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5:360–367.
30. Dewey FE, Perez MV, Wheeler MT, Watt C, Spin J, Langfelder P, et al. Gene coexpression network topology of cardiac development, hypertrophy, and failure. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4:26–35.
31. Pham MX, Teuteberg JJ, Kfoury AG, Starling RC, Deng MC, Cappola TP, et al; IMAGE Study Group. Gene-expression profiling for rejection surveillance after cardiac transplantation. *N Engl J Med*. 2010;362:1890–1900.
32. Abdellatif M. Differential expression of microRNAs in different disease states. *Circ Res*. 2012;110:638–650.
33. Zidar N, Boštjančič E, Glavač D, Stajer D. MicroRNAs, innate immunity and ventricular rupture in human myocardial infarction. *Dis Markers*. 2011;31:259–265.
34. Vasilescu C, Rossi S, Shimizu M, Tudor S, Veronese A, Ferracin M, et al. MicroRNA fingerprints identify miR-150 as a plasma prognostic marker in patients with sepsis. *PLoS One*. 2009;4:e7405.
35. Wang Y, Li Z, He C, Wang D, Yuan X, Chen J, et al. MicroRNAs expression signatures are associated with lineage and survival in acute leukemias. *Blood Cells Mol Dis*. 2010;44:191–197.
36. Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, et al. Secreted monocyte miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell*. 2010;39:133–144.
37. 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.
38. Lin RCY, Weeks KL, Gao X-M, Williams RBH, Bernardo BC, Kiriazis H, et al. PI3K(p110 $\alpha$ ) protects against myocardial infarction-induced heart failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:724–732.
39. Tijssen AJ, Pinto YM, Creemers EE. Non-cardiomyocyte microRNAs in heart failure. *Cardiovasc Res*. 2012;93:573–582.
40. Kelly D, Khan SQ, Thompson M, Cockerill G, Ng LL, Samani N, et al. Plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-9: novel indicators of left ventricular remodeling and prognosis after acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2008;29:2116–2124.

## CLINICAL PERSPECTIVE

Left ventricular (LV) remodeling, leading to LV dysfunction and heart failure, is one of the most prognostically important developments after acute myocardial infarction (AMI). Despite important developments in the use of various biomarkers in this setting, the identification of patients at an early stage after AMI at risk of adverse LV remodeling remains difficult. Using a systems-based approach, we identified novel circulating miRNAs with prognostic potential after AMI. In a derivation cohort of 60 patients with AMI, circulating levels of one of these miRNAs, miRNA-150, were markedly reduced in patients with LV remodeling. This was confirmed in a validation cohort of 30 patients admitted with first- or anterior ST-segment-elevation AMI and assessed using cardiac magnetic resonance imaging. In this cohort, predischARGE levels of miRNA-150 were 2-fold lower in patients with compared with those without remodeling. MicroRNA-150 predicted remodeling with an area under the receiver-operating characteristic curve of 0.74, whereas N-terminal pro-brain natriuretic peptide had an area under the receiver-operating characteristic curve of 0.60. The combination of N-terminal pro-brain natriuretic peptide and miR-150 showed an area under the receiver-operating characteristic curve of 0.77. MicroRNA-150 reclassified 54% of patients originally misclassified by N-terminal pro-brain natriuretic peptide and 59% of patients misclassified by a multiparameter clinical model, including age, sex, and admission levels of troponin I, creatine kinase, and N-terminal pro-brain natriuretic peptide. This is the first report of a miRNA biomarker of LV remodeling post-AMI using a systems-based approach. Our observations suggest that miR-150 has the potential to predict LV remodeling after AMI with power comparable or superior to that of Nt-proBNP, the current gold standard biomarker in this setting.





## Identification of candidate long non-coding RNAs in response to myocardial infarction

Zangrando *et al.*

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Identification of candidate long non-coding RNAs in response to myocardial infarction

Jennifer Zangrando<sup>1</sup>, Lu Zhang<sup>1</sup>, Melanie Vausort<sup>1</sup>, Fatiha Maskali<sup>2</sup>, Pierre-Yves Marie<sup>2</sup>, Daniel R Wagner<sup>1,3</sup> and Yvan Devaux<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Long non-coding RNAs (lncRNAs) constitute a novel class of non-coding RNAs. lncRNAs regulate gene expression, thus having the possibility to modulate disease progression. In this study, we investigated the changes of lncRNAs expression in the heart after myocardial infarction (MI).

**Results:** Adult male C57/BL6 mice were subjected to coronary ligation or sham operation. In a derivation group of 4 MI and 4 sham-operated mice sacrificed 24 hours after surgery, microarray analysis showed that MI was associated with up-regulation of 20 lncRNAs and down-regulation of 10 lncRNAs (fold-change >2). Among these, 2 lncRNAs, called myocardial infarction-associated transcript 1 (MIRT1) and 2 (MIRT2), showed robust up-regulation in the MI group: 5-fold and 13-fold, respectively. Up-regulation of these 2 lncRNAs after MI was confirmed by quantitative PCR in an independent validation group of 8 MI and 8 sham-operated mice (9-fold and 16-fold for MIRT1 and MIRT2,  $P < 0.001$ ). In a time-course analysis involving 21 additional MI mice, the expression of both lncRNAs peaked 24 hours after MI and returned to baseline after 2 days. In situ hybridization revealed an up-regulation of MIRT1 expression in the left ventricle of MI mice. Expression of MIRT1 and MIRT2 correlated with the expression of multiple genes known to be involved in left ventricular remodeling. Mice with high level of expression of MIRT1 and MIRT2 had a preserved ejection fraction.

**Conclusion:** Myocardial infarction induces important changes in the expression of lncRNAs in the heart. This study motivates further investigation of the role of lncRNAs in left ventricular remodeling.

**Keywords:** Myocardial infarction, Left ventricular remodeling, Non-coding RNAs

## Background

Cardiac diseases including stroke continue to be the main cause of death and disability in developed countries [1,2]. Despite modern reperfusion strategies, a still significant proportion of patients develop left ventricular (LV) remodeling leading to heart failure after myocardial infarction (MI). Oxygen and nutrient deprivation to the heart induces severe damages, which can be of multiple types: necrosis or apoptosis of cardiac cells, cardiomyocyte hypertrophy, or fibrosis. Part of these damages can be induced by a de-regulation of gene expression.

Since the initial sequencing of the human genome more than a decade ago [3,4], huge progress has been made in the understanding of its complexity. It appears

now that only a minor part of the human DNA encodes proteins, while the remaining is transcribed into non-protein coding RNAs [5-7]. Non-coding RNAs have been arbitrarily dichotomized as short non-coding RNAs (20–22 nucleotides-long, called microRNAs, miRNAs) and long non-coding RNAs (lncRNAs, >200 nucleotides). While miRNAs down-regulate gene expression mostly by destabilization of target messenger RNA [8], the regulation of gene expression by lncRNAs appears to be much more complex, involving both activation and repression of gene expression, and modulation of chromatin architecture [9]. Since their discovery [10,11], lncRNAs have emerged as attracting biomarkers and therapeutic targets in the oncology field. However, our knowledge of the role of lncRNAs in cardiovascular disease is only at its infancy.

Only few studies reported associations between lncRNAs and the heart. Two landmark studies reported the

\* Correspondence: yvan.devaux@crp-sante.lu

<sup>1</sup>Laboratory of Cardiovascular Research, Centre de Recherche Public de la Santé (CRP – Santé), 84 Val Fleuri, Luxembourg L1526, Luxembourg  
Full list of author information is available at the end of the article

identification of 2 lncRNAs involved in cardiac development, Braveheart [12] and Fendrr [13]. In a genetic association study, the lncRNA MIAT (myocardial infarction-associated transcript) has been shown to be associated with the risk of MI [14]. Recent studies reported dysregulation of lncRNA expression in the failing heart [15,16]. However, the role of lncRNAs in the infarcted heart is still poorly characterized. In particular, whether lncRNAs may affect the course of LV remodeling post MI is unknown.

The present study was designed to (1) determine the effect of MI on the expression of lncRNAs in the heart, and (2) identify lncRNAs potentially involved in LV remodeling post MI.

## Methods

### Animal experiments

This study was conducted in accordance with the regulations of the Animal Welfare Act of the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No.85–23, revised 1996). Protocols were approved by the Regional Veterinary Department ('Direction Départementale de la Protection des Populations'), agreements RAR1A03516811825 and 54–100.

Mice were anesthetized by inhalation of isoflurane/oxygen mixture (2.5%/1.5 v/v). When the mice were unresponsive to toe-pinch, they were intubated and ventilated with a rodent respirator and were placed on a heating pad. A left thoracotomy of the third interrib space was performed to expose the heart. After pericardial incision, permanent occlusion of the anterior interventricular artery was performed with a 7–0 Prolene suture. Having confirmed the presence of myocardial infarction by observation of ventricular blanching, ribs were closed with a 6.0 Vicryl suture, muscles were repositioned and the skin was sutured. The endotracheal tube was removed after spontaneous breathing. After surgery, mice were placed in an incubator at 30°C for at least 30 min and then returned to their cages.

For FDG-PET exam, mice received a pre-medication of 100 mg/kg of Acipimox in two intraperitoneal injections. The first dose was injected 1 hour before the injection of FDG and the second dose simultaneously to FDG injection. Pre-medication with Acipimox allows a higher myocardial uptake of FDG and enhanced signal to noise and myocardial to blood activity ratios [17]. One hour before the exam, 37 MBq of FDG was injected in tail vein. Recording was performed during 40 min under continuous isoflurane anaesthesia using a dedicated small animal PET system (Inveon, Siemens, Knoxville, TN, USA). FDG uptake was determined on collapsed short-axis slices in each segment from the 17-segment LV division from the American Heart Association [18] using the QPS software [19]. Left ventricular (LV) end-diastolic volume

(EDV), LV end-systolic volume (ESV) and LV ejection fraction (EF) were obtained from contiguous ECG-triggered short-axis slices using the QGS software.

Mice were sacrificed with an overdose of isoflurane/oxygen mixture. Blood was harvested by cardiac puncture. Heart was excised and immediately homogenized in Lysis Binding Buffer (mirVana isolation kit, Life technologies) for extraction of total RNA using the mirVana isolation kit (Life technologies, Merelbeke, Belgium) according to manufacturer's instructions. On-column DNase I digestion (Qiagen, Venlo, The Netherlands) was performed to eliminate potential contamination with genomic DNA. Concentration and integrity of RNA were assessed using a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop products, Wilmington, USA) and a 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies, Santa Clara, USA), respectively.

### Microarrays

Agilent microarray platform was used with Low input Quick Amp labeling kit (Agilent) according to manufacturer's instructions. Briefly, one-color spike mix was added to 200 ng of total RNA prior to amplification and labeling steps. Complementary RNA was purified with RNeasy Mini kit (Qiagen) and hybridized onto mouse SurePrint G3 microarrays (8x60K, Agilent). High-resolution microarray scanner (Agilent) and Feature Extraction software were used to scan the slide and extract raw microarrays data. Microarray data are available in the NCBI Gene Expression Omnibus [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>] under the accession number GSE46395.

Pre-processing of raw data was performed using Limma [20] and VSN [21] packages rooted in the statistical computing environment R. Spots with a signal that was not significantly greater than the corresponding background – flag automatically established by Feature Extraction – were removed. Normalization between arrays was performed with Agilent spike-in probes. Principal component analysis was performed with R package ClassDiscovery [22]. After removing control probes and the probes that were detected in less than 4 samples per microarray slide, differentially expressed transcripts were determined using the *t*-test procedure within Significance Analysis of Microarrays version 3.09 which uses data permutations to estimate false discovery rate for multiple testing [23]. 100 permutations were used in our analyses. Heatmaps were created using Cluster 3.0 and TreeView [24]. Functional annotation and enrichment analysis of differentially expressed genes were performed with DAVID [25] (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery).

### lncRNA identification and construction of correlation networks

Microarrays were re-annotated for lncRNAs on a probe level. Briefly, microarray probes without accession prefix

NM (i.e. protein-coding), according to the manufacturer, were aligned with lncRNAs from lncRNADB [26], RefSeq [27] and Ensembl ncRNA [28] databases using BLAST + [29] rooted in the Perl environment. Only the probes that perfectly matched lncRNAs and did not match protein-coding RNAs (NM prefix transcripts from RefSeq) were considered as probes for lncRNAs.

Spearman's rank correlation coefficient between selected lncRNAs and other remodeling-related transcripts from Gene database was obtained using the R package WGCNA [30]. This package computes the correlation coefficients and significance is determined by Student's test. Correlations with a *P* value < 0.05 were visualized under the form of a network using Cytoscape (PMID: 21149340).

#### Real-time quantitative PCR

One µg of total RNA was reverse transcribed using Superscript II reverse transcriptase (Life technologies). Controls without reverse transcriptase were performed to ensure the absence of genomic DNA amplification during PCR. Real-time PCR was performed with IQ SYBR Green supermix in a CFX96 apparatus (Bio-rad, Nazareth, Belgium). PCR primers were designed using the Beacon Designer software (Premier Biosoft, USA) (Additional file 1: Table S1). PCR conditions were as follows: 3 min at 95°C, 30 s at 95°C, and 1 min annealing-extension (40-fold). Optimal annealing-extension temperature was determined for each primer pair. The specificity of the PCR reaction was confirmed by melting curve analysis. GAPDH was chosen as housekeeping gene for normalization. Expression levels were calculated by the relative quantification method ( $\Delta\Delta C_t$ ) using the CFX Manager 2.1 software (Bio-Rad). Inter-run calibrator was used to normalize inter-run variations between separate real-time PCR runs.

#### In situ hybridization

Hearts were fixed in formalin during 24 hours, and embedded in paraffin. 5-µm thick sections were performed. Expression of MIRT1 was assessed by in situ hybridization using the miRCURY LNA™ microRNA ISH Optimization Kit (Exiqon, Vedbaek, Denmark) according to the manufacturer's instructions. A scramble probe was used as negative control. Briefly, after deparaffinization with xylene and ethanol, sections were permeabilized with proteinase K (1 µg/mL). Then, sections were incubated with 40nM double-DIG LNA™ MIRT1 probe (Exiqon) in hybridization solution (Sigma-Aldrich, Diegem, Belgium). Sections were washed and incubated with blocking solution (Roche, Howald, Luxembourg), and then with sheep anti-DIG antibodies coupled to alkaline phosphatase (Roche). Revelation was performed with NBT-BCIP solution (Roche) and the reaction was stopped with KTBT

solution. Nuclei were stained with Nuclear Fast Red (Sigma-Aldrich).

#### In situ hybridization coupled to immunostaining

To determine the cellular localization of MIRT1, in situ hybridization was performed as described above, with sheep anti-DIG antibodies coupled to fluorescein instead of alkaline phosphatase. Then, slides were subjected to immunohistochemical staining with a rabbit polyclonal antibody against sarcomeric alpha-actinin (Abcam, Cambridge, UK) to detect cardiomyocytes, a rabbit monoclonal antibody against vimentin (Abcam) to detect fibroblasts, or a rat monoclonal antibody against CD45 (SantaCruz, Heidelberg, Germany) to detect leukocytes. Alexa Fluor® 635-coupled goat anti-rabbit antibody and Alexa Fluor® 633-coupled goat anti-rat antibody were used as secondary antibodies (Invitrogen, Merelbeke, Belgium). Vectashield was used to reveal nuclei. Images were recorded on a confocal microscope (Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 510 Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany) using the LSM 510 META software (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany).

#### Statistical analyses

Results are presented as mean ± standard deviation (SD). Statistical analyses were performed with the SigmaPlot v11.0 software. The Shapiro-Wilk normality test preceded all analyses. t-test and Mann-Whitney test were used to compare two groups of continuous variables following Gaussian and non-Gaussian distributions, respectively. Correlations between 2 variables were assessed using the Spearman test. Multiple group comparisons were performed using one-way analysis of variance and pairwise comparisons were performed using the Holm-Sidak method. All tests were two-tailed. A *P* value < 0.05 was considered significant.

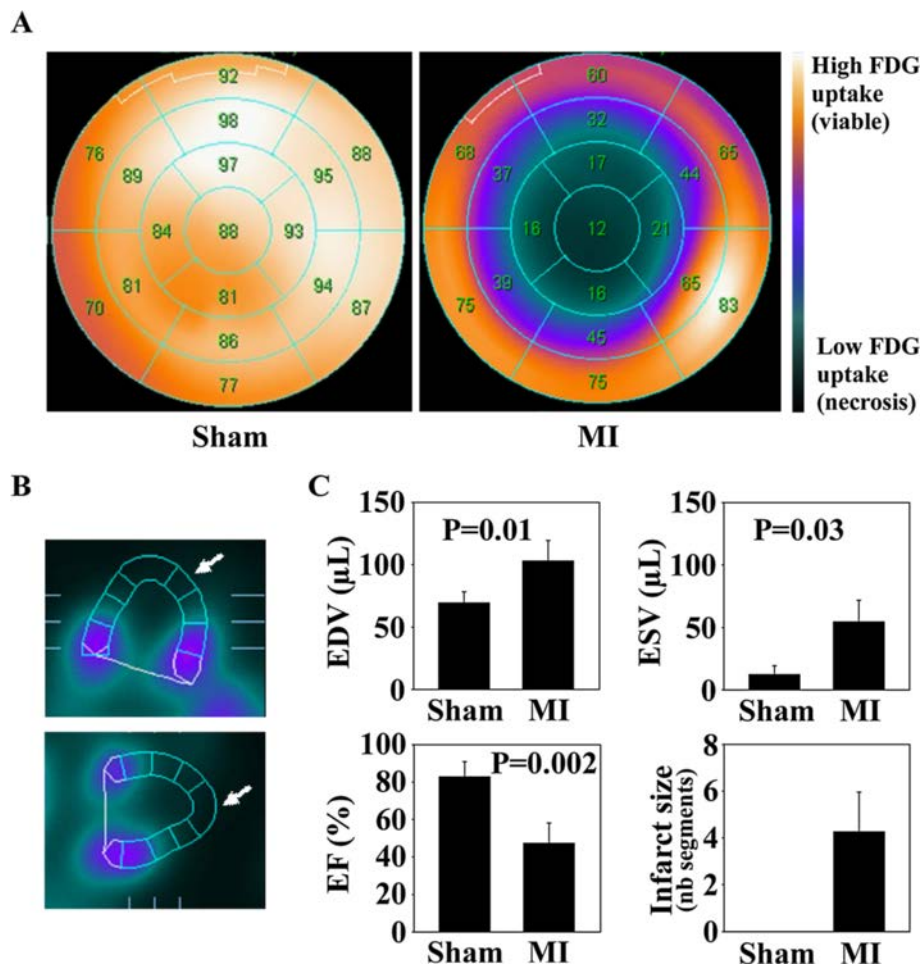
## Results

#### Induction of MI in mice – derivation group

A derivation group of 8 mice, 4 subjected to MI through coronary ligation and 4 subjected to sham-operation, was used to study the effects of MI on the expression of lncRNAs in the heart using microarrays.

Left ventricular function was assessed in all mice by FDG-PET 24 hours after surgery. As shown in Figure 1, this exam allowed the visualization of infarcted areas of the heart in MI mice, which were absent in sham-operated mice. Considering that infarcted areas display less than 50% FDG uptake (due to loss of metabolic activity of the cells, and to cell death), we calculated infarct size for each mice, which is the number of infarcted segments related to the total number of 17 segments (see Methods for details). MI mice had in average  $4 \pm 2$  infarcted segments, which correspond to a mean infarct





**Figure 1** FDG-PET exam in the derivation group. Cardiac function was assessed in sham-operated mice (n = 4) and MI mice (n = 4) using FDG-PET, 24 hours after surgery. **A**. Representative polar maps of a sham-operated mouse and a MI mouse, in which the left ventricle is divided in 17 segments. In each segment, the indicated number corresponds to the percentage of FDG uptake. The segment was considered necrotic when the FDG uptake was inferior to 50%. Color scale shows the amount of FDG uptake, with darker color indicating lower FDG uptake (necrotic areas) and brighter color indicating high FDG uptake (viable areas). **B**. Vertical (up) and horizontal (bottom) long axis end-systolic PET images of a MI mouse. White arrows indicate necrotic areas (absent or low FDG uptake). **C**. LV volumes, EF and infarct size as determined by FDG-PET image analysis. Infarct size was evaluated by the number of necrotic segments (<50% FDG uptake).

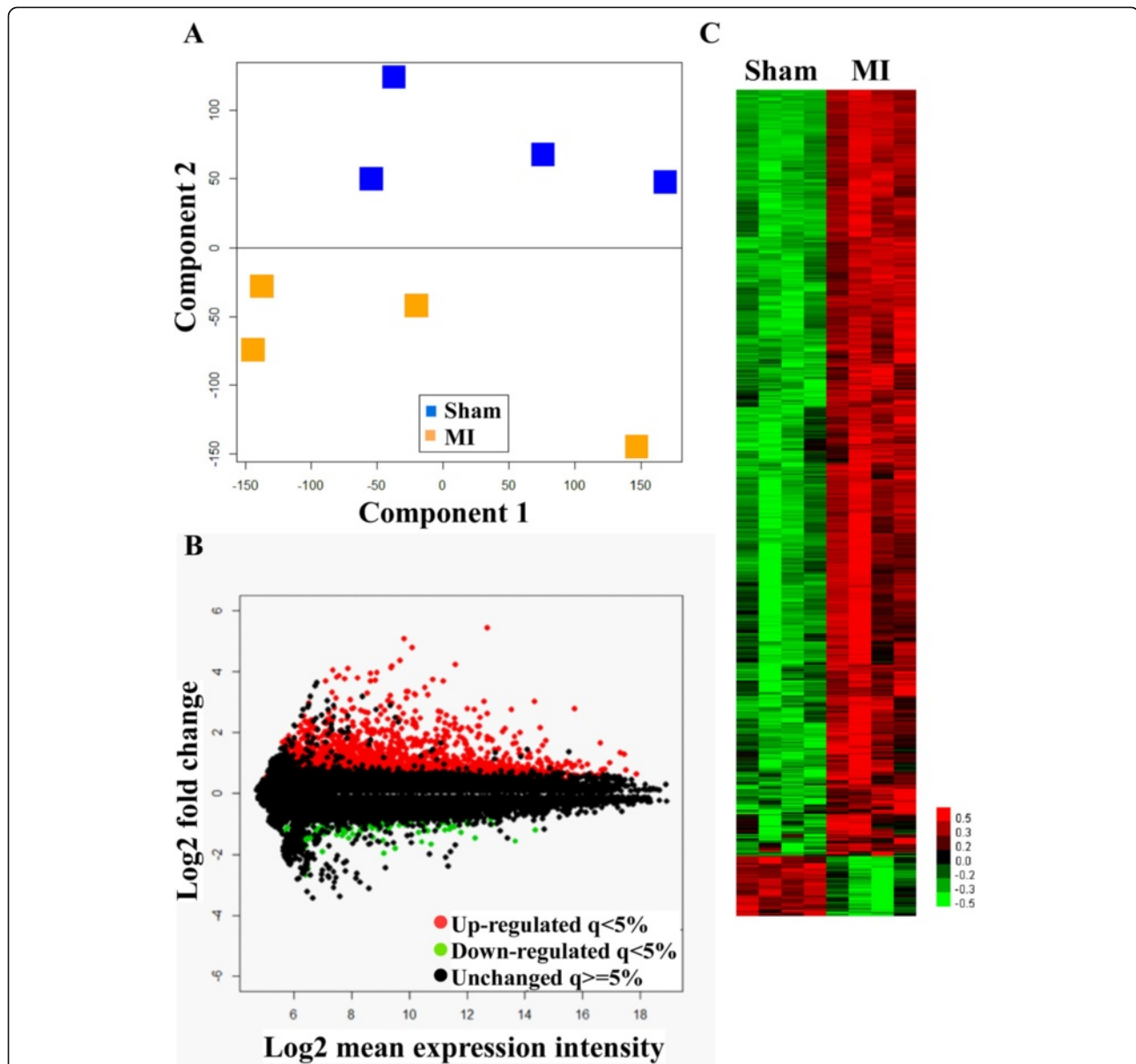
size of 24% of the left ventricle. Sham-operated mice did not display any segment with less than 50% FDG uptake. LV end-diastolic and end-systolic volumes were significantly elevated, and the EF was reduced by 36% in average in MI mice compared to sham-operated mice.

#### Microarray experiments – derivation group

Total RNA from cardiac tissue of the 8 mice of the derivation group was extracted and used in microarray experiments. The Agilent SurePrint G3 Mouse Gene Expression microarray containing 55681 probes recognizing both coding and non-coding RNAs was used in these experiments. Microarray data were analyzed as described in Additional file 1: Figure S1. After pre-processing microarray data with R packages Limma and vsn, and after removing control probes and the probes that were detected

in less than 4 of 8 microarrays, 34049 probes were retained for further analysis. Principal component analysis of these 34049 probes showed a clear discrimination of sham-operated and MI mice, demonstrating that MI significantly affected the cardiac transcriptome (Figure 2A). Principal component 1 accounted for 42% of total variability and principal component 2 accounted for 22% of total variability. Then, genes differentially expressed between sham-operated and MI mice were identified using significance analysis of microarrays method. Genes with a fold-change in expression >2-fold and a q-value <5% were considered as differentially expressed. 704 genes (918 probes) satisfied these criteria (Figure 2B-C).

Data mining using the DAVID database revealed that differentially expressed genes were highly involved in

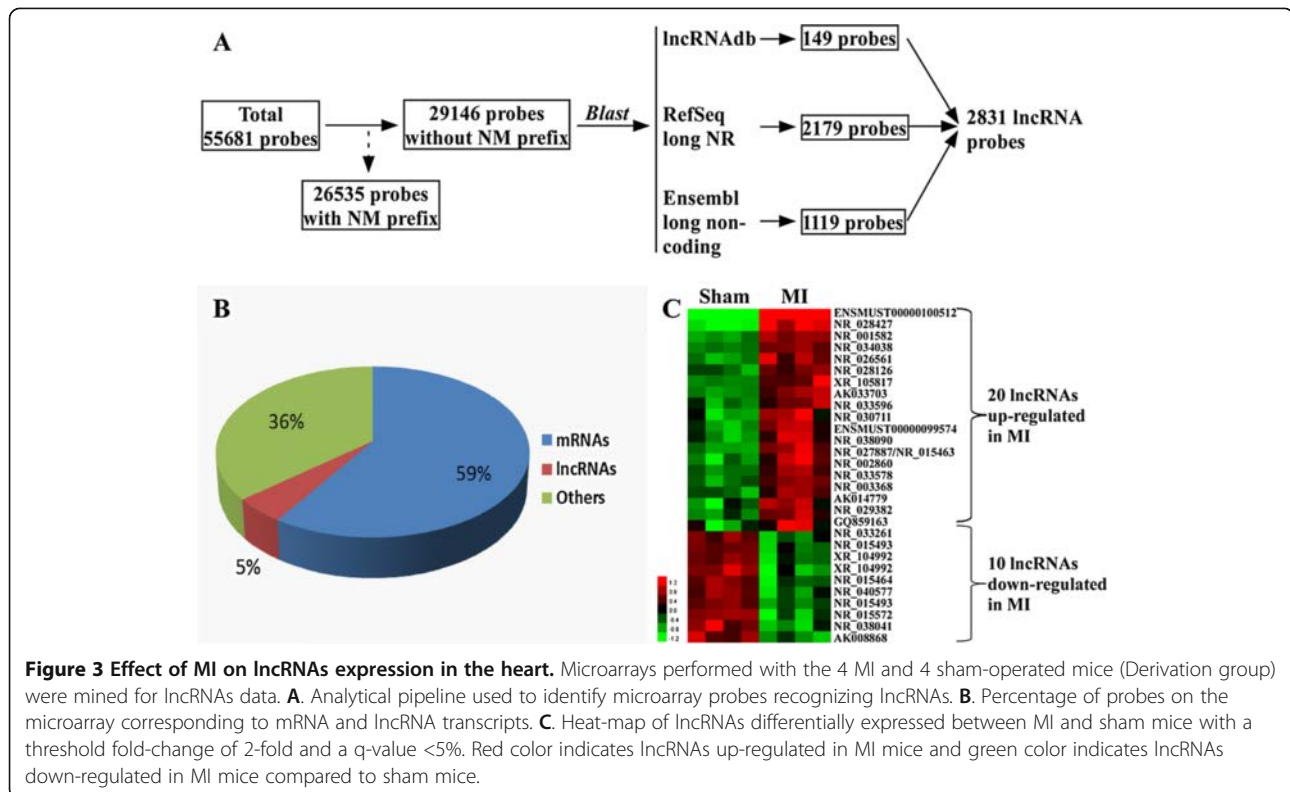


**Figure 2 Microarray analysis.** Cardiac transcriptome of 4 sham-operated mice and 4 MI mice (derivation group) was characterized 24 hours after surgery using microarrays. **A.** Principal component analysis showing the ability of gene expression data to discriminate MI mice from sham-operated mice. **B.** M-A plot showing the distribution of the genes in the dataset. The vertical axis displays log<sub>2</sub> transformed-fold change and the horizontal axis displays the average signal of each gene. **C.** Heatmap of differentially expressed genes. For B and C, red color indicates genes up-regulated in MI mice and green color indicates genes down-regulated in MI mice compared to sham mice. Black color indicates genes with comparable expression between MI and sham mice. Significance threshold was 2-fold with a q-value <5%.

inflammation-related pathways (such as Cytokine-cytokine receptor interaction pathway, Chemokine signaling pathway, and Toll-like receptor signaling pathway) (Additional file 1: Table S2).

We developed an analytical pipeline to extract lncRNA data from microarrays (Figure 3A). From the 55681 probes contained in the microarrays, we identified 26535 (48%) probes corresponding to transcripts with NM

prefix (i.e. mature messenger RNAs, mRNAs). From the remaining 29146 probes, we identified 2831 probes corresponding to lncRNAs represented in lncRNadb, RefSeq or Ensembl ncRNA database. These 2831 probes correspond to 5% of all probes on the microarray (Figure 3B). From the 2831 probes, significance analysis of microarrays identified 20 lncRNAs significantly up-regulated in the MI group and 10 lncRNAs down-regulated in the MI group



(Figure 3C and Table 1). Therefore, this discovery phase allowed the identification of 30 lncRNAs regulated after MI.

### Validation of the effect of MI on lncRNAs

We sought to confirm by quantitative PCR the differential expression of the top 10 lncRNAs identified in microarray experiments in the derivation group (5 up-regulated and 5 down-regulated in MI mice compared to sham mice).

First, we used the RNA samples of the 8 mice enrolled in microarray experiments (Derivation group). We observed that some lncRNAs, such as NR\_002860, were expressed at a high level, whereas others, such as AK008868, were expressed at a low level (Figure 4A). Differential expression was confirmed for 8 of the top 10 lncRNAs. Differential expression was not confirmed for AK008868, presumably due to its low level of expression and therefore low accuracy of its quantification by PCR. For NR\_001582, the differential expression was present albeit not statistically significant. Noteworthy, 2 lncRNAs displayed robust up-regulation in the MI group: NR\_028427 (6-fold,  $P = 0.03$ ) and ENSMUST00000100512 (12-fold,  $P = 0.03$ ). This is consistent with microarray results in which these 2 lncRNAs were also the most highly up-regulated in MI mice (5-fold and 13-fold for NR\_028427 and ENSMUST00000100512, respectively; Table 1). We named NR\_028427 as Myocardial Infarction-Associated Transcript 1 (MIRT1) and ENSMUST00000100512 as MIRT2.

Second, we measured the expression levels of the same top 10 lncRNAs in an independent validation group of 16 mice (8 sham and 8 MI). The results obtained were very similar to that of the derivation group (Figure 4B). Indeed, differential expression was confirmed for 7 of the 10 lncRNAs. Statistical significance was lost for NR\_038041, although the trend remained the same (slight down-regulation in the MI group). Most importantly, MIRT1 and MIRT2 were, like in the derivation group, the most up-regulated lncRNAs in MI mice, with increases of 9-fold ( $P < 0.001$ ) and 16-fold ( $P < 0.001$ ), respectively.

Third, 21 additional mice were enrolled in a time-course analysis. Mice were subjected to coronary ligation and sacrificed after 1, 3, 6, 16, 24, 48, and 72 hours ( $n = 3$  per time-point). Hearts were harvested and expression of MIRT1 and MIRT2 was assessed by quantitative PCR (Figure 4C). Expression of MIRT1 and MIRT2 displayed progressive increases after induction of MI, reaching a maximum of 10-fold and 19-fold after 24 hours.

Collectively, these results show that MI induces significant changes in lncRNAs expression in the heart.

### Localisation of MIRT1 in the heart

Three additional mice were subjected to coronary ligation and 3 were sham-operated. The presence of MIRT1 in the heart 24 hours after surgery was revealed using in situ hybridization. As displayed in Figure 5A, MIRT1 expression

**Table 1 LncRNAs differentially expressed between MI (n = 4) and sham-operated (n = 4) mice as determined by microarrays using a fold-change >2 and a q-value <5%**

| Agilent systematic name     | Agilent gene symbol | Identified lncRNA  | Fold change | q-value(%) |
|-----------------------------|---------------------|--|-------------|------------|
| ENSMUST00000100512          | Gm10872             | NR_045747 (Gm10872)  | 13.54       | 0.00       |
| NR_028427                   | 5830416P10Rik       | NR_028427 (5830416P10Rik)  | 5.24        | 0.00       |
| NR_002860                   | A130040M12Rik       | VL30   | 2.71        | 0.00       |
| chr2:158169020-158191295_R  |                     | NR_027887 NR_015463 (9430008C03Rik)  | 2.64        | 0.05       |
| NR_001582                   | Speer5-ps1          | NR_027506 NR_001582 (Speer5-ps1)   | 2.63        | 0.00       |
| NR_026561                   | Gm8884              | NR_026561 (Gm8884)   | 2.56        | 0.00       |
| NR_030711                   | 2210403K04Rik       | NR_030711 (Mir22hg)  | 2.49        | 0.26       |
| AK033703                    | Hmga2-ps1           | NR_037996 (Hmga2-ps1)  | 2.48        | 0.00       |
| XR_105817                   | 3300005D01Rik       | NR_045080 NR_045081 NR_045079 (3300005D01Rik)  | 2.34        | 0.00       |
| chr5:23195569-23218551_F    |                     | NR_038090 (Al506816)   | 2.33        | 0.16       |
| ENSMUST00000099574          | Gm10791             | NR_045889 (Gm10791)  | 2.31        | 0.00       |
| AK014779                    | 4833427F10Rik       | NR_045459 (4833427F10Rik)  | 2.30        | 0.26       |
| chr5:100849748-100858532_R  |                     | Adapt33 (NR_034038.1 Mouse 5430416N02Rik)  | 2.20        | 0.00       |
| chr19:5771425-5848475_F     |                     | NEAT1  | 2.23        | 3.43       |
| chr14:115443612-115445950_F |                     | NR_029382 (Mir17hg)  | 2.16        | 0.16       |
| NR_033578                   | Gm15645             | NR_033578 (Gm15645)  | 2.13        | 0.00       |
| NR_033596                   | 5730416F02Rik       | NR_033596 (5730416F02Rik)  | 2.11        | 0.05       |
| chr5:74487385-74497428_F    |                     | NR_015531 (2700023E23Rik)  | 2.09        | 0.00       |
| NR_003368                   | Pvt1                | NR_003368 (Pvt1)   | 2.05        | 0.05       |
| NR_028126                   | 6330407A03Rik       | NR_028126 (6330407A03Rik)  | 2.01        | 0.00       |
| ENSMUST00000161216          |                     | ENSMUST00000161216 (2310075C17Rik)   | 0.36        | 1.82       |
| NR_015572                   | 1810014B01Rik       | NR_015572 (1810014B01Rik)  | 0.38        | 1.82       |
| chr10:69669025-69686275_F   |                     | NR_038041 (2310015B20Rik)  | 0.39        | 1.82       |
| AK008868                    | 2210409D07Rik       | NR_045360 (2210409D07Rik)  | 0.42        | 1.82       |
| chr4:11899775-11931875_F    |                     | NR_040577 (1700123M08Rik)  | 0.46        | 1.82       |
| NR_015464                   | A330069E16Rik       | NR_015464 (A330069E16Rik)  | 0.46        | 1.82       |
| XR_104992                   | 2310040G24Rik       | NR_040292 NR_040293 (2310040G24Rik)  | 0.47        | 1.82       |
| chr11:16831925-16851121_R   |                     | ENSMUST00000130392 ENSMUST00000139493 <br>ENSMUST00000123734 ENSMUST00000136053 <br>ENSMUST00000129735 (2810442I21Rik) | 0.49        | 0.48       |
| NR_033261                   | Gm14492             | NR_033261 (Gm14492)  | 0.49        | 3.43       |
| chrX:106029816-106082235_F  |                     | NR_015493 (2810403D21Rik)  | 0.50        | 3.43       |

was up-regulated in the healthy part of the left ventricle of MI mice (remote area). In situ hybridization of MIRT1 coupled with immunostaining of cardiomyocytes (sarcomeric alpha-actinin), fibroblasts (vimentin) and leukocytes (CD45) revealed that MIRT1 was expressed by fibroblasts (Figure 5B).

#### Correlation between lncRNAs, infarct size and LV function

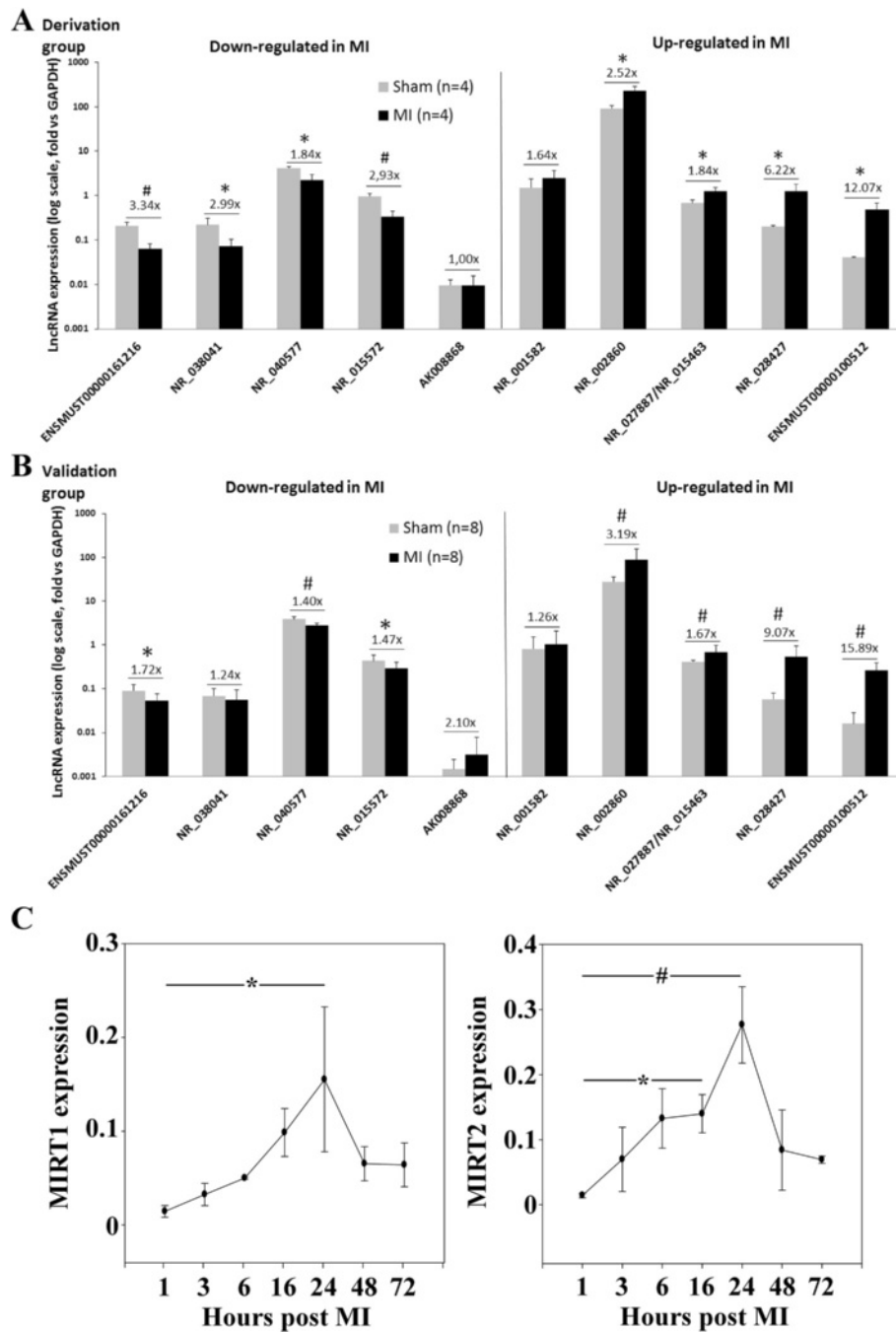
We investigated the correlation between expression levels of the top 10 lncRNAs, infarct size and LV function as assessed by FDG-PET in the 4 MI mice of the derivation group, 24 hours after coronary ligation. There was no statistically significant correlation at the 5% level,

presumably due to the low number of mice (Table 2). Nevertheless, relatively strong negative associations were observed between expression levels of MIRT1, MIRT2, and infarct size (correlation coefficients of -0.80). On the other hand, positive associations could be noticed between MIRT1, MIRT2 and EF (correlation coefficients of 0.85 and 0.80, respectively), suggesting that MIRT1 and MIRT2 may beneficially affect LV remodeling post MI.

#### Association between MIRT1, MIRT2, and LV remodeling

To gain further insight into the potential role of MIRT1 and MIRT2 into LV remodeling, we used the following approach. First, we identified a list of 47 genes known to

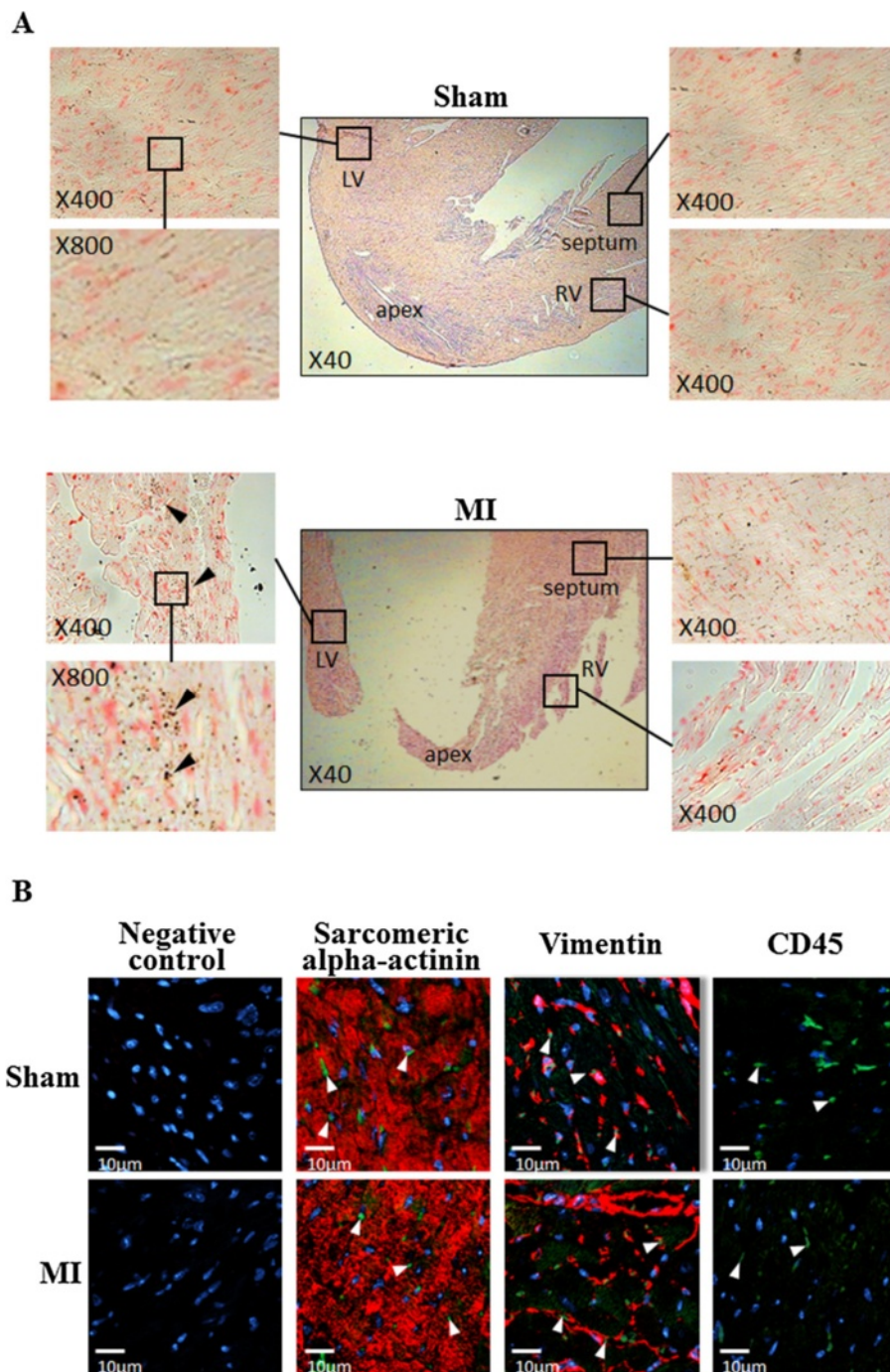




**Figure 4 Quantitative assessment of lncRNAs in the heart.** Expression of the top 10 lncRNAs identified as differentially expressed between MI and sham-operated mice in microarray experiments was quantified using quantitative RT-PCR, first (A) in the derivation group of 8 mice (4 sham and 4 MI), and then (B) in an independent validation group of 16 mice (8 sham and 8 MI). lncRNAs expression is shown relative to GAPDH (log scale). \*P < 0.05; #P < 0.001 vs. sham-operated mice. (C) Time-course analysis of MIRT1 and MIRT2 in 21 additional mice subjected to coronary ligation and sacrificed after 1, 3, 6, 16, 24, 48, and 72 hours (n = 3 per time-point). \*P < 0.05; #P < 0.001 vs 1 h time-point.

be involved in remodeling using the keywords (“myocardial infarction” AND “ventricular remodeling”) AND (“homo sapiens”[Organism] OR “mus musculus”[Organism]) as a query to NCBI Gene database (=“remodeling genes”). Among these 47 remodeling genes, 38 genes

were detected on microarrays. Then, we used the microarray data of the derivation group of 4 sham-operated and 4 MI mice to determine the correlation between the expression values of these 38 remodeling genes and the expression values of MIRT1 and MIRT2. This allowed



**Figure 5 Localisation of MIRT1 in the heart. (A)** In situ hybridization revealed that MIRT1 was present mostly in the remote area of the left ventricle, with higher expression observed in MI mice. Representative pictures from 3 sham and 3 MI mice are shown. Arrowheads point to areas with high expression of MIRT1. LV: left ventricle; RV: right ventricle. **(B)** In situ hybridization coupled to immunostaining revealed that MIRT1 was expressed by cardiac fibroblasts. Sarcomeric alpha-actinin was used to stain cardiomyocytes, vimentin was used for fibroblasts, and the pan-leukocyte antigen CD45 was used for leukocytes. MIRT1 staining appears in green color and is indicated by white arrow heads. Sarcomeric alpha-actinin, vimentin and CD45 appear in red color. Nuclei are blue. Negative control was performed by omission of primary antibody. Magnification: x400.

building networks of correlation between the lncRNAs and the 38 remodeling genes (Figure 6A). MIRT1 was significantly correlated with 18 remodeling genes, and

MIRT2 was significantly correlated with 17 remodeling genes. Interestingly, while both lncRNAs were correlated with the same remodeling genes, Lif was only correlated

**Table 2 Correlation between lncRNAs expression, infarct size and LV function as assessed by FDG-PET in 4 mice with MI of the derivation group**

|                            | Infarct size | EDV          | ESV          | EF           |
|----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ENSMUST00000161216         | -0.20 (0.92) | 0.38 (0.62)  | 0.20 (0.80)  | -0.14 (0.86) |
| NR_038041                  | -0.80 (0.33) | -0.07 (0.93) | -0.57 (0.43) | 0.75 (0.25)  |
| NR_040577                  | -0.40 (0.75) | 0.56 (0.44)  | 0.01 (0.99)  | 0.36 (0.64)  |
| NR_015572                  | -0.20 (0.92) | 0.10 (0.90)  | -0.20 (0.80) | 0.27 (0.73)  |
| AK008868                   | 0 (1)        | -0.95 (0.05) | -0.69 (0.31) | 0.29 (0.71)  |
| NR_001582                  | 0.40 (0.75)  | -0.89 (0.11) | -0.59 (0.41) | 0.17 (0.83)  |
| NR_002860                  | -0.40 (0.75) | 0.76 (0.24)  | 0.50 (0.50)  | -0.10 (0.90) |
| NR_027887/NR_015463        | -0.20 (0.92) | 0.46 (0.54)  | 0.19 (0.81)  | 0.16 (0.84)  |
| NR_028427 (MIRT1)          | -0.80 (0.33) | -0.48 (0.52) | -0.75 (0.25) | 0.85 (0.15)  |
| ENSMUST00000100512 (MIRT2) | -0.80 (0.33) | 0.60 (0.42)  | 0.00 (1.00)  | 0.80 (0.33)  |

Correlation coefficients (P value) are indicated.

with MIRT1 and Nos3 was only correlated with MIRT2 (Figure 6A, right network). Figure 6B lists the 10 strongest correlations between lncRNAs and remodeling genes whose expression was regulated after MI. Correlations were highly robust, with coefficients close to 1 for some gene pairs. Finally, we characterized the regulation of the expression of some remodeling genes in the group of 21 mice sacrificed at different time-points post MI (Figure 6C). All genes were up-regulated. We also measured Nppb, which encodes BNP, and we observed that, while most remodeling genes remained elevated 3 days after MI, Nppb had returned to baseline levels after 48 hours. This kinetic was similar to that of MIRT1 and MIRT2.

Together, these data support an association between the lncRNAs MIRT1 and MIRT2, and genes known to be involved in LV remodeling.

## Discussion

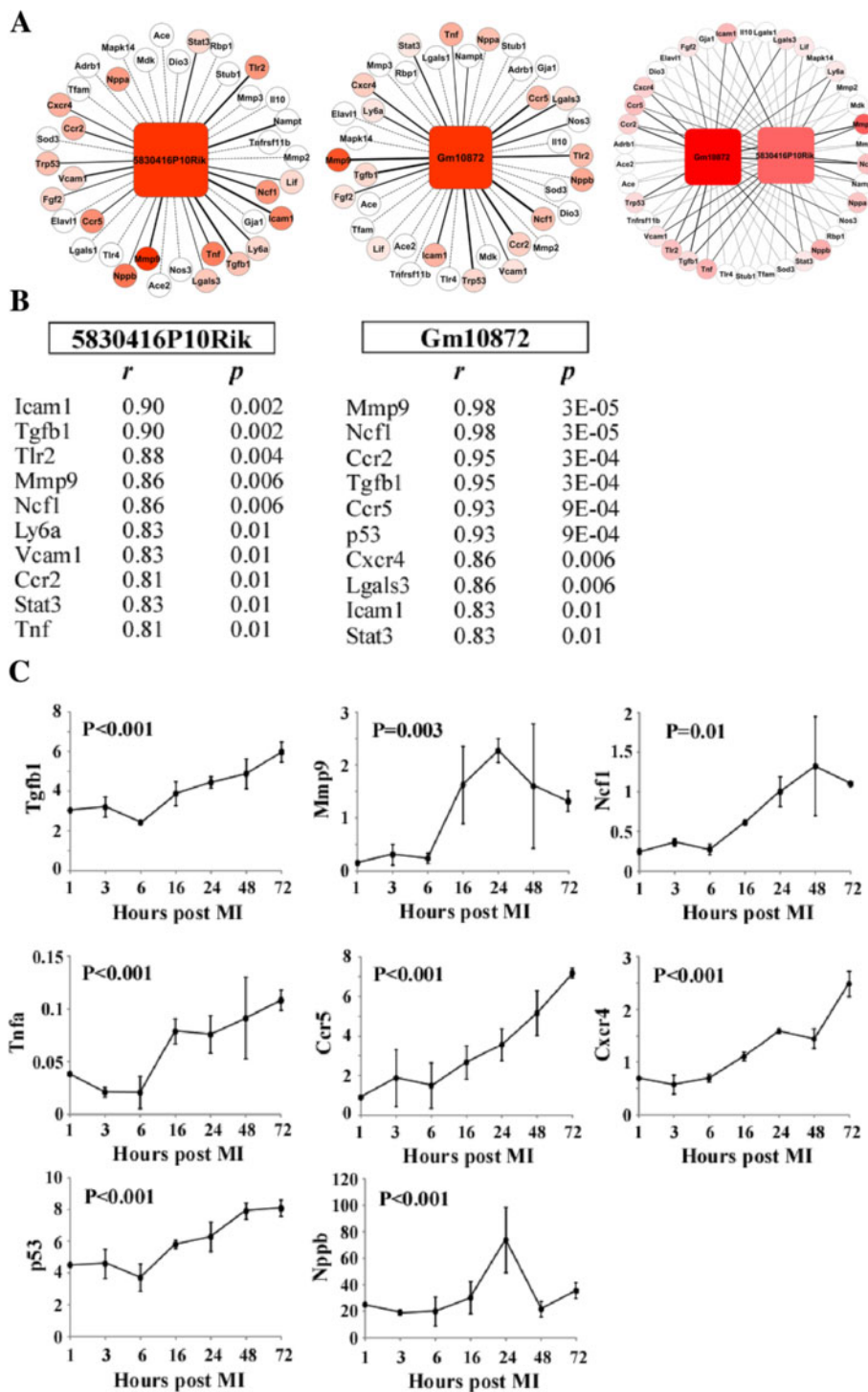
In this study, we observed for the first time that MI induces a significant regulation of the expression of lncRNAs in the heart. Some of these lncRNAs were correlated with protein coding genes known to be involved in LV remodeling. These lncRNAs constitute novel candidates for future investigations of the therapeutic value of lncRNAs.

Four groups of mice were used in this study. First, a derivation group of 8 mice was used to profile the expression of lncRNAs using microarrays. FDG-PET exams scheduled 24 hours after induction of MI allowed to characterize infarct size and LV function. In average, infarct covered one fourth of the left ventricle. EF was reduced by 36% 24 hours after induction of MI, which attests for a significant loss of LV function. End-diastolic and end-systolic volumes were increased, consistently with LV dilatation. Second, a validation group of 8 independent mice was used to confirm microarray data. Third, a kinetic using 21 additional mice allowed characterizing the evolution of the expression of

lncRNAs in the cardiac tissue after induction of MI. Fourth, 6 mice were used to study the localization of lncRNAs in the infarcted heart. This experimental design supports the robustness of our findings.

A whole genome microarray was used for the discovery phase of our study. We observed that MI affected the expression of a significant number of genes (704), allowing a clear discrimination of MI mice from sham-operated mice. Many of these genes had a known link with the regulation of inflammation. This was expected considering that mice were sacrificed in the early inflammatory phase that occurs in the first 24 hours post MI. Of note, this time-point was chosen to identify early triggers of LV remodeling which could be used to blunt or inhibit the development of LV remodeling at a very early stage after MI.

An in-house analytical pipeline was developed to extract lncRNAs data from microarrays. A similar approach has already been used elsewhere [31]. We could identify 30 lncRNAs whose expression was regulated more than 2-fold and with a q-value <5% following MI. Of note, 12 of these 30 lncRNAs were also dysregulated in the heart of isoproterenol-treated mice [15]. We then focused on the 2 lncRNAs most differentially expressed between MI mice and sham-operated mice, MIRT1 and MIRT2. Up-regulation of these lncRNAs after MI was consistently observed in all groups of mice, and peaked after 24 hours. This up-regulation might be, at least in part, attributed to infiltration of inflammatory cells into the heart. This is supported by microarray data showing an up-regulation of the leukocyte marker CD45 in MI mice compared to sham mice (2.1-fold) and of the monocyte/macrophage marker CD68 (1.6-fold). However, CD45-positive leukocytes could not be detected by immunostaining in the remote area of the heart where MIRT1 expression is observed. This suggested that the increase of CD45 and CD68 measured by microarrays





(See figure on previous page.)

**Figure 6 Correlation between lncRNAs and remodeling genes.** Microarray data from the derivation group of 4 sham-operated and 4 MI mice were used in these analyses. **A.** Networks indicating the strength of the correlation between the lncRNAs MIRT1 and MIRT2 and 38 coding genes known to be involved in remodeling ("remodeling genes"). Remodeling genes differentially expressed between sham-operated and MI mice are coloured, with darker colour indicating a strong differential expression. Red colour indicates a higher level of expression in MI mice compared to sham-operated mice. Remodeling genes unaffected by MI are in white circles. A q-value <5% was used as threshold for differential expression between sham and MI mice (significance analysis of microarrays method). The thickness of the edges indicates the strength of the correlation between the lncRNAs and remodeling genes. Dotted lines indicate no correlation. A p-value <0.05 was used as significance threshold for correlation (Spearman's rank correlation and Student's test). **B.** List of the remodeling genes significantly ( $p < 0.05$ ) correlated with lncRNAs and differentially expressed between sham-operated and MI mice.  $r$  indicates correlation coefficient and  $p$  indicates p-value. **C.** Kinetic of the expression of remodeling genes after MI. The 21 mice sacrificed at different time-points after MI were used in these analyses ( $n = 3$  per time-point). P values obtained by ANOVA are indicated.

come from inflammatory cells that are infiltrated in the infarct lesion. In situ hybridization coupled to immunohistochemistry confirmed that MIRT1 is mainly expressed by fibroblasts within the remote area of the left ventricle. Furthermore, expression levels of MIRT1 and MIRT2 appeared to be negatively correlated with infarct size and positively correlated with EF. Although this is consistent with the known impact of infarct size on LV function, large infarcts inducing a deterioration of LV function with decreased EF, it also strengthens our assumption that expression levels of MIRT1 and MIRT2 are not a mere consequence of inflammation.

Inflammation is an important component of the remodeling process. To address a potential link between the up-regulation of MIRT1 and MIRT2, and LV remodeling, we used microarray data to determine the correlations between the expression values of genes known to be involved in LV remodeling, and the expression values of MIRT1 and MIRT2. Strong correlations were observed, suggesting that these 2 lncRNAs may functionally regulate LV remodeling. However, this remains to be further explored and the contribution of these lncRNAs in the remodeling process further demonstrated.

It would be tempting to investigate the expression of MIRT1 and MIRT2 lncRNAs in the human failing heart. However, there are no known homologs of these lncRNAs in human.

In network analyses, both lncRNAs generally correlated with the same remodeling genes, except for *Lif*, which was only correlated with MIRT1 and *Nos3*, which was only correlated with MIRT2. This finding deserves further independent validation. The possible interaction between MIRT1 and *Lif* on one hand, and between MIRT2 and *Nos3* on the other hand, as well as its potential role in LV remodeling, needs to be further addressed.

*Nppb*, the gene which encodes BNP, was correlated with MIRT1 and showed a 4-fold increase in expression after MI, peaking after 24 hours and returning to baseline levels after 48 hours. This kinetic was different from other tested remodeling genes, which all remained elevated until at least 72 hours after induction of MI. This observation merits to be validated but already points out a possible interaction between MIRT1 and BNP.

*Lgals3*, which encodes the lectin galactoside-binding soluble 3, more commonly known as galectin-3, was significantly correlated with MIRT1 and MIRT2. This observation is relevant and in line with the role of galectin-3 in fibrosis and with its recently characterized value as biomarker of heart failure [32,33]. However, no evident relationship could be evidenced between circulating levels of galectin-3 and LV remodeling in survivors of acute MI [34].

Overall, our results suggest that lncRNAs may be involved in the regulation of several pathophysiological pathways leading to LV remodeling: inflammation (TNF), extracellular matrix turnover (MMP9), fibrosis (TGFB1 and LGALS3), apoptosis (p53).

## Conclusion

This hypothesis-generating study has led to the discovery of novel lncRNAs that may play functional roles in LV remodeling post MI. Further investigations are required to demonstrate the therapeutic potential of these lncRNAs.

## Availability of supporting data

The data set supporting the results of this article is available in the NCBI Gene Expression Omnibus repository [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>] under the accession number GSE46395.

## Additional file

**Additional file 1: Online supplement. Table S1.** Real-time quantitative PCR primers. **Table S2.** Mining of microarray data using the DAVID database. **Figure S1.** Detailed analytical pipeline for microarray experiments.

## Competing interest

The authors declare that they have no competing interest.

## Authors' contributions

JZ performed mice experiments and ex vivo experiments. LZ designed the microarray analytical pipeline and acquired microarray data. MV performed microarray and PCR. PYM and FM contributed to positron emission tomography exams. DRW critically reviewed the manuscript. YD designed the study, analysed data and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgments

This work was supported by the Ministry of Higher Education and Health of Luxembourg. JZ was supported by a fellowship from the National Fund of Research of Luxembourg (grant PhD-AFR 3972501). We thank Christelle Nicolas, Justine Gofinet, Sylvain Poussier, Henry Boutley and Mickael Lhuillier for expert technical assistance.

## Author details

<sup>1</sup>Laboratory of Cardiovascular Research, Centre de Recherche Public de la Santé (CRP – Santé), 84 Val Fleuri, Luxembourg L1526, Luxembourg.

<sup>2</sup>Nancyclopet Experimental Imaging Platform, Nancy, France. <sup>3</sup>Division of Cardiology, Centre Hospitalier, Luxembourg, Luxembourg.

Received: 28 February 2014 Accepted: 4 June 2014

Published: 10 June 2014

## References

- Allender S, Scarborough P, Peto V, Rayner M, Leal J, Luengo-Fernandez R, Gray A: **European Cardiovascular Disease Statistics. 2008 Edition.** 2008.
- Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Soliman EZ, et al: **Heart disease and stroke statistics—2012 update: a report from the American Heart Association.** *Circulation* 2012, **125**:e2–e220.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nussbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrum J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, et al: **Initial sequencing and analysis of the human genome.** *Nature* 2001, **409**:860–921.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, et al: **The sequence of the human genome.** *Science* 2001, **291**:1304–1351.
- Cheng J, Kapranov P, Drenkow J, Dike S, Brubaker S, Patel S, Long J, Stern D, Tammana H, Helt G, Sementchenko V, Piccolboni A, Bekiranov S, Bailey DK, Ganesh M, Ghosh S, Bell I, Gerhard DS, Gingeras TR: **Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution.** *Science* 2005, **308**:1149–1154.
- Consortium EP, Dunham I, Kundaje A, Aldred SF, Collins PJ, Davis CA, Doyle F, Epstein CB, Frietze S, Harrow J, Kaul R, Khatun J, Lajoie BR, Landt SG, Lee BK, Pauli F, Rosenbloom KR, Sabo P, Safi A, Sanyal A, Shores N, Simon JM, Song L, Trinklein ND, Altshuler RC, Birney E, Brown JB, Cheng C, Djebali S, Dong X, et al: **An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome.** *Nature* 2012, **489**:57–74.
- Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, Tanzer A, Lagarde J, Lin W, Schlesinger F, Xue C, Marinov GK, Khatun J, Williams BA, Zaleski C, Rozowsky J, Roder M, Kococinski F, Abdelhamid RF, Alioto T, Antoshechkin I, Baer MT, Bar NS, Batut P, Bell K, Bell I, Chakraborty S, Chen X, Chrast J, Curado J, et al: **Landscape of transcription in human cells.** *Nature* 2012, **489**:101–108.
- Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP: **Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels.** *Nature* 2010, **466**:835–840.
- Wahlestedt C: **Targeting long non-coding RNA to therapeutically upregulate gene expression.** *Nat Rev Drug Discov* 2013, **12**:433–446.
- Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, Oyama R, Ravasi T, Lenhard B, Wells C, Kodzius R, Shimokawa K, Bajic VB, Brenner SE, Batalov S, Forrest AR, Zavolan M, Davis MJ, Wilming LG, Aidinis V, Allen JE, Ambesi-Impiombato A, Apweiler R, Aturaliya RN, Bailey TL, Bansal M, Baxter L, Beisel KW, Bersano T, Bono H, et al: **The transcriptional landscape of the mammalian genome.** *Science* 2005, **309**:1559–1563.
- Kapranov P, Cheng J, Dike S, Nix DA, Duttagupta R, Willingham AT, Stadler PF, Hertel J, Hackermuller J, Hofacker IL, Bell I, Cheung E, Drenkow J, Dumais E, Patel S, Helt G, Ganesh M, Ghosh S, Piccolboni A, Sementchenko V, Tammana H, Gingeras TR: **RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription.** *Science* 2007, **316**:1484–1488.
- Klattenhoff CA, Scheuermann JC, Surface LE, Bradley RK, Fields PA, Steinhauser ML, Ding H, Butty VL, Torrey L, Haas S, Abo R, Tabebordbar M, Lee RT, Burge CB, Boyer LA: **Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment.** *Cell* 2013, **152**:570–583.
- Grote P, Wittler L, Hendrix D, Koch F, Wahrsch S, Beisaw A, Macura K, Blass G, Kellis M, Werber M, Herrmann BG: **The tissue-specific lncRNA Fendrr is an essential regulator of heart and body wall development in the mouse.** *Dev Cell* 2013, **24**:206–214.
- Ishii N, Ozaki K, Sato H, Mizuno H, Saito S, Takahashi A, Miyamoto Y, Ikegawa S, Kamatani N, Hori M, Saito S, Nakamura Y, Tanaka T: **Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction.** *J Hum Genet* 2006, **51**:1087–1099.
- Li D, Chen G, Yang J, Fan X, Xu G, Cui Q, Geng B: **Transcriptome analysis reveals distinct patterns of long noncoding RNAs in heart and plasma of mice with heart failure.** *PLoS One* 2013, **8**:e77938.
- Yang KC, Yamada KA, Patel AY, Topkara VK, George I, Cheema FH, Ewald GA, Mann DL, Nerbonne JM: **Deep RNA sequencing reveals dynamic regulation of myocardial noncoding RNA in failing human heart and remodeling with mechanical circulatory support.** *Circulation* 2014, **129**:1009–1021.
- Poussier S, Maskali F, Tran N, Person C, Maureira P, Boutley H, Karcher G, Lacolley P, Regnault V, Fay R, Marie PY: **ECG-triggered (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging of the rat heart is dramatically enhanced by acipimox.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010, **37**:1745–1750.
- Cerqueira MD, Weissman NJ, Dilsizian V, Jacobs AK, Kaul S, Laskey WK, Pennell DJ, Rumberger JA, Ryan T, Verani MS: **Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart: a statement for healthcare professionals from the Cardiac Imaging Committee of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association.** *Circulation* 2002, **105**:539–542.
- Germano G, Kiat H, Kavanagh PB, Moriel M, Mazzanti M, Su HT, Van Train KF, Berman DS: **Automatic quantification of ejection fraction from gated myocardial perfusion SPECT.** *J Nucl Med* 1995, **36**:2138–2147.
- Smyth GK, Michaud J, Scott HS: **Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments.** *Bioinformatics* 2005, **21**:2067–2075.
- Huber W, von Heydebreck A, Sultmann H, Poustka A, Vingron M: **Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression.** *Bioinformatics* 2002, **18**:S96–S104.
- Coombes K: **ClassDiscovery: Classes and methods for “class discovery” with microarrays or proteomics.** *R package version* 2009, 2.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: **Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:5116–5121.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D: **Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:14863–14868.
- da Huang W, Sherman BT, Tan Q, Collins JR, Alvord WG, Roayaei J, Stephens R, Baseler MW, Lane HC, Lempicki RA: **The DAVID gene functional classification tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists.** *Genome Biol* 2007, **8**:R183.
- Amaral PP, Clark MB, Gascoigne DK, Dinger ME, Mattick JS: **lncRNADB: a reference database for long noncoding RNAs.** *Nucleic Acids Res* 2011, **39**:D146–151.
- Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR: **NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**:D501–504.
- Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, Chen Y, Clapham P, Coates G, Fairley S, Fitzgerald S, Gordon L, Hendrix M, Hourlier T, Johnson N, Kähäri A, Keefe D, Keenan S, Kinsella R, Kokocinski F, Kulesha E, Larsson P, Longden I, McLaren W, Overduin B, Pritchard B, Riat HS, Rios D, Ritchie GR, Ruffier M, Schuster M, et al: **Ensembl 2011.** *Nucleic Acids Res* 2011, **39**:D800–D806.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL: **BLAST+: architecture and applications.** *BMC Bioinformatics* 2009, **10**:421.
- Langfelder P, Horvath S: **WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis.** *BMC Bioinformatics* 2008, **9**:559.
- Michelhaugh SK, Lipovich L, Blythe J, Jia H, Kapatos G, Bannon MJ: **Mining Affymetrix microarray data for long non-coding RNAs: altered expression in the nucleus accumbens of heroin abusers.** *J Neurochem* 2011, **116**:459–466.

32. Motiwala SR, Szymonifka J, Belcher A, Weiner RB, Baggish AL, Sluss P, Gaggin HK, Bhardwaj A, Januzzi JL: **Serial measurement of galectin-3 in patients with chronic heart failure: results from the ProBNP Outpatient Tailored Chronic Heart Failure Therapy (PROTECT) study.** *Eur J Heart Fail* 2013, **15**:1157–1163.
33. van der Velde AR, Gullestad L, Ueland T, Aukrust P, Guo Y, Adourian A, Muntendam P, van Veldhuisen DJ, de Boer RA: **Prognostic Value of Changes in Galectin-3 Levels Over Time in Patients With Heart Failure: Data From CORONA and COACH.** *Circ Heart Fail* 2013, **6**:219–226.
34. Weir RAP, Petrie CJ, Murphy CA, Clements S, Steedman T, Miller AM, McInnes IB, Squire IB, Ng LL, Dargie HJ, McMurray JJV: **Galectin-3 and cardiac function in survivors of acute myocardial infarction.** *Circ Heart Fail* 2013, **6**:492–498.

doi:10.1186/1471-2164-15-460

**Cite this article as:** Zangrando *et al.*: Identification of candidate long non-coding RNAs in response to myocardial infarction. *BMC Genomics* 2014 **15**:460.

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)





# Long noncoding RNAs in cardiac development and ageing

Yvan Devaux, Jennifer Zangrando, Blanche Schroen, Esther E. Creemers, Thierry Pedrazzini, Ching-Pin Chang, Gerald W. Dorn II, Thomas Thum and Stephane Heymans for the Cardioline network

**Abstract** | A large part of the mammalian genome is transcribed into noncoding RNAs. Long noncoding RNAs (lncRNAs) have emerged as critical epigenetic regulators of gene expression. Distinct molecular mechanisms allow lncRNAs either to activate or to repress gene expression, thereby participating in the regulation of cellular and tissue function. lncRNAs, therefore, have important roles in healthy and diseased hearts, and might be targets for therapeutic intervention. In this Review, we summarize the current knowledge of the roles of lncRNAs in cardiac development and ageing. After describing the definition and classification of lncRNAs, we present an overview of the mechanisms by which lncRNAs regulate gene expression. We discuss the multiple roles of lncRNAs in the heart, and focus on the regulation of embryonic stem cell differentiation, cardiac cell fate and development, and cardiac ageing. We emphasize the importance of chromatin remodelling in this regulation. Finally, we discuss the therapeutic and biomarker potential of lncRNAs.

Devaux, Y. *et al.* *Nat. Rev. Cardiol.* advance online publication 7 April 2015; doi:10.1038/nrcardio.2015.55

## Introduction

Translation mechanisms of eukaryotic genes containing open reading frames and producing functional proteins are well established. The remaining DNA, not encoding messenger RNA (mRNA) and, therefore, not leading to protein production, was formerly considered 'junk DNA'.<sup>1</sup> However, technological advances have allowed improved characterization of what are now called 'noncoding RNAs', which contribute to the complexity of organisms—the number of coding genes does not differ between a worm and a human, whereas noncoding RNAs are far more numerous in the latter. Noncoding RNAs have emerged as powerful regulators of cellular and tissue function and, therefore, can be used as diagnostic and prognostic markers, potentially allowing stratified health care and therapeutic intervention.<sup>2–5</sup> Long noncoding RNAs (lncRNAs) are among the several families of noncoding RNAs that have arisen. The number of lncRNAs in the human genome is estimated to be equal to, or even to exceed, the number of protein-coding genes.<sup>6</sup> Initially considered 'dark matter of the genome',<sup>7</sup> lncRNAs can now be regarded as critical epigenetic regulators of gene expression.<sup>8</sup> Studies have revealed that lncRNAs have important roles in healthy and diseased hearts. In this Review, we discuss the current understanding of the roles of lncRNAs in cardiac development and ageing.

## lncRNA classification and mechanisms

### Definition

Analysis of the human genome first led to the identification of long sequences of noncoding RNAs, such as

ribosomal (rRNA) and transfer RNA (tRNA). Subsequently, other types of long noncoding RNA sequences, not translated into proteins, have been discovered. These sequences resemble mRNAs in several ways—they are transcribed by RNA polymerase II, 5'-capped, spliced, and polyadenylated at the 3' end—but they do not encode proteins and are generally expressed at low levels compared with those of protein-coding genes. Consequently, lncRNAs were first defined as mRNA-like noncoding RNAs.<sup>7</sup>

Interest in noncoding RNAs greatly increased after the discovery by the ENCODE consortium that <2% of the human genome is transcribed into protein-coding RNA.<sup>9</sup> High-throughput RNA sequencing and computational analyses substantially improved characterization of noncoding RNAs, and the definition of lncRNAs became more specific, with an arbitrary criterion of length. lncRNAs are defined as being noncoding RNA sequences of >200 nucleotides that regulate target-gene expression; can be categorized as being intergenic, intronic, bidirectional, enhancer, sense, or antisense; and can have a mechanism of action classed as being signal, decoy, guide, or scaffold (as described below).

Noncoding RNAs have been divided into two main groups: small noncoding RNAs that are <200 nucleotides, and lncRNAs containing >200 nucleotides.<sup>10</sup> However, this threshold was arbitrarily defined according to protocols of RNA isolation. In 2011, Amaral *et al.* proposed to refine this definition as follows: lncRNAs are noncoding RNAs that can have a function as either primary or spliced transcripts, are independent of processing into known classes of small RNAs (microRNAs [miRNAs], piwi-interacting RNAs [piRNAs], and others)

Luxembourg  
Institute of Health,  
L-1526 Luxembourg,  
Luxembourg (Y.D., J.Z.).  
Maastricht University  
Medical Centre,  
6211 LK Maastricht,  
Netherlands (B.S.,  
S.H.). Academic  
Medical Center,  
1105AZ Amsterdam,  
Netherlands (E.E.C.).  
University of Lausanne  
Medical School,  
CH-1011 Lausanne,  
Switzerland (T.P.).  
Indiana University  
School of Medicine,  
Indianapolis, IN 46202,  
USA (C.-P.C.).  
Washington University  
School of Medicine,  
St. Louis, MO 63110,  
USA (G.W.D.).  
Institute of Molecular  
and Translational  
Therapeutic Strategies  
(IMTTs), Hannover  
Medical School,  
OE 8886, Carl-Neuberg-  
Strasse 1, D-30625  
Hannover, Germany  
(T.T.).

Correspondence to: Y.D.  
wan.devaux@iuh.lu

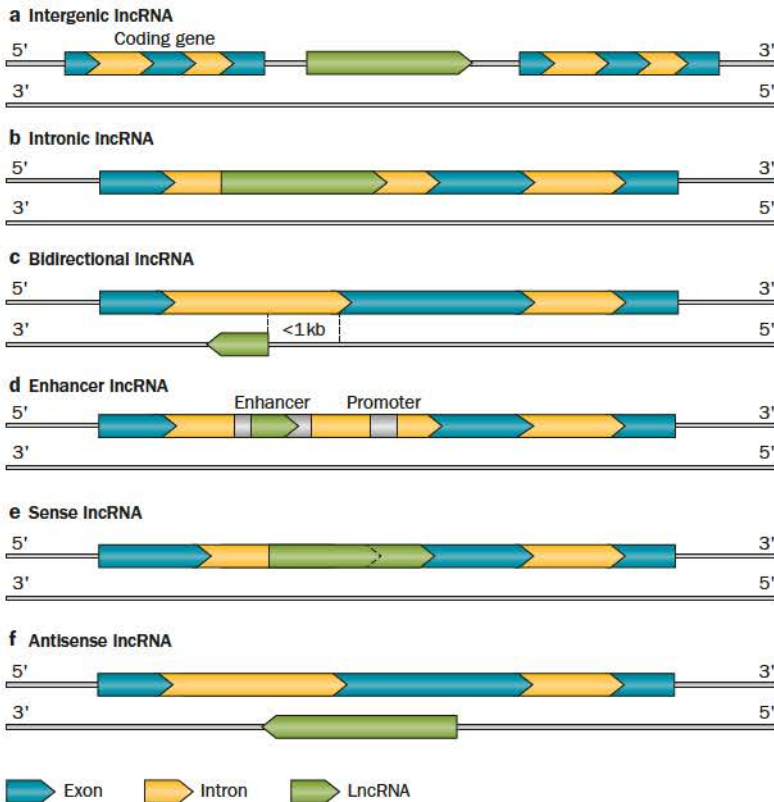
### Competing interests

The authors declare no competing interests.



**Key points**

- Long noncoding RNAs (lncRNAs) comprise a vast family of noncoding RNAs that regulate gene expression through various epigenetic mechanisms mainly related to chromatin regulation
- lncRNAs regulate multiple biological pathways in the heart
- Deep RNA sequencing has identified hundreds of lncRNAs that are dysregulated in diseased hearts, although this change does not necessarily imply a functional effect
- lncRNAs control the differentiation of pluripotent stem cells and cardiac precursors into cardiomyocytes and, therefore, might be useful for cardiac regeneration
- lncRNAs are involved in cellular senescence and might be used to limit ageing-associated disease processes
- The therapeutic or biomarker utility of lncRNAs remains to be validated



**Figure 1** | Classification of lncRNAs according to their genomic location. **a** | Intergenic lncRNAs (lincRNAs) are transcripts located between two protein-coding genes. **b** | Intronic lncRNAs are located in an intron of a coding gene. **c** | Bidirectional lncRNAs are located within 1 kb of promoters in the opposite direction from the protein-coding transcript. **d** | Enhancer lncRNAs (elncRNAs) are located in enhancer regions. **e** | Sense lncRNAs are transcribed from the sense strand of protein-coding genes and overlap one or several introns and exons. **f** | Antisense lncRNAs are transcribed from the antisense strand of protein-coding genes and overlap one or several introns and exons of the sense sequence. Abbreviation: lncRNA, long noncoding RNA.

and exclude classic housekeeping families of RNAs (such as tRNAs and rRNAs).<sup>11</sup> In the 2014 update of the NONCODE database, the number of entries reached 210,831 lncRNAs, with 95,135 in the human genome.<sup>12</sup> Interestingly, many lncRNAs seem to be cardiac-specific, or at least cardiac-enriched.<sup>13–16</sup>

**Classification**

lncRNAs have most commonly been classified according to their genomic location. Six categories have emerged (Figure 1). Intergenic lncRNAs (lincRNAs) are located between two protein-coding genes; the majority of lncRNAs belong to this category. Intronic lncRNAs are located within introns of protein-coding genes. Bidirectional promoter lncRNAs are transcribed within 1 kb of promoters in the opposite direction from the protein-coding transcript. Enhancer lncRNAs (elncRNAs) are generally <2 kb and transcribed from enhancer regions of the genome. Sense lncRNAs are transcribed from the sense strand of protein-coding genes, and can overlap introns and part or all of the exon. Antisense lncRNAs are transcribed from the antisense strand of protein-coding genes, and can overlap an exon of the protein-coding gene in the sense strand, an intron, or both.

**Mechanism of action**

In contrast to mRNAs or miRNAs, lncRNAs are poorly conserved between species, which does not imply a lack of function, but instead suggests a role in changing (or increasing) complexity of species.<sup>17</sup> Although our understanding of the function of lncRNAs is only emerging, studies have revealed that lncRNAs are important regulators of multiple biological processes, both in the heart (Table 1) and in other organs. Whereas miRNAs are known to downregulate gene expression mostly by inducing mRNA degradation,<sup>18</sup> regulation of gene expression by lncRNAs is under the control of more diverse mechanisms. A striking difference between miRNAs and lncRNAs is that the latter can either repress or activate gene expression. lncRNAs are mostly localized in the nucleus, where they regulate gene expression at the epigenetic level. In addition, a minority (~15%<sup>19</sup>) of lncRNAs are present in the cytoplasm, where they regulate translation. In the nucleus, together with various nuclear proteins, lncRNAs have a structural role in forming and maintaining sub-nuclear domains. For example, the lncRNA *NEAT1* has an essential role in the establishment of paraspeckles,<sup>20</sup> a type of nuclear body. Quinzod and Guttman proposed a model in which lncRNAs establish a nuclear domain with target genes and bind proteins to form RNA–DNA–protein complexes.<sup>21</sup> In simple terms, recruited proteins modify the chromatin, triggering chromatin conformation changes, and thereby lead to regulation of transcription. This model can be applied to all lncRNAs described so far. Chromatin modification can be achieved through at least four distinct mechanisms, as described by Wang and Chang (Figure 2),<sup>22</sup> and as detailed below.

**Signal lncRNAs**

Signal lncRNAs (Figure 2a) respond to various stimuli and, therefore, regulate transcription in a timely and spatially precise manner. One elegant example is the potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 1 opposite strand/antisense transcript 1 (*KCNQ1OT1*). This is a signal lncRNA detected in an imprinted cluster, meaning that the two alleles of this gene are differentially expressed. Indeed, *KCNQ1OT1* is expressed by



**Table 1** | lncRNAs with characterized functions in the cardiovascular system

| lncRNA                    | Class      | Species | Chromosome localization | Role  | Mechanism of action                       | Target genes  |
|---------------------------|------------|---------|-------------------------|---|---|---|
| <i>CDKN2B-AS1 (ANHIL)</i> | Antisense  | Human   | 9                       | Genetic risk factor for coronary artery disease <sup>39,40</sup><br>Glucose and fatty acid metabolism <sup>42</sup> | Scaffold <sup>38</sup>                    | <i>CDKN2A, CDKN2B</i><br><i>ADIPOR1, TMEM258, VAMP3</i> |
| <i>cTNIAS</i>             | Antisense  | Human   | 19                      | Inhibits cardiac troponin I expression <sup>85</sup>  | Unknown                                   | Unknown   |
| <i>H19</i>                | Intergenic | Human   | 11                      | Inhibits cell proliferation <sup>73</sup><br>Regulates cell senescence <sup>74</sup>                                | MicroRNA precursors                       | <i>SOX9</i>   |
| <i>HIF1A-AS2</i>          | Antisense  | Human   | 14                      | Overexpressed in failing heart <sup>86</sup>  | Unknown                                   | HIF pathway   |
| <i>HOTAIR</i>             | Antisense  | Human   | 12                      | Inhibits calcification genes <sup>87</sup>  | Signal, guide, decoy <sup>16</sup>        | Gene in <i>HOXD</i> locus                               |
| <i>KCNQ1OT1</i>           | Antisense  | Human   | 11                      | Arrhythmia, <sup>88</sup> cardiac development <sup>29</sup>   | Guide, <sup>25</sup> signal <sup>28</sup> | <i>CDKN1C, SLC22A18</i>                                 |
| <i>MIAT</i>               | Intergenic | Human   | 22                      | Associated with myocardial infarction <sup>32</sup>   | Decoy <sup>33,89</sup>                    | Unknown   |
| <i>MT-LIPCAR</i>          | Other      | Human   | M                       | Predicts survival in patients with heart failure <sup>79</sup>  | Unknown                                   | Unknown   |
| <i>MYL4-AS</i>            | Antisense  | Human   | 17                      | Induces cardiac hypertrophy <sup>90</sup>   | Unknown                                   | Unknown   |
| <i>SAL-RNA1</i>           | Intergenic | Human   | 14                      | Inhibits senescence <sup>53</sup>   | Unknown                                   | p53, apoptosis pathway                                  |
| <i>SENCR</i>              | Antisense  | Human   | 11                      | Stabilizes smooth muscle cell contractility <sup>36</sup>   | Decoy <sup>36*</sup>                      | <i>MYCD</i>   |
| <i>TERRA</i>              | Intergenic | Human   | Telomeres               | Regulation of telomeric DNA damage response <sup>52</sup>   | Decoy                                     | Telomeres   |
| <i>Ak011347</i>           | Intergenic | Mouse   | 4                       | Cardiac development <sup>91</sup>   | Unknown                                   | <i>Map3k7</i>   |
| <i>Bvht</i>               | Intergenic | Mouse   | 18                      | Cardiac development <sup>14</sup>   | Signal, * decoy <sup>14</sup>             | <i>Hand1, Hand2, Mesp1, Nkx2-5, Tbx20</i>               |
| <i>Carl</i>               | Intergenic | Mouse   | 2                       | Inhibits mitochondrial fission and apoptosis in cardiomyocytes <sup>35</sup>  | Decoy <sup>35*</sup>                      | <i>Phb2</i>   |
| <i>Chrt</i>               | Intronic   | Mouse   | 18                      | Stimulates cardiac hypertrophy <sup>34</sup>  | Decoy <sup>34*</sup>                      | <i>Myd88</i>  |
| <i>Fendrr</i>             | Intergenic | Mouse   | 8                       | Cardiac development <sup>37</sup>   | Guide <sup>37</sup>                       | <i>Foxf1, Gata6, Nkx2-5, Pitx2</i>                      |
| <i>Malat1</i>             | Intergenic | Mouse   | 19                      | Endothelial cell function, vessel growth <sup>31</sup>  | Decoy <sup>30</sup>                       | <i>Ccna2, Ccnb1/2, Cdkn1a, Cdkn1b</i>                   |
| <i>Mhrt</i>               | Intergenic | Mouse   | 14                      | Inhibits cardiac hypertrophy <sup>13</sup>  | Decoy <sup>13*</sup>                      | <i>Mutyh, Spp1</i>                                      |
| <i>mm85</i>               | Enhancer   | Mouse   | 11                      | Embryonic stem cell differentiation <sup>63</sup>   | Enhancer                                  | <i>Myocd</i>  |

\*Mechanism described in the heart. Abbreviation: lncRNA, long noncoding RNA.

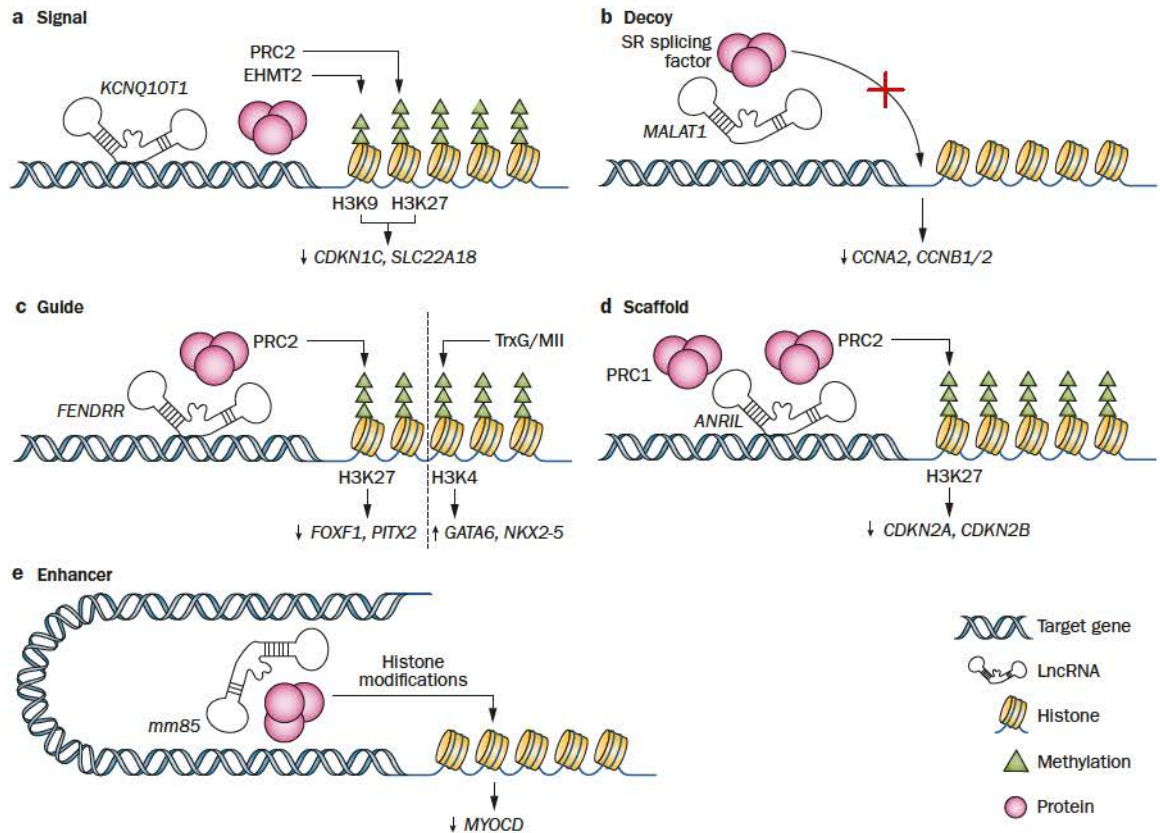
the paternal chromosome and silenced on the maternal chromosome (the *KCNQ1OT1* promoter is methylated on the maternal chromosome, but unmethylated on the paternal chromosome).<sup>23</sup> The *KCNQ1OT1* promoter is located in intron 10 of the *KCNQ1* gene and is transcribed in the opposite direction to *KCNQ1*.<sup>24</sup> *KCNQ1OT1* recruits histone methyltransferases, such as G9a and polycomb repressive complex (PRC) 2, to the site of action in chromatin.<sup>25</sup> G9a histone methyltransferase triggers dimethylation of lysine H3K9,<sup>26</sup> and PRC2 triggers trimethylation of lysine H3K27.<sup>27</sup> In this way, *KCNQ1OT1* induces transcriptional silencing of imprinted genes through chromatin remodelling. This silencing can occur in *cis* for genes close to *KCNQ1OT1* (*CDKN1C*, *KCNQ1*, *SLC22A18*) or in *trans* for genes distant to *KCNQ1OT1* (*ASCL2*, *CD81*). *Cis* regulation refers to lncRNAs that are located in close proximity to their target gene, whereas *trans* regulation refers to lncRNAs that are located distantly from their target gene. Such regulation occurs in

the placenta during development, illustrating the notion of tissue-specific and temporal regulation of transcription.<sup>28</sup> However, although *KCNQ1* expression is regulated by *KCNQ1OT1*, its imprinting seems to be independent of *KCNQ1OT1* during cardiac development.<sup>29</sup>

#### Decoy lncRNAs

Decoy lncRNAs (Figure 2b) sequester regulatory factors leading to repression of transcription. Regulatory factors are either RNA-binding proteins such as transcription factors and chromatin-modifying enzymes, or RNA sequences such as miRNAs. A typical example of decoy lncRNA is metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (*MALAT1*). Predominantly localized in the nucleus, *MALAT1* controls alternative splicing by regulating the phosphorylation and distribution of serine/arginine splicing factors in nuclear speckle domains.<sup>30</sup> Although this mechanism has not been described in the heart, *MALAT1* has been shown





**Figure 2** | Mechanisms of action of lncRNAs. **a** | Signal lncRNAs regulate gene expression in response to various stimuli. For example, *KCNQ10T1* recruits EHMT2 and PRC2 to a specific action site and induces transcriptional silencing through chromatin methylation. **b** | Decoy lncRNAs sequester transcription factors, leading to repression of gene expression. *MALAT1* traps SR proteins and regulates alternative splicing. **c** | Guide lncRNAs bind to ribonucleoproteins and guide their localization to specific target sites. *FENDRR* forms a complex either with PRC2 to silence the expression of target genes, or with TrxG/MII proteins to activate gene expression. **d** | Scaffold lncRNAs interact with multiple components and activate or repress transcription. *CDKN2B-AS1* (also known as *ANRIL*) binds to PRC1 and PRC2 and modulates chromatin methylation. **e** | Enhancer lncRNAs modulate expression of target genes by an interaction between enhancer and promoter regions of genes through chromosomal looping. Abbreviations: EHMT2, histone lysine N-methyltransferase EHMT2; HxKy, histone (number x) lysine (number y); lncRNA, long noncoding RNA; PRC, polycomb repressive complex; SR, serine/arginine; TrxG/MII, trithorax-group/mixed lineage leukaemia.

to regulate endothelial cell function and vessel growth.<sup>31</sup> Other lncRNAs known in the cardiac context might also have a decoy mechanism of action and regulate alternative splicing. These include myocardial infarction associated transcript (*MIAT*), a risk factor for myocardial infarction,<sup>32,33</sup> and the antihypertrophic lncRNA myosin heavy chain-associated RNA transcript (*MHRT*).<sup>13</sup> Interestingly, studies have shown that lncRNAs can also act as decoy for miRNAs. Cardiac hypertrophy-related factor (*CHRF*; AK048451)<sup>34</sup> and cardiac apoptosis-related lncRNA (*CARL*; AK017121)<sup>35</sup> trap miR-489 and miR-539, respectively, in cardiomyocytes. The lncRNA *SENCR*, which is associated with smooth muscle cell contractility, might also act as a ‘sponge’, which traps miRNAs via this mechanism.<sup>36</sup>

**Guide lncRNAs**

Guide lncRNAs (Figure 2c) form complexes with ribonucleoproteins and conduct their localization to specific target genes. For example, the lncRNA *FOXF1* adjacent noncoding developmental regulatory RNA (*FENDRR*)

forms a complex with PRC2, which binds to specific sites in *FOXF1* and *PITX2* promoters, and thereby inhibits the expression of these two target genes.<sup>37</sup> Conversely, *FENDRR* can also interact with proteins that activate gene expression, such as trithorax-group/mixed lineage leukaemia proteins.<sup>37</sup>

**Scaffold lncRNAs**

Scaffold lncRNAs (Figure 2d) form complexes simultaneously with several molecular components, which act as transcriptional activators or repressors. For instance, the lncRNA *CDKN2B-AS1* (also known as *ANRIL*) recruits and interacts with PRC1 and PRC2 leading to silencing of the *INK4b-ARF-INK4a* locus.<sup>38</sup> Importantly, *ANRIL* has been described as a genetic risk factor for coronary artery disease,<sup>39,40</sup> and its expression level is associated with left ventricular dysfunction after myocardial infarction.<sup>41</sup> In addition, knock-down of *ANRIL* decreases the expression of *ADIPOR1*, *TMEM258* (also known as *C11ORF10*), and *VAMP3*, which are important genes in the regulation of glucose and fatty-acid metabolism.<sup>42</sup>







contains >1 million enhancers, which are selectively activated by transcription factors.<sup>56,57</sup> In the heart, several lines of evidence indicate that cardiac transcription factors act as enhancers in a combinatorial manner to regulate expression of cardiogenic gene networks.<sup>58–60</sup> Lineage-specific transcription factors bind to enhancer elements, recruit co-activators and chromatin modifiers, and elicit epigenomic reprogramming and reorganization of the genome 3D architecture.

The transcriptional machinery has been found to involve enhancers and produce lncRNAs. Importantly, the expression of lncRNAs correlates with the activation of the enhancers, and transcription at enhancers is crucial for enhancer activity.<sup>61,62</sup> Fetal cardiac enhancers are transcribed during development and their expression correlates with an active state,<sup>15,63,64</sup> which strongly supports a role for lncRNAs in cardiac cell fate commitment. For example, activity at *mm85*, an enhancer controlling expression of its neighbouring gene *MYOCD*, produces an associated transcript.<sup>63</sup> In a more global approach, 834 heart-specific intergenic regions associated with RNA transcription were identified.<sup>64</sup> The majority mapped to enhancers and were enriched close to genes implicated in heart development. In addition, using deep RNA sequencing and *ab initio* reconstruction, hundreds of developmental enhancer-associated lncRNAs have been identified from differentiating embryonic stem cells.<sup>63</sup> These transcripts undergo state transition during cardiac differentiation. Interestingly, the vast majority of newly identified lncRNAs that are modulated in adult stressed hearts are also associated with a heart-specific enhancer.<sup>44</sup> These heart-specific lncRNAs undergo stage-specific chromatin state transitions during cardiogenic differentiation, as demonstrated using publicly available chromatin immunoprecipitation (ChIP)-sequencing data generated from embryonic stem cells differentiating into cardiomyocytes.<sup>44,65</sup>

Together, these findings support a role for lncRNAs in cardiac specification and differentiation. For example, lncRNAs associated with active enhancer states in mesodermal precursors or in cardiac precursor cells are implicated in cardiac mesoderm specification. However, lncRNAs shown to be active in cardiomyocytes are likely to be involved in cardiac differentiation and maturation. At the cellular level, knockdown of cardiac lncRNAs reduces expression of the neighbouring cardiac genes, consistent with *cis*-regulatory mechanisms.<sup>44,63</sup> In undifferentiated precursors, lncRNA-dependent modulation of target genes is thought to control a cardiogenic programme. By contrast, in differentiated cells such as cardiomyocytes, these transcripts help to maintain the cell specialization via regulation of important identity genes.

The implication of lncRNAs in embryonic stem cell specification has been investigated using a loss-of-function approach.<sup>8</sup> In particular, some lncRNAs were found to control commitment into the mesoderm through repression of nonappropriate cell fates. Although not directly associated with an enhancer sequence, *BVHT* is an example of a lncRNA with functional roles at different stages of differentiation.<sup>14</sup> *BVHT* is expressed in cardiac mesoderm and is highly present in embryonic stem cells

and cardiomyocytes. Depletion of *BVHT* in embryonic stem cells does not affect pluripotency, but severely impairs their capacity to produce differentiated cardiomyocytes.

Another lncRNA involved in cardiac lineage commitment is *FENDRR*.<sup>37</sup> This lncRNA controls differentiation of tissues derived from the lateral mesoderm, which gives rise to the ventral body wall and heart. Consistently, disruption of *FENDRR* expression in developing embryos is lethal, in part as a consequence of heart failure. In addition, increased expression of *Nkx-2.5* and *GATA-6*, two important regulators of cardiac lineage commitment, is observed in *FENDRR* mutant embryos.<sup>37</sup> *FENDRR* is exclusively expressed in cardiac mesoderm progenitors during development, that is, in eomesoderm-positive cells.<sup>37</sup>

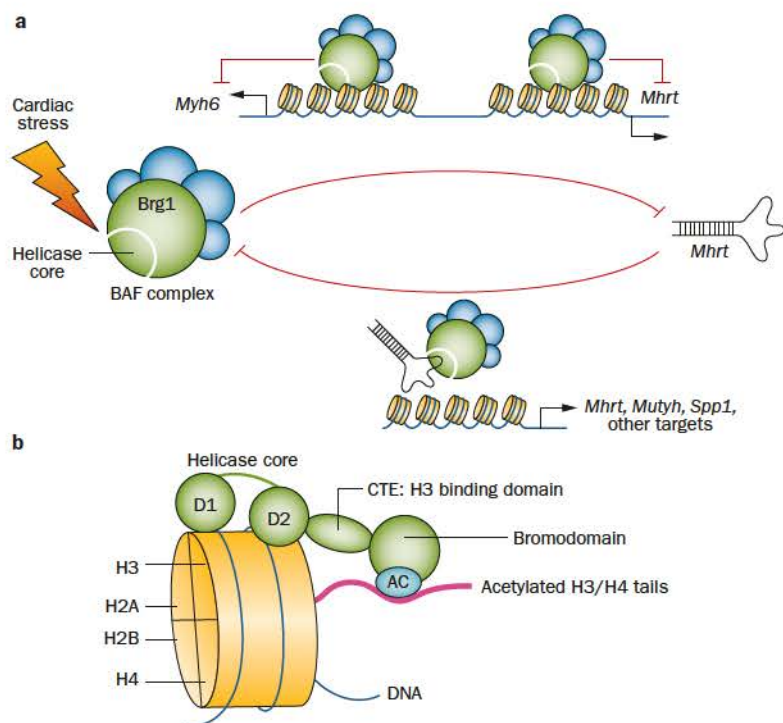
Taken together, these findings strongly support a role for lncRNAs in the control of stage-specific differentiation of pluripotent stem cells and cardiac precursor cells into cardiomyocytes. This new class of molecules provides potential targets to modulate progenitor cell fate and possibly induce regeneration in damaged hearts.

### lncRNAs in cardiac development

Because many lncRNAs function as epigenetic modulators of gene expression,<sup>8</sup> genome-wide RNA sequencing (RNA-Seq) is increasingly employed as a method of cataloguing noncoding RNA expression and simultaneously uncovering potential functional effects on coding RNA targets. Comprehensive RNA-Seq<sup>66</sup> has been used to define the lncRNA expression signature of developing hearts at embryonic days ~E8.25<sup>47</sup> and ~E13.5.<sup>15</sup> Comparison of E8.25 mouse embryo RNA-Seq results to the 2,240 annotated lncRNAs in the ENSEMBLE database identified 1,378 lncRNAs, 225 (16%) of which had tissue-specific expression at this early developmental stage.<sup>47</sup> More than 100 annotated and newly described putative lncRNAs had a 'heart-specific' expression pattern, and multiple examples of divergently expressed lncRNA–mRNA pairs were identified, suggesting functional relationships.<sup>47</sup>

In a study with a more cardiac focus, the lncRNA and mRNA expression signatures of developing hearts were evaluated by comparing RNA-Seq results from E13.5 mouse hearts, healthy adult mouse hearts, and actively hypertrophying adult mouse hearts (1 and 4 weeks after transverse aortic banding).<sup>15</sup> By aligning to a curated list of ~3,000 lncRNAs and comparing to adult liver and keratinocyte (skin) RNA-Seq data, 321 cardiac-expressed lncRNAs were identified, 117 of which were enriched at least threefold in heart; several of these cardiac-enriched lncRNAs have been referred to as 'cardiac-specific'.<sup>14</sup> Two findings from this study are notable. First, the comparison between developing embryonic heart and quiescent adult heart showed major differences in lncRNA expression signature, whereas the comparison between quiescent and actively hypertrophying adult hearts showed far fewer lncRNA differences, consistent with postulated central roles for lncRNAs in tissue and organ development.<sup>67</sup> Second, the lncRNAs that were highly expressed in embryonic hearts tended to have functional roles in pathways regulating transcription, including nuclear factor NF- $\kappa$ B and CREB. The investigators have postulated that increased





**Figure 4** | *Mhrt* inhibits chromatin targeting and gene regulation by Brg1. **a** | Working model of a Brg1–*Mhrt* feedback circuit in the heart. Brg1 represses *Mhrt* transcription, whereas *Mhrt* prevents Brg1 from recognizing its chromatin targets. Brg1 functions through two distinct promoter elements to repress *Myh6* and *Mhrt* expression bidirectionally. **b** | Molecular model of how Brg1 binds to its genomic DNA targets. Brg1 helicase (D1D2) binds chromatinized DNA, the C-terminal extension (CTE) binds histone H3, and bromodomain binds acetylated histone H3 or H4. Permission obtained from NPG © Han, P. *et al.* A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy. *Nature* 514, 102–106 (2014).

lncRNA expression and counter-regulation of target-coding genes might limit the capacity of differentiating cells to revert to the multipotent state, whereas activation of cardiac-specific genes by conventional transcription factors provides the impetus for cardiomyocyte specification.<sup>15,68</sup>

Deep RNA sequencing has identified hundreds of lncRNAs thought to be involved in cardiac development. However, caution is warranted before assigning or accepting causal roles for lncRNAs, especially novel lncRNAs classified on the basis of computational analyses without biological validation.

### lncRNAs and chromatin regulation

lncRNAs have crucial roles in regulating cardiac chromatin structure during heart development and pathological remodelling.<sup>13,14,37</sup> In mouse embryos, *Bvht*<sup>14</sup> and *Fendrr*<sup>37</sup> act with histone-modifying enzymes to structure chromatin of gene promoters whose activities are required for heart development. In adult mice, the cardiac-specific lncRNA *Mhrt* inhibits the function of a pathogenic chromatin-remodelling factor Brg1 to maintain cardiac function and protect the heart from stress-induced failure.<sup>13</sup>

*Bvht* is thought to function by sequestering polycomb protein Suz12 from the promoters of cardiac lineage-determining genes (*Hand1*, *Hand2*, *Mesp1*, *Nkx2-5*, and *Tbx20*).<sup>14</sup> Suz12 is a core subunit of PRC2 that catalyses

trimethylation of histone lysine H3K27, providing a repressive histone mark (H3K27me3) that silences gene expression.<sup>69</sup> Reduced Suz12/PRC2 promoter occupancy results in derepression of those genes that are critical for lineage determination. In cultured embryonic stem cells, *Bvht* functions as a decoy for PRC2 to reduce repressive chromatin marks and, therefore, activate lineage-specifying genes for the heart. Whether *Bvht* has similar roles *in vivo* requires further investigation.

In *Fendrr*-null embryos, the proximal *Foxf1a* was ectopically expressed, suggesting that *Fendrr* acts in *cis* to regulate gene-enhancer function.<sup>37</sup> Furthermore, *Fendrr* binds with both the repressive complex PRC2 and the activating complex trithorax-group/mixed lineage leukaemia protein to control chromatin and gene expression for mesodermal and cardiac specification.<sup>37</sup> Unlike *Bvht* that decoys PRC2, *Fendrr* helps to anchor PRC2 on the promoters of *Foxf1* and *Pitx2*, two transcription factors essential for early cell fate decision, suggesting that *Fendrr* and *Bvht* might counteract each other to control the extent of PRC2 occupancy on promoters of cardiac lineage-determining genes, thereby tailoring heart development.

*Mhrt* transcripts, localized in the nuclei of cardiomyocytes, are weakly expressed in fetal hearts, but are abundant in mature adult mouse hearts.<sup>13</sup> Cardiac stress suppresses *Mhrt* expression, leading to pathological hypertrophy and heart failure. Transgenic restoration of *Mhrt* to its pre-stress level prevents the heart from developing pathological hypertrophy. *Mhrt* inhibits the chromatin function of Brg1, an ATPase subunit of the BAF chromatin-remodelling complex that is activated by stress to induce cardiac hypertrophy.<sup>70</sup> *Mhrt* directly binds to the ATPase/helicase domain of Brg1 and prevents Brg1 from recognizing its genomic targets, including the promoters of  $\alpha$ -myosin and  $\beta$ -myosin heavy chain (*Myh6* and *Myh7*) that have critical roles during cardiac hypertrophy. The helicase domain of Brg1 binds to *Mhrt* and chromatinized DNA promoter (*Myh*), allowing competitive inhibition of the genomic targeting of Brg1 by *Mhrt*. Interestingly, the stress-induced *Mhrt* repression is mediated through Brg1, which is activated in the stressed heart to repress the *Mhrt* promoter. Such reciprocal inhibition of *Mhrt* and Brg1 constitutes a feedback *Mhrt*–Brg1 circuit critical for maintaining the homeostasis of cardiac epigenome and function (Figure 4). Perturbation of the *Mhrt*–Brg1 circuit by pathological stress results in gene reprogramming and cardiomyopathy. Brg1 and *Mhrt* are both highly conserved in humans.<sup>13,70</sup> As in mice, the expression of BRG1 is activated, whereas that of MHRT is repressed in human diseased hearts.<sup>13,70</sup> The reciprocal MHRT–BRG1 changes in human hearts suggest a conserved lncRNA–chromatin mechanism of cardiomyopathy. These studies provide a new paradigm of lncRNA–chromatin regulation in heart development, differentiation, and disease. However, the poor conservation of some lncRNAs cautions against direct extrapolation of animal experimentations to human heart development.

### lncRNAs in cardiac ageing

The constant increase in life expectancy together with low birth rates has resulted in a dramatic shift in the median



age of the population in developed countries over the past few decades, and this trend is predicted to continue. Ageing is a highly complex and poorly-understood phenomenon that involves a decline in function on both the cellular and organ levels, leading to increased incidence of prevalent diseases such as cardiovascular disease. The pathways underlying age-associated diseases are still poorly understood, and specific diagnostic and therapeutic approaches are lacking for this growing demographic of the global population.

Given that the role of noncoding RNAs in cardiovascular ageing has been summarized previously,<sup>71</sup> we discuss important lncRNAs with broad importance in the general biology of ageing, such as those affecting telomeres. The telomeric lncRNA *TERRA* (telomeric repeat-containing RNA) has been implicated in modulating the structure and processing of deprotected telomeres.<sup>51</sup> Indeed, *TERRA* is of critical importance in the regulation of the telomeric DNA damage response.<sup>52</sup> In one RNA-Seq study, lncRNA expression was compared between proliferating, early-passage, 'young' human diploid WI-38 fibroblasts and those expressed in senescent, late-passage, 'old' fibroblasts (PDL 52).<sup>53</sup> Among the novel senescence-associated lncRNAs, senescence-associated lncRNA 1 (*SAL-RNA1*) was found to delay senescence. Many of these senescence-associated lncRNAs are now awaiting functional characterization and some might emerge as new age-specific drug targets.<sup>53</sup>

A *MALAT1* loss-of-function genetic model indicated that *MALAT1* is not essential for mouse prenatal and postnatal development.<sup>72</sup> Furthermore, depletion of *MALAT1* does not affect global gene expression, splicing factor level and phosphorylation status, or alternative pre-mRNA splicing. However, among a small number of genes that were dysregulated in adult *MALAT1* knockout mice, many neighbored *MALAT1*, indicating a potential *cis*-regulatory role of *MALAT1* gene transcription.<sup>72</sup> Interestingly, inhibition of *MALAT1* *in vivo* by oligonucleotides reduced vascularization, pointing to *MALAT1* as an interesting target to manipulate angiogenic processes.<sup>31</sup>

The lncRNA *H19* has also been associated with ageing; *H19* gives rise to a long noncoding mRNA that is a precursor of several miRNAs that negatively affect cell proliferation.<sup>73</sup> In addition, *H19* is involved in cellular senescence regulation.<sup>74</sup> Therefore, *H19* might be an interesting target for manipulating ageing-associated disease processes. For example, multipotent germline stem cells have been found to be hypomethylated at the *H19* locus, and also to express high levels of telomerase.<sup>75</sup> However, detailed reports of the effects of *H19* manipulation on biological ageing are currently lacking. With an ageing population, the burden of cardiovascular disease can only rise. lncRNAs are implicated in cellular senescence, but whether lncRNAs might constitute a novel class of 'anti-ageing drugs' is an appealing possibility that remains to be addressed.

### **lncRNAs as therapeutic targets**

When considering the therapeutic potential of a new group of biologicals such as lncRNAs, some crucial questions need to be addressed. What is the precise biological role of

these lncRNAs in each cardiac or vascular disease? Is it possible to inhibit or mimic their function pharmacologically, and is it safe to do so? What could the adverse effects be, depending on their function in other organs? Which is the best animal or *in vitro* model to perform preclinical studies, and how can the data be translated to humans?

To have an incremental value in the treatment of cardiovascular diseases in addition to the existing inhibition of neurohumoral activation, a new lncRNA-based drug should target specific molecular processes, such as inflammation, angiogenesis, fibrosis, or cell growth. Promisingly, individual lncRNAs seem to have distinct biological functions in these processes (Figure 3, Table 1) and, therefore, inhibition of their function might lead to novel treatments.

Inhibition of lncRNAs can be achieved using 'gapmers', which are frequently used to block lncRNA function. Gapmers are potent antisense oligonucleotides that inhibit specific nuclear targets. RNA-DNA heteroduplexes formed after sequence-specific binding of antisense oligonucleotides to their target lncRNA are cleaved by the enzyme RNase H. The latter is a ubiquitous enzyme found in both the nucleus and the cytoplasm of all cells, and hydrolyses the RNA of RNA-DNA heteroduplexes. Consequently, gapmers are potent inhibitors of their nuclear target lncRNAs.<sup>76</sup> Some questions need to be answered before any application of lncRNA inhibition can become a reality in human diseases. Which combination of gapmers is best to obtain sufficient tissue and cell penetration, is safe, and has the desired half-life? What about alternatives to gapmers, such as aptamers (single-stranded DNA or peptide molecules that can bind to molecular targets such as proteins with high selectivity and affinity)? What are their adverse effects? Alternatively, given that lncRNAs, like miRNAs, can also be protective against disease development, is mimicking of lncRNA function possible? Currently, mimicking the function of noncoding RNAs *in vivo* remains a challenging and unachieved goal in RNA therapy.

The potential of targeting lncRNAs in cardiac or vascular diseases was first identified in animal models of angiogenesis or cell growth. Silencing of *Malat1* reduced capillary growth not only in a mouse model of hind-limb ischaemia (with detrimental effects),<sup>31</sup> but also in a rat model of diabetic retinopathy (with beneficial effects).<sup>77</sup> Inhibition of *lincRNA-p21* increased neointimal hyperplasia in an *Apoe*-knockout mouse model of carotid artery injury.<sup>78</sup> In mouse hearts, repression of *Mhrt* drove the progression of cardiac hypertrophy to failure, and restoration to normal levels prevented cardiomyopathy.<sup>13</sup> Animal studies have not yet revealed the therapeutic potential of lncRNAs in cardiovascular inflammation or fibrosis, but data on these applications are anticipated.

The results described above were obtained in rodent models, with only correlative human data on cardiac expression<sup>13</sup> or blood levels<sup>79</sup> related to disease progression. Given that lncRNAs—in contrast to well-conserved miRNAs—are poorly conserved between species (or even if conserved might differ in their molecular targets and precise biological role), translating animal findings to human application will be extremely challenging. Using relevant human cell lines, 3D *ex vivo* cell cultures



**Table 2** | lncRNAs with potential biomarker applications

| lncRNA                    | Association  | Biomarker application                                  | Study size                           |
|---------------------------|--|--|--------------------------------------|
| <i>CDKN2B-AS1 (ANRIL)</i> | Coronary artery disease <sup>39</sup>                    | Risk factor  | 63,746 cases; 130,681 controls       |
| <i>CDKN2B-AS1 (ANRIL)</i> | Coronary artery disease <sup>40</sup>                    | Risk factor  | 1,926 cases; 2,938 controls          |
| <i>CDKN2B-AS1 (ANRIL)</i> | MI <sup>40</sup>   | Risk factor  | 875 cases; 1,644 controls            |
| <i>CDKN2B-AS1 (ANRIL)</i> | MI <sup>41</sup>   | Predicts left ventricular dysfunction                  | 414 cases; 86 controls               |
| <i>HIF1A-AS2</i>          | MI <sup>41</sup>   | Not significant  | 414 MI                               |
| <i>KCNQ1OT1</i>           | MI <sup>41</sup>   | Predicts left ventricular dysfunction                  | 414 MI                               |
| <i>MALAT1</i>             | MI <sup>41</sup>   | Not significant  | 414 MI                               |
| <i>MIAT</i>               | MI <sup>32</sup>   | Risk factor  | 3,464 cases; 3,819 controls          |
| <i>MIAT</i>               | MI <sup>41</sup>   | Not significant  | 414 MI                               |
| <i>MT-LIPCAR</i>          | MI <sup>79</sup><br>Systolic heart failure <sup>79</sup> | Predicts postinfarct remodelling<br>Predicts mortality | 246 MI<br>542 systolic heart failure |

Abbreviations: lncRNA, long noncoding RNA; MI, myocardial infarction.

of various cardiac cells might help to overcome these limitations of animal studies. Identification of human-specific lncRNAs, either as human orthologues from rodent-discovered lncRNAs as described in myocardial infarction,<sup>44</sup> or being expressed during differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes,<sup>63</sup> is crucial for further development of lncRNA-based treatment in humans. Although the association between lncRNAs and heart disease suggests that they might be a novel family of therapeutic targets, many challenges and questions remain to be addressed before this aim can be achieved.

### lncRNAs as cardiac biomarkers

The need to implement personalized cardiovascular medicine is generally agreed,<sup>80</sup> however, available tools and methods still lack accuracy. Circulating biomarkers have greatly improved the diagnosis of acute cardiac conditions. Indicators of disease evolution would simplify clinical decision-making and allow health care to be tailored to individuals. Several families of biomarkers have emerged, with protein-based or peptide-based diagnostic assays now being used in patient care. RNA-based diagnostic assays have been developed, initially based on mRNA expression profiles,<sup>81</sup> and subsequently circulating miRNAs have been identified as cardiac biomarkers with great potential for personalized medicine.<sup>3</sup> Spatial, temporal, and disease-associated regulation of expression<sup>48,53–56</sup> suggest that lncRNAs might also be useful biomarkers (Table 2).

The association between *ANRIL* and the risk of coronary artery disease<sup>39,40</sup> suggests that genetic polymorphism of lncRNAs might serve as a cardiac biomarker. *MIAT* is another candidate biomarker—genetic variation in this lncRNA confers susceptibility to myocardial infarction.<sup>32</sup> Using isoproterenol administration in mice as an experimental model of heart failure, the expression of 32 lncRNAs was found to be regulated in the failing heart as well as in whole blood and plasma samples.<sup>82</sup> This study supports the notion that the blood constitutes a reservoir of lncRNAs that can be used as cardiac biomarkers, particularly given that lncRNAs are present in plasma-derived exosomes.<sup>83</sup> A study of plasma levels of *MT-LIPCAR*, a

mitochondrial lncRNA that is a predictor of the development of left ventricular remodelling after myocardial infarction and death in patients with systolic heart failure, was the first proof of the principle that plasma lncRNAs might be used as biomarkers of prognosis in cardiovascular diseases.<sup>79</sup> Another lncRNA, *MGAT3-AS1*, is upregulated in plasma samples from patients with acute kidney injury and is a predictor of overall survival.<sup>84</sup>

Expression profiles of lncRNAs in whole blood cells have also been shown to have biomarker utility. Levels of *HIF1A-AS2*, *KCNQ1OT1*, and *MALAT1* were upregulated, whereas those of *ANRIL* were downregulated, in patients with myocardial infarction compared with healthy volunteers.<sup>41</sup> Furthermore, *ANRIL*, *KCNQ1OT1*, *MALAT1*, and *MIAT* were univariable predictors of left ventricular dysfunction after myocardial infarction.<sup>41</sup> Importantly, *ANRIL* and *KCNQ1OT1* remained significant predictors of left ventricular dysfunction in multivariable analyses and provided an additive predictive value.<sup>41</sup>

lncRNAs are now accepted to have functional roles in cardiac development and disease and, therefore, are potential therapeutic targets, but further studies are needed to demonstrate their biomarker utility. Whether circulating lncRNAs are stable and both easily and reproducibly measurable in biological samples remains to be established. The incremental value of lncRNAs in addition to available markers will have to be evaluated. Also, the localization of lncRNAs in plasma compartments, whether they are actively secreted, and whether they can act as paracrine mediators, needs to be determined.

### Conclusions

lncRNAs have emerged as important regulators of cardiac development and ageing. At an early stage of life, lncRNAs control the differentiation of pluripotent stem cells and cardiac precursors into functional adult cardiac cells. At a later stage, they regulate cellular senescence and other pathways involved in cardiac disease. Although hundreds of lncRNAs are associated with cardiac development and disease, their functionality and diagnostic, prognostic, and therapeutic utility remain to be determined.



1. Comings, D. E. The structure and function of chromatin. *Adv. Hum. Genet.* **3**, 237–431 (1972).
2. Olson, E. N. MicroRNAs as therapeutic targets and biomarkers of cardiovascular disease. *Sci. Transl. Med.* **6**, 239ps3 (2014).
3. Goretti, E., Wagner, D. R. & Devaux, Y. miRNAs as biomarkers of myocardial infarction: a step forward towards personalized medicine? *Trends Mol. Med.* **20**, 716–725 (2014).
4. Thum, T. Noncoding RNAs and myocardial fibrosis. *Nat. Rev. Cardiol.* **11**, 655–663 (2014).
5. Ucar, A. *et al.* The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy. *Nat. Commun.* **3**, 1078 (2012).
6. Kapusta, A. & Feschotte, C. Volatile evolution of long noncoding RNA repertoires: mechanisms and biological implications. *Trends Genet.* **30**, 439–452 (2014).
7. Erdmann, V. A., Szymanski, M., Hochberg, A., de Groot, N. & Barciszewski, J. Collection of mRNA-like non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res.* **27**, 192–195 (1999).
8. Guttman, M. *et al.* lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature* **477**, 295–300 (2011).
9. Lander, E. S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921 (2001).
10. Mercer, T. R., Dinger, M. E. & Mattick, J. S. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 155–159 (2009).
11. Amaral, P. P., Clark, M. B., Gascoigne, D. K., Dinger, M. E. & Mattick, J. S. lncRNAdb: a reference database for long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Res.* **39**, D146–D151 (2011).
12. Xie, C. *et al.* NONCODEv4: exploring the world of long non-coding RNA genes. *Nucleic Acids Res.* **42**, D98–D103 (2014).
13. Han, P. *et al.* A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy. *Nature* **514**, 102–106 (2014).
14. Klattenhoff, C. A. *et al.* Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment. *Cell* **152**, 570–583 (2013).
15. Matkovich, S. J., Edwards, J. R., Grossenhelder, T. C., de Guzman Strong, C. & Dorn, G. W. 2nd. Epigenetic coordination of embryonic heart transcription by dynamically regulated long noncoding RNAs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 12264–12269 (2014).
16. Ounzain, S. *et al.* Genome-wide profiling of the cardiac transcriptome after myocardial infarction identifies novel heart-specific long non-coding RNAs. *Eur. Heart J.* **36**, 353–368 (2015).
17. Pang, K. C., Frith, M. C. & Mattick, J. S. Rapid evolution of noncoding RNAs: lack of conservation does not mean lack of function. *Trends Genet.* **22**, 1–5 (2006).
18. Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S. & Bartel, D. P. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* **466**, 835–840 (2010).
19. Kapranov, P. *et al.* RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science* **316**, 1484–1488 (2007).
20. Clemson, C. M. *et al.* An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Mol. Cell* **33**, 717–726 (2009).
21. Quinodoz, S. & Guttman, M. Long noncoding RNAs: an emerging link between gene regulation and nuclear organization. *Trends Cell Biol.* **24**, 651–663 (2014).
22. Wang, K. C. & Chang, H. Y. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol. Cell* **43**, 904–914 (2011).
23. Mohammad, F., Mondal, T., Guseva, N., Pandey, G. K. & Kanduri, C. *Kcnq1ot1* noncoding RNA mediates transcriptional gene silencing by interacting with Dnmt1. *Development* **137**, 2493–2499 (2010).
24. Mancini-Dinardo, D., Steele, S. J., Leverage, J. M., Ingram, R. S. & Tilghman, S. M. Elongation of the *Kcnq1ot1* transcript is required for genomic imprinting of neighboring genes. *Genes Dev.* **20**, 1268–1282 (2006).
25. Pandey, R. R. *et al.* *Kcnq1ot1* antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Mol. Cell* **32**, 232–246 (2008).
26. Peters, A. H. *et al.* Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol. Cell* **12**, 1577–1589 (2003).
27. Czermin, B. *et al.* *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* **111**, 185–196 (2002).
28. Mohammad, F. *et al.* Long noncoding RNA-mediated maintenance of DNA methylation and transcriptional gene silencing. *Development* **139**, 2792–2803 (2012).
29. Korostowski, L., Sedlak, N. & Engel, N. The *Kcnq1ot1* long non-coding RNA affects chromatin conformation and expression of *Kcnq1*, but does not regulate its imprinting in the developing heart. *PLoS Genet.* **8**, e1002956 (2012).
30. Tripathi, V. *et al.* The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol. Cell* **39**, 925–938 (2010).
31. Michalik, K. M. *et al.* Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth. *Circ. Res.* **114**, 1389–1397 (2014).
32. Ishii, N. *et al.* Identification of a novel non-coding RNA, *MIAT*, that confers risk of myocardial infarction. *J. Hum. Genet.* **51**, 1087–1099 (2006).
33. Ishizuka, A., Hasegawa, Y., Ishida, K., Yanaka, K. & Nakagawa, S. Formation of nuclear bodies by the lncRNA Gomafu-associating proteins Celf3 and SF1. *Genes Cells* **19**, 704–721 (2014).
34. Wang, K. *et al.* The long noncoding RNA *CHRF* regulates cardiac hypertrophy by targeting miR-489. *Circ. Res.* **114**, 1377–1388 (2014).
35. Wang, K. *et al.* CARL lncRNA inhibits anoxia-induced mitochondrial fission and apoptosis in cardiomyocytes by impairing miR-539-dependent *PHB2* downregulation. *Nat. Commun.* **5**, 3596 (2014).
36. Bell, R. D. *et al.* Identification and initial functional characterization of a human vascular cell-enriched long noncoding RNA. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 1249–1259 (2014).
37. Grote, P. *et al.* The tissue-specific lncRNA *Fendrr* is an essential regulator of heart and body wall development in the mouse. *Dev. Cell* **24**, 206–214 (2013).
38. Aguiló, F., Zhou, M. M. & Walsh, M. J. Long noncoding RNA, polycomb, and the ghosts haunting INK4b-ARF-INK4a expression. *Cancer Res.* **71**, 5365–5369 (2011).
39. Consortium, C. A. D. *et al.* Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat. Genet.* **45**, 25–33 (2013).
40. Samani, N. J. *et al.* Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* **357**, 443–453 (2007).
41. Vausort, M., Wagner, D. R. & Devaux, Y. Long noncoding RNAs in patients with acute myocardial infarction. *Circ. Res.* **115**, 668–677 (2014).
42. Bochenek, G. *et al.* The large non-coding RNA ANRIL, which is associated with atherosclerosis, periodontitis and several forms of cancer, regulates ADIPOR1, VAMP3 and C11ORF10. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 4516–4527 (2013).
43. Li, W. *et al.* Functional roles of enhancer RNAs for oestrogen-dependent transcriptional activation. *Nature* **498**, 516–520 (2013).
44. Zhou, X., Chen, J. & Tang, W. The molecular mechanism of HOTAIR in tumorigenesis, metastasis, and drug resistance. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* **46**, 1011–1015 (2014).
45. Liu, Y. *et al.* Expression profiling and ontology analysis of long noncoding RNAs in post-ischemic heart and their implied roles in ischemia/reperfusion injury. *Gene* **543**, 15–21 (2014).
46. Yang, K. C. *et al.* Deep RNA sequencing reveals dynamic regulation of myocardial noncoding RNAs in failing human heart and remodeling with mechanical circulatory support. *Circulation* **129**, 1009–1021 (2014).
47. Werber, M., Wittler, L., Timmermann, B., Grote, P. & Herrmann, B. G. The tissue-specific transcriptomic landscape of the mid-gestational mouse embryo. *Development* **141**, 2325–2330 (2014).
48. Zhang, L. *et al.* Identification of candidate long noncoding RNAs associated with left ventricular hypertrophy. *Clin. Transl. Sci.* <http://dx.doi.org/10.1111/cts.12234>.
49. Zangrando, J. *et al.* Identification of candidate long non-coding RNAs in response to myocardial infarction. *BMC Genomics* **15**, 460 (2014).
50. Yang, L. *et al.* ncRNA- and Pc2 methylation-dependent gene relocation between nuclear structures mediates gene activation programs. *Cell* **147**, 773–788 (2011).
51. Azzalin, C. M., Reichenbach, P., Khorlaoui, L., Giulotto, E. & Lingner, J. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* **318**, 798–801 (2007).
52. Porro, A. *et al.* Functional characterization of the TERRA transcriptome at damaged telomeres. *Nat. Commun.* **5**, 5379 (2014).
53. Abdelmohsen, K. *et al.* Senescence-associated lncRNAs: senescence-associated long noncoding RNAs. *Aging Cell* **12**, 890–900 (2013).
54. Bruneau, B. G. Signaling and transcriptional networks in heart development and regeneration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a008292 (2013).
55. Bulger, M. & Groudine, M. Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell* **144**, 327–339 (2011).
56. Consortium, E. P. *et al.* An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**, 57–74 (2012).
57. Yue, F. *et al.* A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature* **515**, 355–364 (2014).
58. Blow, M. J. *et al.* ChIP-Seq identification of weakly conserved heart enhancers. *Nat. Genet.* **42**, 806–810 (2010).
59. Narlikar, L. *et al.* Genome-wide discovery of human heart enhancers. *Genome Res.* **20**, 381–392 (2010).
60. May, D. *et al.* Large-scale discovery of enhancers from human heart tissue. *Nat. Genet.* **44**, 89–93 (2012).
61. Orom, U. A. *et al.* Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. *Cell* **143**, 46–58 (2010).
62. Wang, K. C. *et al.* A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature* **472**, 120–124 (2011).



63. Ounzain, S. *et al.* Functional importance of cardiac enhancer-associated noncoding RNAs in heart development and disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **76**, 55–70 (2014).
64. Wu, H. *et al.* Tissue-specific RNA expression marks distant-acting developmental enhancers. *PLoS Genet.* **10**, e1004610 (2014).
65. Wamstad, J. A. *et al.* Dynamic and coordinated epigenetic regulation of developmental transitions in the cardiac lineage. *Cell* **151**, 206–220 (2012).
66. Matkovich, S. J., Zhang, Y., Van Booven, D. J. & Dorn, G. W. 2nd. Deep mRNA sequencing for in vivo functional analysis of cardiac transcriptional regulators: application to Gαq. *Circ. Res.* **106**, 1459–1467 (2010).
67. Batista, P. J. & Chang, H. Y. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. *Cell* **152**, 1298–1307 (2013).
68. Dorn, G. W. 2nd & Matkovich, S. J. Epitranscriptional regulation of cardiovascular development and disease. *J. Physiol.* <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2014.283234>.
69. Margueron, R. & Reinberg, D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* **469**, 343–349 (2011).
70. Hang, C. T. *et al.* Chromatin regulation by Brg1 underlies heart muscle development and disease. *Nature* **466**, 62–67 (2010).
71. Gupta, S. K., Piccoli, M. T. & Thum, T. Non-coding RNAs in cardiovascular ageing. *Ageing Res. Rev.* **17**, 79–85 (2014).
72. Zhang, B. *et al.* The lncRNA *Malat1* is dispensable for mouse development but its transcription plays a cis-regulatory role in the adult. *Cell Rep.* **2**, 111–123 (2012).
73. Ratajczak, M. Z. Igf2-H19, an imprinted tandem gene, is an important regulator of embryonic development, a guardian of proliferation of adult pluripotent stem cells, a regulator of longevity, and a 'passkey' to cancerogenesis. *Folia Histochem. Cytobiol.* **50**, 171–179 (2012).
74. Wang, G. *et al.* Zbtb7a suppresses prostate cancer through repression of a Sox9-dependent pathway for cellular senescence bypass and tumor invasion. *Nat. Genet.* **45**, 739–746 (2013).
75. Kossack, N. *et al.* Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells. *Stem Cells* **27**, 138–149 (2009).
76. Lee, J. E., Bennett, C. F. & Cooper, T. A. RNase H-mediated degradation of toxic RNA in myotonic dystrophy type 1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 4221–4226 (2012).
77. Liu, J. Y. *et al.* Pathogenic role of lncRNA-MALAT1 in endothelial cell dysfunction in diabetes mellitus. *Cell Death Dis.* **5**, e1506 (2014).
78. Wu, G. *et al.* LincRNA-p21 regulates neointima formation, vascular smooth muscle cell proliferation, apoptosis, and atherosclerosis by enhancing p53 activity. *Circulation* **130**, 1452–1465 (2014).
79. Kumarswamy, R. *et al.* Circulating long noncoding RNA, LIPCAR, predicts survival in patients with heart failure. *Circ. Res.* **114**, 1569–1575 (2014).
80. Kirchhof, P. *et al.* The continuum of personalized cardiovascular medicine: a position paper of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J.* **35**, 3250–3257 (2014).
81. Elashoff, M. R. *et al.* Development of a blood-based gene expression algorithm for assessment of obstructive coronary artery disease in non-diabetic patients. *BMC Med. Genomics* **4**, 26 (2011).
82. Li, D. *et al.* Transcriptome analysis reveals distinct patterns of long noncoding RNAs in heart and plasma of mice with heart failure. *PLoS ONE* **8**, e77938 (2013).
83. Huang, X. *et al.* Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics* **14**, 319 (2013).
84. Lorenzen, J. M. *et al.* Circulating long noncoding RNA TapSAKI is a predictor of mortality in critically ill patients with acute kidney injury. *Clin. Chem.* **61**, 191–201 (2015).
85. Podlowski, S., Bramlage, P., Baumann, G., Morano, I. & Luther, H. P. Cardiac troponin I sense-antisense RNA duplexes in the myocardium. *J. Cell. Biochem.* **85**, 198–207 (2002).
86. Zolk, O., Solbach, T. F., Eschenhagen, T., Weidemann, A. & Fromm, M. F. Activation of negative regulators of the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in human end-stage heart failure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **376**, 315–320 (2008).
87. Carrion, K. *et al.* The long non-coding *HOTAIR* is modulated by cyclic stretch and WNT/β-CATENIN in human aortic valve cells and is a novel repressor of calcification genes. *PLoS ONE* **9**, e96577 (2014).
88. Bokil, N. J., Balsden, J. M., Radford, D. J. & Summers, K. M. Molecular genetics of long QT syndrome. *Mol. Genet. Metab.* **101**, 1–8 (2010).
89. Tsuiji, H. *et al.* Competition between a noncoding exon and introns: Gomafu contains tandem UACUAAAC repeats and associates with splicing factor-1. *Genes Cells* **16**, 479–490 (2011).
90. Ritter, O., Haase, H., Schulte, H. D., Lange, P. E. & Morano, I. Remodeling of the hypertrophied human myocardium by cardiac bHLH transcription factors. *J. Cell. Biochem.* **74**, 551–561 (1999).
91. Zhu, J. G. *et al.* Long noncoding RNAs expression profile of the developing mouse heart. *J. Cell. Biochem.* **115**, 910–918 (2014).

#### Acknowledgements

The authors are writing on behalf of the Cardiollinc network (<http://www.cardiollinc.org/>). Y.D. is supported by the Ministry of Higher Education and Research and the National Research Fund of Luxembourg. J.Z. has received a fellowship from the National Research Fund of Luxembourg (grant PhD-AFR 3972501). C.-P.C. is supported by the NIH (HL118087, HL121197), the AHA (Established Investigator Award 12EIA8960018), March of Dimes Foundation (#6-FY11-260), Indiana University (IU) School of Medicine—IU Health Strategic Research Initiative, and the IU Physician–Scientist Initiative, endowed by Lilly Endowment. G.W.D. is supported by a grant from the NIH (R01 HL108943). S.H. is supported by the European Union Commission's Seventh Framework programme under grant agreement N°305507 (HOMAGE), N°602904 (FIBROTARGETS), N°261409 (MEDIA), N°278249 (EU MASCARA), N°602156 (HECATOS), and the Marie-Curie Industry Academy Pathways and Partnerships (CARDIOMIR) N°285991. We acknowledge the Netherlands Heart Foundation, the Netherlands Organization for Scientific Research (KNAW), and the Royal Dutch Academy of Sciences (KNAW) for funding the concerted research activity of CVON Arena.

#### Author contributions

All the authors researched data for the article, discussed its contents, and wrote the manuscript. Y.D. and S.H. reviewed and edited the manuscript before submission.

# Résumé

L'infarctus du myocarde (IDM), se produisant suite à l'obstruction d'une artère coronaire, entraîne un remodelage ventriculaire, parfois délétère, responsable de l'apparition de l'insuffisance cardiaque (IC). L'IC est l'une des principales causes de mortalité dans le monde et malgré de nombreux progrès, elle reste un challenge en pratique clinique. Les récentes découvertes en termes de génomique ont montré l'implication des ARNs non codants dans les processus physiologiques et pathologiques et notamment dans les maladies cardiovasculaires. Les ARNs non codants sont divisés en 2 principaux groupes, les petits ARNs non codants contenant un nombre de nucléotides inférieur à 200 et parmi lesquels on trouve les microARNs (miARNs) et les longs ARNs non codants (lncARNs) possédant plus de 200 nucléotides.

L'objectif de ce travail a été d'étudier le potentiel des miARNs et des lncARNs en tant que biomarqueurs pronostiques et diagnostiques ainsi qu'en tant que cibles thérapeutiques dans l'IDM et le remodelage ventriculaire post-IDM conduisant à l'IC.

Dans un premier temps, nous avons évalué le pouvoir diagnostique des miARNs sur une cohorte de patients présentant des douleurs thoraciques. Le miR-208b et le miR-499 ont montré une bonne capacité diagnostique de l'IDM, ne dépassant toutefois pas celle des troponines. Le miR-208b possède également la capacité de prédire la mortalité des patients après IDM mais de façon modeste. Nous avons ensuite observé que le miR-150 présente une plus faible concentration dans le sang de patients avec un remodelage ventriculaire post-IDM par rapport aux patients sans remodelage, le positionnant comme un biomarqueur intéressant dans le pronostic de l'IC. Cette étude a également montré une modulation de l'expression du miR-150 dans le cœur de souris avec un remodelage ventriculaire le plaçant également comme une cible thérapeutique. Enfin, nous avons montré une régulation importante de plusieurs lncARNs dans le cœur de souris, 24 heures après IDM et 2 lncARNs, *MIRT1* et *MIRT2*, ont été mis en avant pour leur association avec le remodelage.

En conclusion, nos études ont montré l'utilité des ARNs non codants pour améliorer l'identification des patients à risque de développer une IC après IDM et ont permis également de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques qui pourraient prévenir le remodelage ventriculaire post-IDM. L'utilité clinique de ces résultats reste à démontrer.

**Mots clés:** infarctus du myocarde - remodelage ventriculaire gauche - microARNs - lncARNs - biomarqueur - cible thérapeutique

## Abstract

Myocardial infarction (MI), as a consequence of coronary thrombosis, leads to left ventricular remodeling which can be deleterious and responsible for the development of heart failure (HF). HF is one of the leading causes of mortality worldwide and despite many improvements, it remains a major challenge in clinical practice. Recent discoveries in genomics have showed the involvement of non-coding RNAs in physiological and pathological processes and notably linked to cardiovascular disease. Non-coding RNAs are divided into 2 main groups, small non-coding RNAs containing less than 200 nucleotides and including microRNAs (miRNAs) and long non-coding RNAs (lncRNAs) containing more than 200 nucleotides.

The goal of this work was to study the potential of miRNAs and lncRNAs as prognostic and diagnostic biomarkers and as therapeutic targets in MI and left ventricular remodeling leading to HF.

First, we evaluated the diagnostic value of miRNAs in patients with chest pain. miRNA-208b and miR-499 have shown a good diagnostic capacity for MI. However, these miRNAs failed to improve the diagnosis of MI by troponins. miRNA-208b could also predict patient mortality after MI but this capacity was modest. Then, we observed that miR-150 was present at a low level in the blood of patients with left ventricular remodeling post-MI compared to patients without remodeling. Therefore, miRNA-150 is an interesting prognostic biomarker. This study has also shown the modulation of miRNA-150 expression in mouse heart with left ventricular remodeling suggesting that it may be also a therapeutic target. Finally, we have shown a significant regulation of several lncRNAs in mouse heart, 24 hours after MI, and 2 lncRNAs, *MIRT1* and *MIRT2*, have been demonstrated for their association with left ventricular remodeling.

In conclusion, our studies have shown the utility of non-coding RNAs to improve the identification of patients at risk of developing HF after MI and also allowed to identify potential therapeutic targets to prevent left ventricular remodeling. The clinical usefulness of these findings remains to be demonstrated.

**Key words:** myocardial infarction - left ventricular remodeling - microRNAs - lncRNAs - biomarker - therapeutic target