



HAL
open science

Biomarqueurs de la fonction ventriculaire après un infarctus du myocarde : différences hommes-femmes

Torkia Lalem

► **To cite this version:**

Torkia Lalem. Biomarqueurs de la fonction ventriculaire après un infarctus du myocarde : différences hommes-femmes. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2018. Français. NNT : 2018LORR0173 . tel-01963817

HAL Id: tel-01963817

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01963817v1>

Submitted on 2 Sep 2019

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

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

par **Torkia LALEM**

Biomarqueurs de la fonction ventriculaire après un infarctus du myocarde : différences hommes-femmes

Le 16 novembre 2018

Membres du jury :

Rapporteurs : Mme. Céline GALES

PhD, DR INSERM UMR 1048, Université Paul Sabatier, Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires, Toulouse

Mr. Christophe BAUTERS

MD, PhD, PU-PH, INSERM U1167, CHRU de Lille, Université de Lille, Lille

Examineurs : Mme. Catherine LARUE

PhD, Directrice de la Biobanque Intégrée du Luxembourg (IBBL), Luxembourg

Mme. Marie-France SERONDE

MD, PhD, CHRU de Besançon, Besançon

Mr. Yvan DEVAUX

**PhD, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg
Directeur de thèse**

Mr. Michel OVIZE

MD, PhD, PU-PH, INSERM U1060, Hospices Civils de Lyon, Lyon

Mr. Athanase VISVIKIS

PhD, UMR7365, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), Nancy

Unité de Recherche Cardiovasculaire, Luxembourg Institute of Health (LIH)

1 A-B Rue Thomas Edison, 1445 Strassen

Remerciements

Je tiens tout d'abord et particulièrement à remercier Docteur Yvan Devaux de m'avoir accueillie dans son laboratoire, de m'avoir fait confiance et encadrée pendant ces trois années de thèse. Je le remercie également pour son temps, pour sa disponibilité, pour sa compréhension et sa patience. Je tiens fortement à remercier le regretté Docteur Daniel Wagner de m'avoir accueillie dans son laboratoire pendant mon stage de master et le début de ma thèse.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'unité de recherche cardiovasculaire, pour leur soutien, leurs conseils, leur sympathie et la bonne ambiance dans laquelle j'ai pu mener à bien ce projet de thèse. Merci à tous les membres du LIH qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

Mes sincères remerciements vont également au Professeur Michel Ovize et Docteur Athanase Visvikis qui ont accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse, à tous les membres de mon jury de thèse, en particulier, mes rapporteurs Professeur Christophe Bauters et Docteur Céline Galès.

Je tiens également à remercier le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche du Luxembourg ainsi que la Société Luxembourgeoise pour la Recherche sur les Maladies Cardiovasculaire pour avoir financé ces trois années de thèse. Je remercie particulièrement Docteur Charles Delagardelle de m'avoir fait confiance et pour m'avoir accordée un financement de thèse.

Mes remerciements vont également à ma grande famille et à mon cher mari pour m'avoir soutenue et portée dans les moments difficiles.

«Ma revendication en tant que femme c'est que ma différence soit prise en compte, que je ne sois pas contrainte de m'adapter au modèle masculin »

Simone Veil

Liste des publications présentées dans ce manuscrit :

A 3-gene Panel Improves the Prediction of Left Ventricular Dysfunction After Acute Myocardial Infarction.

Adeline Boileau MSc, Torkia Lalem MSc, Melanie Vausort MSc, Lu Zhang MSc, and Yvan Devaux PhD. *International Journal of Cardiology*. 2018;254:28-35.

Sex-Differences in Biomarkers of Outcome After Acute Myocardial Infarction

Torkia Lalem MSc, Yvan Devaux PhD. *Submitted*.

Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1 C is a Female-Specific Marker of Left Ventricular Function After Acute Myocardial Infarction

Torkia Lalem MSc, Lu Zhang MSc, Markus Scholz PhD, Ralph Burkhardt MD, Victoria Sacchetti MSc, Andrej Teren MD, Joachim Thierry MD, and Yvan Devaux PhD. *International Journal of Cardiology*. 2018 Jul 10 [Epub ahead of print].

Publications non présentées dans ce manuscrit :

Long non-coding RNAs in the atherosclerotic plaque

Serdal Arslan, Öcal Berkan, Torkia Lalem, Nil Özbilüm, Sabahattin Göksel, Özge Korkmaz, Nilgün Çetin, Yvan Devaux. *Atherosclerosis*. 2017;266:176-81.

Sex-specific microRNA biomarkers of left ventricular remodelling after acute myocardial infarction

Torkia Lalem MSc and Yvan Devaux PhD. *In preparation*.

MicroRNAs in the atherosclerotic plaque

Serdal Arslan, Torkia Lalem, Öcal Berkan, Nil Özbilüm, Sabahattin Göksel, Özge Korkmaz, Nilgün Çetin, Yvan Devaux. *Submitted*.

Posters:

Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1 C is a Female-Specific Marker of Left Ventricular Function After Acute Myocardial Infarction

Torkia Lalem MSc, Lu Zhang MSc, Markus Scholz PhD, Ralph Burkhardt MD, Victoria Saccheti MSc, Andrej Teren MD, Joachim Thierry MD, and Yvan Devaux PhD

- European Council of Cardiovascular Research Meeting, Lac de Garde, Octobre 2017
- Heart Failure Congress from the European Society of Cardiology, Vienne, Mai 2018.
- International Society of Heart Research Meeting, Amsterdam, Juillet 2018.
- European Society of Cardiology Congress, Munich, Août 2018

Liste des abréviations :

ADNc	ADN complémentaire
AIC	<i>Akaike information criterion</i>
ANP	<i>atrial natriuretic peptide</i>
AUC	<i>area under a curve</i>
AVC	accident vasculaire cérébral
BNP	<i>brain natriuretic peptide</i>
CDKN1C	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 1 C</i>
CHL	Centre Hospitalier du Luxembourg
CK	créatine kinase
CK-MB	<i>creatine kinase muscle/brain</i>
CML	cellule musculaire lisse
CRP	<i>C-reactive protein</i>
CT	<i>cycle threshold</i>
cTn	troponine cardiaque
CV	cardiovasculaire
DCM	dysfonction coronaire microvasculaire
dNTPs	<i>nucleoside triphosphate</i>
DSAC	dissection spontanée de l'artère coronaire
E2	estradiol
ECG	électrocardiogramme
EDTA	éthylènediaminetétraacétique
ER	<i>estrogen receptor</i>
FE	fraction d'éjection
FEinter	fraction d'éjection intermédiaire
FEp	fraction d'éjection préservée
FEr	fraction d'éjection réduite
FV	fonction ventriculaire
GWAS	<i>Genome Wide Association Studies</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HR	<i>hazard ratio</i>

Hs-Tn	troponine hypersensible
IC	insuffisance cardiaque
ICP	intervention coronaire percutanée
IDI	<i>integrated discrimination index</i>
IDM	infarctus aigu du myocarde
IL	Interleukine
IMC	indice de masse corporelle
IVC	intervalle de confiance
KCNQ1OT1	<i>KCNQ1 Opposite Strand/Antisense Transcript 1</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LMNB1	<i>lamin B1</i>
lncARN	long ARN non codant
LTBP4	<i>latent transforming growth factor beta binding protein 4</i>
MCV	maladie cardiovasculaire
MEC	matrice extracellulaire
MIAT	<i>myocardial infarction associated transcript</i>
MICRA	<i>Myocardial Infarction associated circular RNA</i>
miR	microARN
MMP	<i>Matrix metallopeptidase</i>
MYHEART	<i>myosin heavy-chain-associated RNA transcript</i>
NRI	<i>net reclassification index</i>
NSTEMI	<i>non ST segment elevation myocardial infarction</i>
NT-proBNP	<i>N terminal brain natriuretic peptide</i>
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
OR	<i>odds ratio</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RAAS	<i>Renin-Angiotensin-Aldosterone System</i>
RVG	remodelage ventriculaire gauche
SNS	système nerveux sympathique
STEMI	<i>ST segment elevation myocardial infarction</i>

SVF	sérum de veau fœtal
TB4	thymosine β -4
TGFBR1	<i>transforming growth factor beta receptor 1</i>
TGF β	<i>transforming growth factor beta</i>
TIMP	<i>metallopeptidase inhibitor</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TNXB	<i>tenascin XB</i>
UCA1	<i>urothelial carcinoma-associated 1</i>
VES	volume d'éjection systolique
VG	ventricule gauche
VTD	volume télédiastolique
VTS	volume télésystolique

Liste des illustrations :

Figures :

Figure 1. Le cœur humain

Figure 2. La circulation sanguine

Figure 3. Les artères coronaires

Figure 4. Les tuniques de la paroi cardiaque

Figure 5. Les catégories des MCV

Figure 6. Les causes de mortalité en Europe chez les hommes et les femmes

Figure 7. Différences hommes-femmes au niveau des facteurs de risque CV

Figure 8. L'incidence de l'IDM chez les femmes et les hommes en fonction de l'âge

Figure 9. Les types 1 et 2 de l'IDM

Figure 10. Les étapes de formation d'une plaque d'athérosclérose

Figure 11. Pathophysiologie de l'IDM sans obstruction

Figure 12. Diagnostic de l'IDM

Figure 13. Les biomarqueurs de la nécrose myocardique

Figure 14. La pathophysiologie de la cicatrisation post-IDM

Figure 15. Modifications morphologiques du cœur lors du remodelage délétère

Figure 16. Rôle du système nerveux sympathique et du système Rénine-Angiotensine-Aldostérone dans le remodelage délétère post-IDM

Figure 17. Différence hommes-femmes au niveau du RVG post-IDM

Figure 18. Dysfonction ventriculaire gauche lors d'une IC

Figure 19. Effets protecteurs des estrogènes contre le remodelage délétère après un IDM

Figure 20. Les étapes de l'étude LUCKY

Figure 21. Les étapes de l'étude LIFE-Heart

Tableaux:

Tableau 1. Comparaison des caractéristiques cliniques et démographiques entre les femmes et hommes de la cohorte LUCKY

Tableau 2. Comparaison des caractéristiques cliniques et démographiques entre les femmes et hommes de la cohorte LIFE-Heart

Tableau 3. Séquences des amorces utilisées au cours de la qPCR

Table des matières :

Remerciements	1
Liste des publications présentées dans ce manuscrit :.....	3
Liste des abréviations :	5
Liste des illustrations :.....	8
Table des matières :	10
Introduction	13
Hypothèse et organisation du travail	15
Présentation générale du manuscrit	17
Etude Bibliographique	18
1. Cœur :.....	19
2. Maladies cardiovasculaires :	24
3. Facteurs de risque cardiovasculaires :	27
4. Infarctus du myocarde :	33
4.1. Définition universelle de l'IDM :.....	33
4.2. Classification de l'IDM :.....	33
4.3. Pathophysiologie de l'IDM :	35
4.4. Diagnostic de l'IDM :	39
4.5. Prise en charge de l'IDM:	44
4.6. Mortalité post-IDM :	45
5. Remodelage ventriculaire post-IDM :.....	46
5.1. Pathophysiologie de la cicatrisation myocardique:.....	46
5.2. Remodelage délétère:	48
5.3. Différences hommes-femmes au niveau du remodelage post-IDM:.....	50
6. Insuffisance cardiaque :.....	54
7. Mécanismes responsables des différences hommes-femmes dans les MCV :.....	57
7.1. Mécanismes génétiques :.....	57
7.2. Mécanismes épigénétiques :.....	58
7.3. Hormones sexuelles :	59
8. Biomarqueurs du remodelage ventriculaire post-IDM :.....	63
8.1. Marqueurs de la tension mécanique :.....	63

8.2. Marqueurs de la nécrose myocardique :.....	66
8.3. Marqueurs de l'inflammation :.....	66
8.4. Marqueurs de la fibrose :.....	69
8.5. Biomarqueurs transcriptomiques :	71
8.5.1. ARNs codants :.....	71
8.5.2. ARNs non-codants :	72
9. Biomarqueurs cardiovasculaires spécifiques des femmes :.....	76
Matériels & Méthodes	78
1. Cohortes :.....	79
1.1. Cohorte LUCKY :	79
1.2. Etude LIFE-Heart:.....	81
2. Quantification des biomarqueurs cardiaques :	84
2.1. NT-proBNP :	84
2.2. cTnT et CK :.....	85
3. Isolation des cellules sanguines humaines :	86
3.1. Isolation des neutrophiles humains primaires :	86
3.2. Isolation des monocytes et des lymphocytes humains primaires :.....	86
4. Mesure de l'expression génique :.....	89
4.1. Extraction d'ARN :	89
4.2. Transcription inverse et PCR quantitative :	90
5. Analyses statistiques :	92
5.1. Analyses standards :.....	92
5.2. Analyses de prédiction :	92
Résultats.....	96
Etude N°1 : Identification d'une combinaison de trois gènes capables d'améliorer la prédiction de la fonction ventriculaire après un IDM.....	97
Etude N°2 : Différences hommes-femmes au niveau de la valeur prédictive post-IDM des biomarqueurs cardiaques	99
Etude N°3 : Identification du gène CDKN1C comme un biomarqueur de la fonction ventriculaire après un IDM spécifiquement chez les femmes	102
Discussion.....	105

Etude N°1 : Identification d'une combinaison de trois gènes capables d'améliorer la prédiction de la fonction ventriculaire après un IDM.....	106
Etude N°2 : Différences hommes-femmes au niveau de la valeur prédictive post-IDM des biomarqueurs cardiaques	110
Etude N°3 : Identification du gène CDKN1C comme un biomarqueur de la fonction ventriculaire après un IDM spécifiquement chez les femmes	113
Conclusions & Perspectives	116
Bibliographie	120

Introduction

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la première cause de mortalité dans le monde, aussi bien parmi les hommes que les femmes [1]. Les maladies coronariennes représentées principalement par l'infarctus de myocarde (IDM) sont responsables de plus de la moitié des décès causés par les MCV [1]. L'IDM se produit suite à l'obstruction d'une ou de plusieurs artères coronaires privant ainsi les cellules cardiaques d'oxygène et de nutriment. La partie du muscle cardiaque atteinte par l'ischémie rentre dans une phase de mort cellulaire et perd sa fonction contractile.

L'IDM démarre d'abord par des douleurs thoraciques qui nécessitent une hospitalisation urgente. Une fois arrivé aux urgences, le patient doit être pris en charge rapidement et des tests sont effectués afin de diagnostiquer l'origine de ces douleurs. Des biomarqueurs sécrétés par les cellules cardiaques en état de stress ischémique sont alors mesurés. L'IDM représente une urgence cardiologique qui nécessite une reperfusion rapide du muscle cardiaque, afin d'éviter le décès et toute autre complication associée au rythme.

Un remodelage ventriculaire gauche (RVG) est ensuite mis en place par le cœur afin de palier sa défaillance contractile et retrouver son intégrité fonctionnelle. Ce processus implique des événements cellulaires et moléculaires entraînant des changements au niveau de la morphologie, de la structure et la fonction du cœur. Si ce processus est dérégulé, il devient délétère et entraîne, à long terme, une insuffisance cardiaque (IC). L'IC est définie comme étant l'incapacité du cœur à éjecter assez de sang pour subvenir aux besoins énergétiques de l'organisme. Une fois l'IC installée, il apparaît difficilement envisageable de retrouver une fonction cardiaque normale.

NT-proBNP (N terminal pro Brain Natriuretic Peptide) représente le biomarqueur préférentiel pour prédire le risque du RVG et d'IC après un IDM. Néanmoins, ce biomarqueur fluctue considérablement après un IDM et le moment idéal pour le mesurer reste à déterminer [2]. D'un autre côté, NT-proBNP est affecté par plusieurs facteurs tels que l'âge, le sexe et l'obésité ce qui nuit à la précision prédictive de ce biomarqueur [3, 4]. La

découverte de nouveaux biomarqueurs d'une spécificité et de sensibilité suffisante pourrait offrir une prise en charge personnalisée et permettrait un meilleur suivi des patients.

Le sexe est l'un des facteurs majeurs qui affectent la symptomatologie, le traitement et la progression des MCV, y compris l'IDM. Les femmes atteinte d'IDM sont plus âgées présentent plus de comorbidités, particulièrement le diabète et l'hypertension [5]. En outre, la physiopathologie de l'IDM ne semble pas être la même entre les deux sexes. Bien que la rupture de plaque soit à l'origine de l'IDM chez les hommes, l'érosion semble être la cause la plus réponde chez les femmes [6]. De plus, l'IDM en absence d'obstruction coronaire est plus observée chez les femmes [7, 8]. Le processus du remodelage en réponse à l'IDM diffère entre les deux sexes [9] et le risque de développer une IC après un IDM est plus élevé chez les femmes [5].

Des différences ont également été observées au niveau des biomarqueurs cardiaques entre les femmes et les hommes, avec les femmes ayant des taux plus élevés de NT-proBNP [10] et plus bas de créatine kinase (CK) et de troponines cardiaques (cTns) [11]. L'interaction entre le sexe et la capacité de ces biomarqueurs à prédire le RVG après un IDM n'a pas encore été étudiée. D'un autre côté, étant donné que le processus de remodelage diffère entre les deux sexes, la découverte de biomarqueurs spécifiques à chaque sexe fournirait une prédiction plus précise.

Hypothèse et organisation du travail

L'objectif principal de ce travail de thèse est d'identifier de nouveaux biomarqueurs capables de prédire le risque de développer une dysfonction ventriculaire gauche après un IDM. Etant donné que de nombreuses différences existent entre les femmes et les hommes au niveau de la pathophysiologie de l'IDM et les biomarqueurs cardiaques, ainsi qu'au niveau de l'adaptation à l'ischémie myocardique, nous nous sommes intéressés à des biomarqueurs capables de prédire la dysfonction ventriculaire de manière spécifique à chaque sexe.

Tout d'abord, nous nous sommes proposé de valider un groupe de gènes dont l'association avec la dysfonction ventriculaire a été préalablement observée dans un petit groupe de patients. La validation de ces gènes a été effectuée chez 449 patients avec IDM appartenant à notre cohorte nationale LUCKY. Cette étude a donné naissance à la publication suivante :

A 3-gene Panel Improves the Prediction of Left Ventricular Dysfunction After Acute Myocardial Infarction. Adeline Boileau MSc, Torkia Lalem MSc, Melanie Vausort MSc, Lu Zhang MSc, and Yvan Devaux PhD. *International Journal of Cardiology*. 2018;254:28-35.

Ma contribution à cette étude s'est principalement portée sur la partie technique, c'est-à-dire la mesure des différents gènes par PCR quantitative ainsi que l'analyse des résultats.

Ensuite, nous avons émis l'hypothèse que les biomarqueurs cardiaques pourraient être associés avec la dysfonction ventriculaire et la mortalité post-IDM différemment chez les femmes et les hommes. Pour ce faire, nous avons comparé la capacité prédictive des trois biomarqueurs cardiaques cTnT, CK et NT-proBNP entre les femmes et les hommes de notre cohorte de patients LUCKY. Ma contribution à ce travail a consisté aux analyses statistiques ainsi qu'à la rédaction de l'article. Cette étude a généré la publication suivante :

Sex-Differences in Biomarkers of Outcome After Acute Myocardial Infarction. Torkia Lalem MSc, Yvan Devaux PhD (soumise).

Dans la troisième étude présentée dans ce manuscrit, nous avons découvert un nouveau biomarqueur capable de prédire la dysfonction ventriculaire post-IDM de manière spécifique aux femmes. La capacité prédictive de ce biomarqueur a été mesurée dans deux

cohortes indépendantes, la cohorte nationale LUCKY et la cohorte d'IDM de l'étude allemande LIFE-Heart. Ce travail a permis la génération de la publication suivante :

Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1 C is a Female-Specific Marker of Left Ventricular Function After Acute Myocardial Infarction. Torkia Lalem MSc, Lu Zhang MSc, Markus Scholz PhD, Ralph Burkhardt MD, Victoria Saccheti MSc, Andrej Teren MD, Joachim Thierry MD, and Yvan Devaux PhD. *International Journal of Cardiology*. 2018 Jul 10 [Epub ahead of print].

Ma contribution a concerné les différentes étapes de cette étude, depuis la mesure du biomarqueur d'intérêt, jusqu'à l'analyse des résultats, les analyses statistiques ainsi que la rédaction de l'article. Je tiens à préciser que j'ai bénéficié pour cette étude des aides précieuses de ma collègue Lu Zhang pour les analyses statistiques et de ma stagiaire en master Victoria Saccheti pour la partie technique.

Présentation générale du manuscrit

Ce manuscrit s'articule en 5 parties :

- La première partie est consacrée à une revue de l'état de l'art. Elle commence par une description du cœur, des MCV ainsi que des données épidémiologiques relatives aux MCV. Elle présente également les différences hommes-femmes connues au niveau de l'IDM, du RVG et de l'IC ainsi que les mécanismes qui seraient à l'origine de ces différences. Cette partie traite également de l'avancement de l'état de connaissance des biomarqueurs du RVG.
- La deuxième partie couvre les techniques qui ont été utilisées pour réaliser les trois études de ce manuscrit.
- La troisième partie présente les résultats obtenus lors des trois études.
- La quatrième partie porte sur une discussion des résultats obtenus lors des trois études.
- La dernière partie est consacrée aux conclusions et perspectives de ce travail de thèse.

Etude Bibliographique

1. Cœur :

Le cœur est l'organe vital logé au niveau du médiastin antérieur. Il est responsable de la distribution d'oxygène et de nutriments et de l'élimination des déchets de l'organisme grâce à ses contractions régulières. Le cœur est divisé en 4 cavités par deux cloisons verticale et horizontale : deux cavités supérieures appelées oreillettes et deux cavités inférieures appelées ventricules (**Figure 1**). Les deux ventricules sont séparés par le septum interventriculaire et les deux oreillettes sont séparées par le septum interauriculaire.

Le cœur est divisé alors en deux parties ; le cœur gauche et le cœur droit ou les oreillettes communiquent avec les ventricules à travers les orifices auriculo-ventriculaires. L'oreillette gauche communique avec le ventricule gauche (VG) à travers l'orifice mitral et l'oreillette droite communique avec le ventricule droit à travers l'orifice tricuspide. Le cœur possède également des valves cardiaques qui permettent au sang de circuler dans le même sens et ne pas refluer.

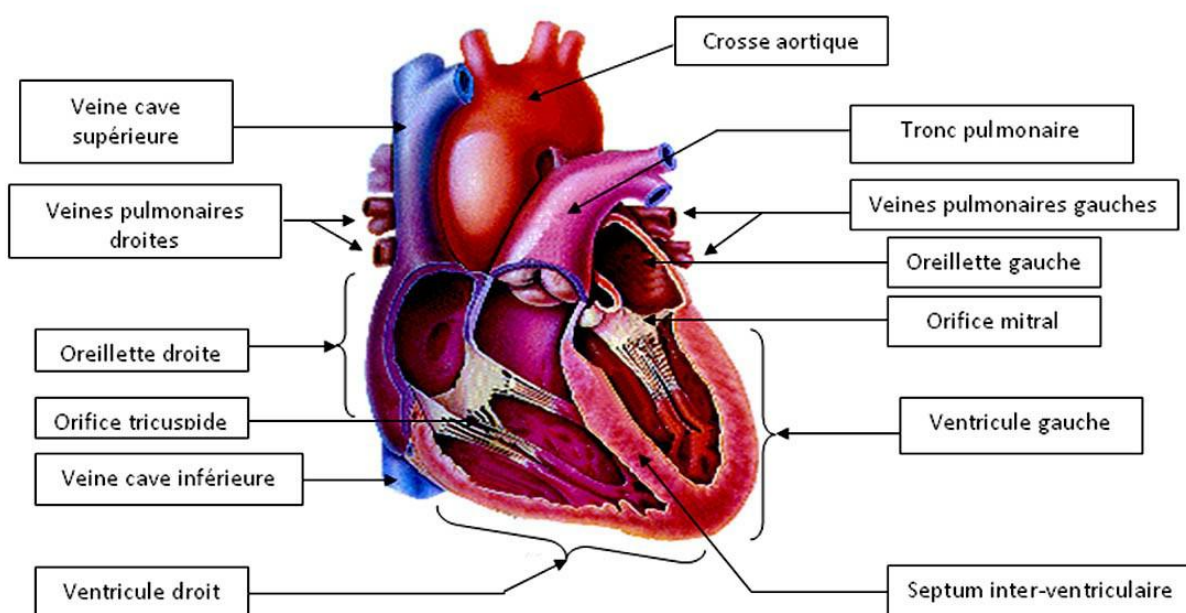


Figure 1. Le cœur humain
<http://campus.cerimes.fr/semiologie-cardiologique/enseignement/cardiologie/site/html/1.html>

Le cœur est à l'origine de la petite et de la grande circulation (**Figure 2**). Le cœur droit permet la *circulation pulmonaire ou petite circulation*. Il recueille le sang veineux

déssaturé en oxygène en provenance de l'ensemble des tissus de l'organisme à l'exception des poumons. Le sang est ensuite éjecté vers les poumons via l'artère pulmonaire. Au niveau des capillaires pulmonaires, le sang s'enrichit en oxygène et se débarrasse du gaz carbonique. *La circulation systémique ou la grande circulation* est assurée par le cœur gauche, qui va recueillir le sang riche en oxygène sortant des poumons par les veines pulmonaires pour l'acheminer vers tous les autres organes par l'intermédiaire de l'aorte, première artère à la sortie du VG.

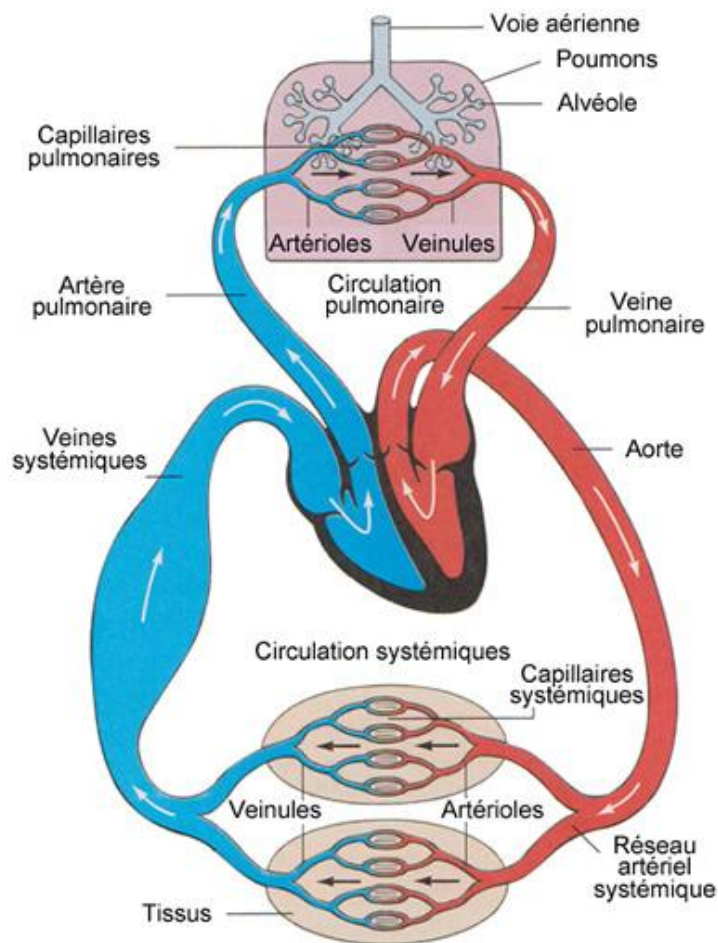


Figure 2. *La circulation sanguine*
www.corpshumain.ca

Cette circulation est possible grâce aux mouvements cycliques du cœur qui alternent des phases de contraction et de relâchement. La contraction est appelée *systole* et le relâchement est appelé *diastole*. Le cycle cardiaque correspond à un battement cardiaque et est appelé *révolution cardiaque*. Cette dernière est décomposée en trois phases : systole

auriculaire, systole ventriculaire et diastole. Dans un premier temps, les ventricules se remplissent grâce à la systole auriculaire. Ensuite, la systole ventriculaire qui est décomposée en contraction isovolumétrique permettant de mettre le sang sous pression et une contraction isotonique permettant l'éjection du sang vers les artères. La dernière phase est celle de la diastole ou de la relaxation du myocarde permettant à nouveau le remplissage des oreillettes.

Le cœur possède son propre système nerveux végétatif appelé *tissu nodal*. Ce dernier se trouve à l'intérieur dans l'épaisseur du myocarde. Il donne naissance et conduit les impulsions électriques engendrant les contractions cardiaques. Le cœur possède également sa propre circulation artérielle et veineuse appelée *circulation coronaire*. La circulation artérielle est assurée par les artères coronaires qui sont au nombre de deux : artère coronaire gauche et droite (**Figure 3**). Ces deux artères sont ramifiées en grand nombre de vaisseaux sanguins irriguant tout le cœur. L'artère coronaire gauche par exemple bifurque en artère interventriculaire antérieure et artère circonflexe.

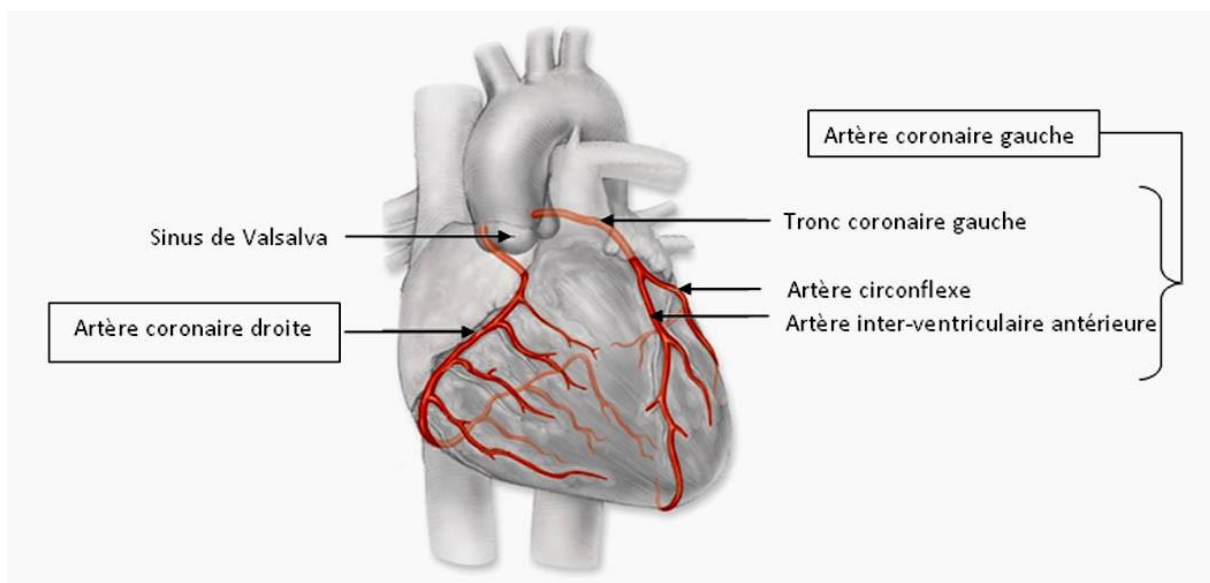


Figure 3. Les artères coronaires

Image d'après F. Netter, Atlas d'anatomie humaine [12]

La paroi cardiaque est constituée de 3 tuniques de l'intérieur vers l'extérieur : l'endocarde, le myocarde et le péricarde (**Figure 4**).

L'endocarde correspond à une membrane endothéliale tapissant la face interne du cœur et se prolongeant par l'intima des gros vaisseaux. L'un de ses rôles est d'éviter la coagulation du sang au contact des parois.

Le myocarde est le muscle cardiaque, c'est un muscle strié autonome régulé par le système nerveux sympathique (SNS) et parasympathique. Il est constitué de plusieurs types cellulaires dont majoritairement les cardiomyocytes qui permettent la contraction, mais aussi les fibroblastes qui constituent la matrice extracellulaire (MEC) et les cellules endothéliales qui forment les vaisseaux sanguins et les cellules nerveuses sensibles.

Le péricarde est un sac à double paroi enveloppant le cœur. Il est composé de plusieurs feuillets : le feuillet fibreux, le feuillet pariétal, qui est séparé du feuillet viscéral grâce à l'espace péricardique. Ce dernier est rempli de liquide interstitiel qui permet les mouvements du cœur.

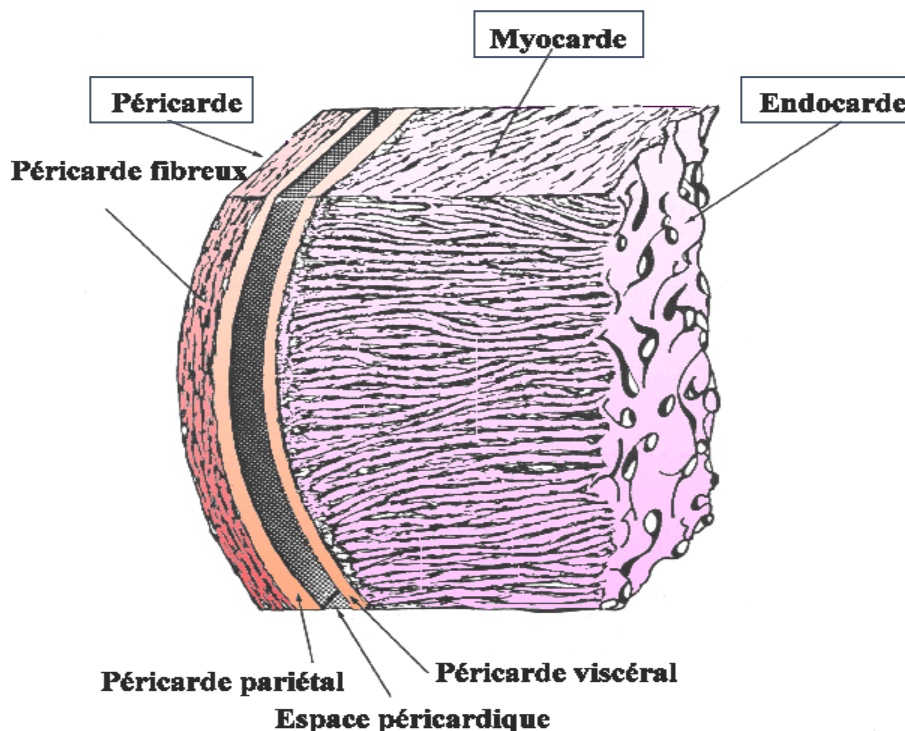


Figure 4. Les tuniques de la paroi cardiaque
<http://foulon.chez-alice.fr/Alie%202.000/DATAS/MODULE1/TunCoeur.htm>

Le volume éjecté par le ventricule gauche, appelé volume d'éjection systolique (VES), dépend de la force de contraction du cœur. Le VES est proche de 100ml chez un homme adulte sain. Ce volume peut être calculé en soustrayant le volume de sang dans le VG en fin de systole (volume télésystolique VTS) du volume en fin de diastole (volume télédiastolique VTD). La division du VES par le VTD permet le calcul de la fraction d'éjection (FE), qui représente un indice du bon fonctionnement du cœur. Les valeurs normales d'une FE normale sont $67 \pm 8\%$ [13].

Des différences existent entre les femmes et les hommes au niveau de la taille des artères coronaires ainsi que les dimensions et la fonction ventriculaire (FV). La taille des artères coronaires chez les femmes sont plus petites que celles chez les hommes [14]. En outre, La taille de la cavité ventriculaire gauche est plus petite chez les femmes ce qui engendre des VES plus petits [15]. Néanmoins, le débit cardiaque est comparable entre les deux sexes étant donné que le rythme cardiaque est plus rapide chez les femmes compensant ainsi la différence au niveau du VES [16]. La FE augmente avec l'âge chez les deux genres mais cette augmentation est plus importante chez les femmes [15]. Au niveau histologique, les femmes et les hommes possèdent le même nombre de cardiomyocytes à la naissance [15]. Avec l'âge, les femmes perdent relativement moins de cardiomyocytes que les hommes.

2. Maladies cardiovasculaires :

Les MCV correspondent aux désordres affectant le cœur et les vaisseaux sanguins. Ils en existe plusieurs types (*Figure 5*): les cardiopathies coronariennes (problème d'irrigation du muscle cardiaque), les maladies cérébrovasculaires (problème de circulation des vaisseaux du cerveau), les artériopathies périphériques (problème de circulation sanguine dans les bras et les jambes), les cardiopathies rhumatismales (dommages au niveau des articulations et de valvules cardiaques causés par une infection bactérienne), les cardiopathies congénitales, les thromboses veineuses profondes et les embolies pulmonaires (l'obstruction de l'artère pulmonaire par un caillot de sang).

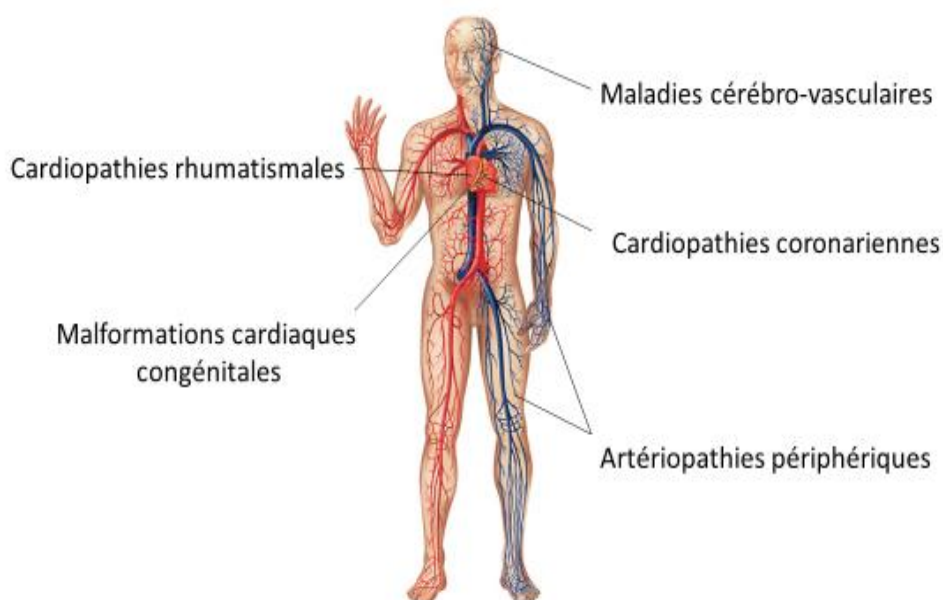


Figure 5. Les catégories des MCV

<http://www.prioritesantemutualiste.fr/psm/maladies-examens/maladies-cardio-vasculaires>

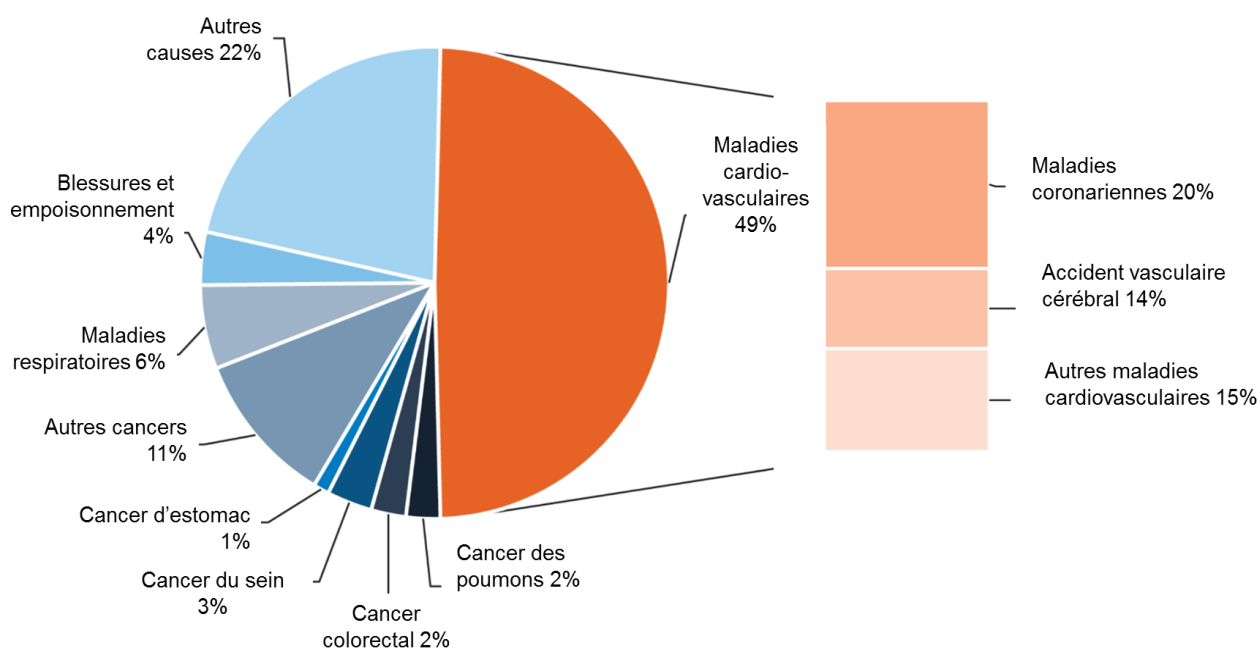
En Europe, comme à travers le monde [17], les MCV représentent la première cause de mortalité. Elles tuent tous les ans 4 millions de personnes à travers le continent, ce qui compte pour 45% de la mortalité totale [1]. Les maladies coronariennes ainsi que les maladies ischémiques cérébrales sont au premier rang, causant respectivement la mort de 1,8

millions et d'un millions de personnes. Bien que la mortalité causée par les MCV continue à baisser à travers l'Europe, leur incidence ne cesse pas d'augmenter, reflétant le vieillissement de la population européenne [18].

Les MCV tuent plus de femmes (2,2 millions) que d'hommes (1,8 millions), ce qui compte pour 49% et 40% de la mortalité globale chez les femmes et les hommes [1] respectivement (**Figure 6**). De plus, les maladies coronariennes tuent autant de femmes (19%) que d'hommes (20%) [1]. Les causes de la mortalité cardiovasculaire (CV) globale plus accrue chez les femmes sont les accidents vasculaires cérébraux (AVC) et les autres MCV qui sont plus fatals pour les femmes (**Figure 6**) [18].

La majorité des décès causés par les MCV (60%) surviennent chez les personnes âgées de 75 ans et plus. La mortalité prématurée (avant l'âge de 75 ans) est plus répondeue parmi les hommes. Avant l'âge de 65 ans, les MCV tuent 2 fois plus d'hommes que de femmes [18]. Cette différence au niveau de la mortalité prématurée entre les deux sexes est majoritairement observée dans les maladies coronariennes.

B. Femmes



A. Hommes

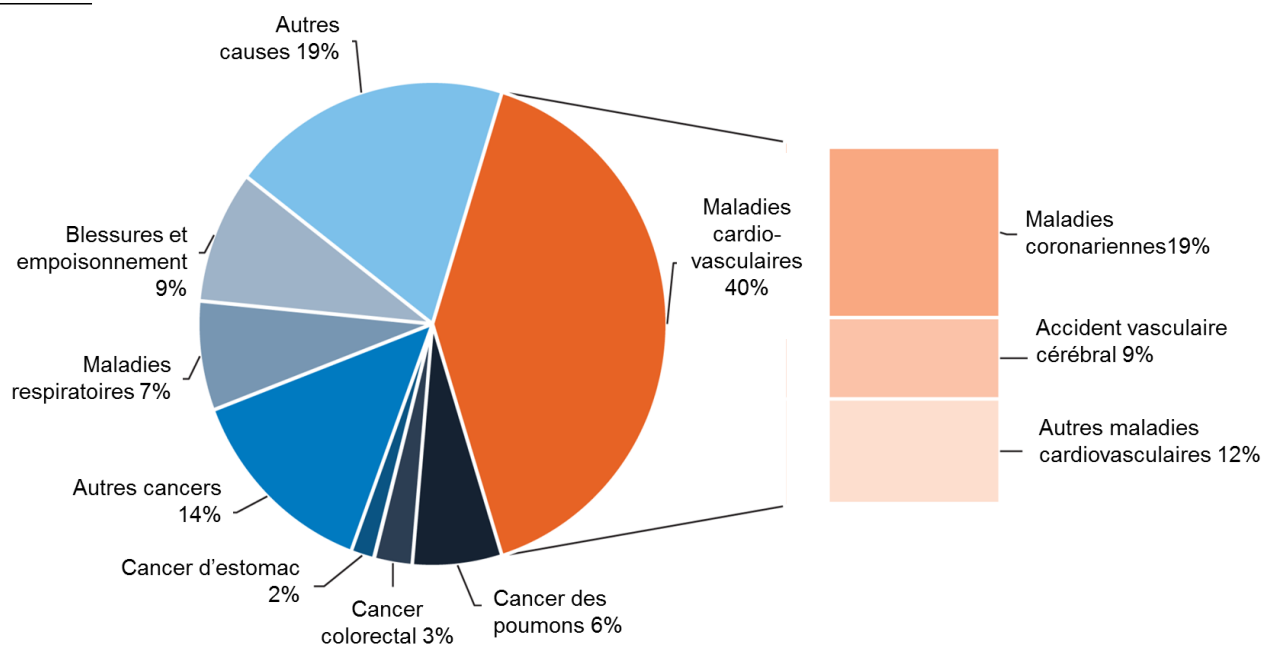


Figure 6. Les causes de mortalité en Europe chez les hommes et les femmes (Traduite depuis la version originale) [1].

3. Facteurs de risque cardiovasculaires :

Le développement des MCV est influencé par différents facteurs de risque qui sont regroupés en facteurs de risques dits « modifiables » engendrés par le mode de vie, et d'autres dits « non modifiables » tels que l'âge, le sexe, l'hérédité et l'historique médical. L'association entre les facteurs de risque modifiables et les maladies coronariennes a été analysée dans l'étude *INTERHEART* incluant 15000 cas d'IDM et le même nombre de contrôles à travers le monde [19]. L'étude a déterminé 9 facteurs de risque responsables de 90% d'IDM : tabac, lipides, diabète, hypertension, consommation modérée d'alcool, obésité, régime diététique, activité physique et facteurs psychosociaux. [19]. L'association de ces différents facteurs de risque avec les MCV est différente entre les deux sexes (*Figure 7*).

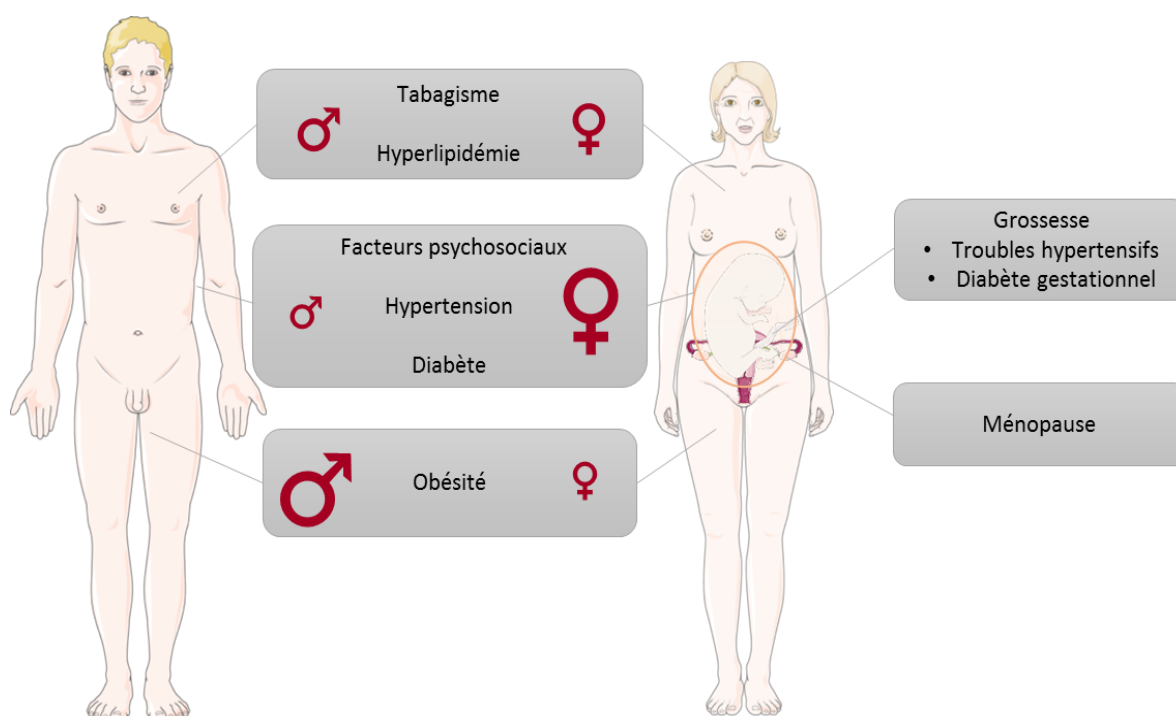


Figure 7. Différence hommes-femmes au niveau des facteurs de risque CV

Diabète :

Le risque de mortalité CV est trois fois plus élevé chez les diabétiques par rapport aux non-diabétiques [20]. Comparées aux hommes, les femmes diagnostiquées pour un diabète de type II ont plus de risque de développer des MCV [21-23]. En outre, chez les patients atteints

de maladies coronariennes, l'association du diabète de type II avec un mauvais pronostic est plus puissante chez les femmes [22]. Une méta-analyse incluant 37 études à travers le monde (447 064 patients dont 45% des femmes) a montré que les femmes diabétiques avaient plus de risque d'avoir une maladie coronarienne fatale que les hommes diabétiques (7,7% pour les femmes versus 4,5% pour les hommes) [24]. Les dérégulations lipidiques qui sont plus importantes chez les femmes diabétiques semblent être à l'origine de ces différences [23, 25, 26].

Hypertension :

L'IDM et les AVC constituent les MCV les plus associés avec l'hypertension [27]. L'étude *INTERHEART* a montré que 22% d'IDM en Europe était associé à l'hypertension, ce qui attribue aux hypertendus deux fois plus de risque d'avoir un IDM [19].

L'incidence de l'hypertension est plus élevée chez les jeunes hommes (<45 ans) par rapport aux femmes du même âge [28]. Néanmoins, la différence homme-femme dans la prévalence d'hypertension disparaît entre l'âge de 45 à 60 ans. Après l'âge de 60 ans, le nombre de femmes hypertendues dépasse celui des hommes [28]. Une pression artérielle élevée est associée à un risque CV plus élevé chez les femmes [29]. Les femmes hypertendues ont 3 fois plus de risque de développer une IC et un AVC par rapport à leurs homologues masculins [6, 30].

Hyperlipidémie:

L'hyperlipidémie est l'un des principaux facteurs de risque CV, en particulier celui associé avec les maladies coronariennes [31]. Après l'âge de 20 ans, les taux du cholestérol LDL (pour low density lipoprotein), qualifié du mauvais cholestérol, augmente progressivement chez les deux sexes, sauf que cette augmentation est plus accélérée chez les hommes. [32]. Quant aux taux de HDL (pour high density lipoprotein), qualifié du bon cholestérol, sont moindres chez les hommes par rapport aux femmes, et ce à tous les âges [33]. La capacité du cholestérol total et du LDL à prédire le risque de maladies coronariennes est comparable chez les deux sexes [34]. Des taux réduits de HDL prédisent le risque de maladies coronariennes équitablement chez les deux sexes de jeune âge. Chez les personnes

âgées, ce facteur est associé avec un risque élevé de maladies coronariennes chez les femmes mais pas les hommes [34].

Obésité

L'étude *Framingham* a montré que les personnes en surpoids ont deux fois plus de risque de développer une IC [35]. L'obésité est plus fréquente parmi les femmes et ce à n'importe quel statut socio-économique [36]. La distribution de l'adiposité à travers le corps est différente entre les hommes et les femmes [37]. L'obésité masculine est caractérisée par une localisation abdominale ou autrement appelée viscérale qui est associée avec un risque cardio-métabolique élevé. Chez les femmes, l'obésité est plutôt de localisation sous-cutanée périphérique. Après la ménopause, la distribution de la graisse devient plutôt semblable à celle des hommes, de localisation majoritairement viscérale. La mortalité CV a été comparée entre 22000 femmes et 23000 hommes appartenant à 11 cohortes de plusieurs pays européens. La mortalité CV était plus élevée parmi les hommes et ce dans les différentes catégories d'indice de masse corporelle (IMC) [38].

Tabagisme :

Les fumeurs ont 3 à 8 fois plus de risque de subir un IDM par rapport aux non-fumeurs [6]. La caractérisation clinique de 4 registres français d'IDM (de 1995 à 2010), a montré que l'âge moyen des patients ayant subi un IDM a baissé de 66,2 à 63,3 [39]. Cela est expliqué en partie par l'augmentation des taux d'obésité (14% à 20%) et du tabagisme (32% à 41%) comme facteurs de risque. Malgré que la proportion globale des femmes n'ait pas changé pendant les 15 ans, celle des femmes de moins de 60 ans a augmenté de 12% à 25%. Cette augmentation a été accompagnée par une augmentation dans la prévalence des patients, notamment des femmes, qui présentent l'obésité ou le tabagisme comme leur seul facteur de risque [39]. Le risque d'IDM associé au tabagisme était comparable entre les deux sexes de l'étude *INTERHEART* [19]. Néanmoins, chez les ex-fumeurs, le risque était plus élevé chez les hommes.

Facteurs psychosociaux :

L'association américaine du cœur souligne que la majorité de jeunes femmes souffrant de maladies coronariennes appartiennent à un milieu défavorisé et ont une lourde charge de facteurs psychosociaux tels que la dépression, les troubles de stress post-traumatique, et les traumatismes subis pendant l'enfance [40]. Les facteurs psychosociaux étaient plus associés avec le risque d'IDM chez les femmes que les hommes dans l'étude *INTERHEART* [19].

Facteurs de risque spécifiques aux femmes :

Aux facteurs de risque CV communs entre les deux sexes, s'ajoutent des facteurs de risque CV qui sont spécifiques aux femmes. Ces facteurs de risque sont liés à la gestation, au rôle reproducteur et aux hormones sexuelles, tels que les troubles hypertensifs lors de la grossesse, le diabète gestationnel et la ménarche/ménopause.

Dans les pays industrialisés, les complications CV surviennent dans 0.2-4% des grossesses [41]. Le risque de complications CV lors de la grossesse ne cesse d'augmenter, justifié par l'augmentation de l'âge des femmes primigestes ainsi que la prévalence de facteurs de risque tels que le diabète, l'hypertension et l'obésité chez les femmes enceintes. En outre, comme le traitement des maladies cardiaques congénitales est devenu plus efficace, beaucoup de femmes souffrant de ces maladies atteignent l'âge de procréation [41]. Dans les pays occidentaux, les maladies cardiaques constituent la première cause de décès maternel lors de la grossesse [42].

Les *troubles hypertensifs* survenant lors de la grossesse sont répartis en : hypertension gestationnelle et pré-éclampsie (définie comme étant une augmentation de la pression artérielle accompagnée de protéinurie). Ils surviennent dans 6-8% des grossesses [41], et sont considérés comme des facteurs de risque majeurs. Les femmes atteintes d'hypertension gestationnelle ont un risque élevé de développer l'hypertension plus tard dans leur vie [43].

Le *diabète gestationnel* est défini comme étant une intolérance au glucose diagnostiquée pour la première fois lors de la grossesse. Rapidement après l'accouchement,

l'homéostasie glycémique est restaurée mais le risque de développer un diabète de type II reste élevé chez ces femmes. Dans une méta-analyse incluant 20 cohortes à travers le monde, les auteurs ont montré que les femmes ayant développé le diabète pendant leur grossesse, ont 7 fois plus de risque de développer le diabète de type II plus tard dans leur vie, et ce comparées aux femmes restées normo-glycémiques lors de leurs grossesses [44].

La *ménopause* n'est pas un simple marqueur de la fin de la reproduction mais représente un indicateur de l'état de santé globale des femmes. Cette association entre la ménopause et la santé des femmes est due à l'effet des estrogènes sur la fonction des différents organes. Une ménopause précoce, avant l'âge de 45 ans, est associée avec un risque CV plus élevé par rapport à la ménopause survenant après cet âge [45].

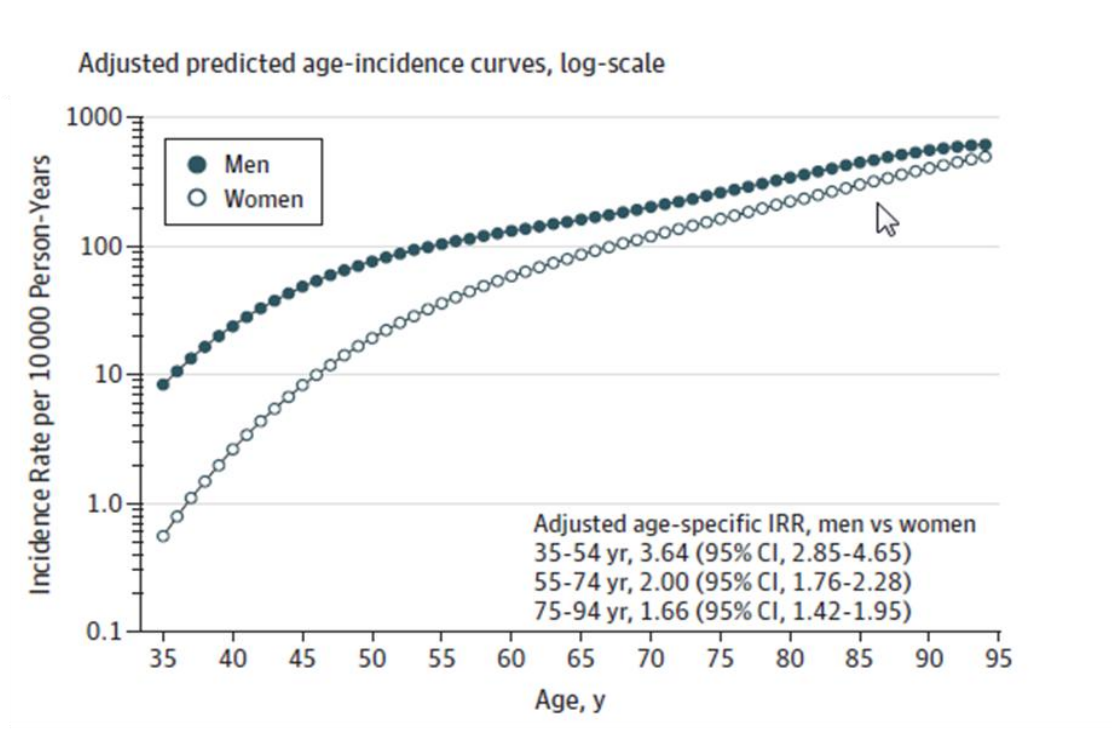


Figure 8. L'incidence de l'IDM chez les femmes et les hommes en fonction de l'âge [46]

Chez les femmes, il est difficile de distinguer entre l'effet de l'âge et de la ménopause sur le risque CV. Dans une cohorte de population norvégienne de 33 997 participants (dont 51% de femmes) [46], le risque d'avoir un IDM a été comparé entre les deux sexes. L'incidence d'IDM était plus élevée chez les hommes et cette différence diminuait avec l'âge, tout en persistant (**Figure 8**). Dans cette étude, le facteur de risque le plus associé avec

le sexe féminin était les taux de HDL. Les taux de HDL plus élevés chez les femmes seraient responsables de moins d'incidence d'IDM. Le risque de développer un IDM augmente avec l'âge chez les deux sexes. Cette augmentation est lente avant l'âge de 65 ans et devient abrupte après cet âge (*Figure 8*). Cette diminution au niveau de l'écart entre les deux sexes ne semble pas être expliquée par la ménopause, étant donné que la ménopause n'induit pas une augmentation soudaine dans le risque d'IDM chez les femmes. L'incapacité de la thérapie de remplacement hormonal à réduire le risque CV chez les femmes ménopausées pourrait également suggérer que la ménopause n'est pas à l'origine des différences du risque CV entre les deux sexes [6].

4. Infarctus du myocarde :

Les cardiopathies ischémiques, dont l'IDM, sont la première cause de mortalité dans le monde [1]. Elles sont définies comme étant une diminution dans la perfusion sanguine du muscle cardiaque, réduisant ainsi les apports en oxygène et en nutriments. Elles sont causées le plus souvent par la rupture d'une plaque d'athérosclérose. Elles représentent une urgence cardiologique, étant donné que des troubles de rythme peuvent les compliquer à tout moment et de manière imprévisible.

4.1. Définition universelle de l'IDM :

L'IDM est défini comme étant une nécrose myocardique dans un contexte clinique d'ischémie myocardique aiguë [47]. Le diagnostic de l'IDM est basé sur une modification au niveau de cTns avec au moins un des deux critères suivants: présence de symptôme ischémique ou une évidence de nécrose myocardique observée par électrocardiogramme (ECG) ou par une technique d'imagerie.

4.2. Classification de l'IDM :

Il existe cinq types différents d'IDM, classifiés selon les différences pathologiques, cliniques, diagnostiques et même l'approche thérapeutique suivie pour la prise en charge des patients. Les types 1 et 2 sont les principaux types d'IDM (*Figure 9*).

IDM type 1 (spontané) :

Cette classe d'IDM est souvent le résultat d'une coronaropathie. Il survient suite à une rupture, fissuration, ulcération, érosion ou dissection d'une plaque d'athérome, entraînant un thrombus au niveau d'une ou de plusieurs artères coronaires. Cette occlusion entraîne une diminution du flux sanguin ou une embolie plaquettaire aboutissant ainsi à une nécrose myocardique. En outre, l'absence de coronaropathies significatives, ou d'obstruction à l'angiographie peut également être observée. Cette catégorie non obstructive peut être

observée dans 5-20% des cas présentant un syndrome coronarien [48-50], ce qui est le plus souvent le cas chez les femmes.

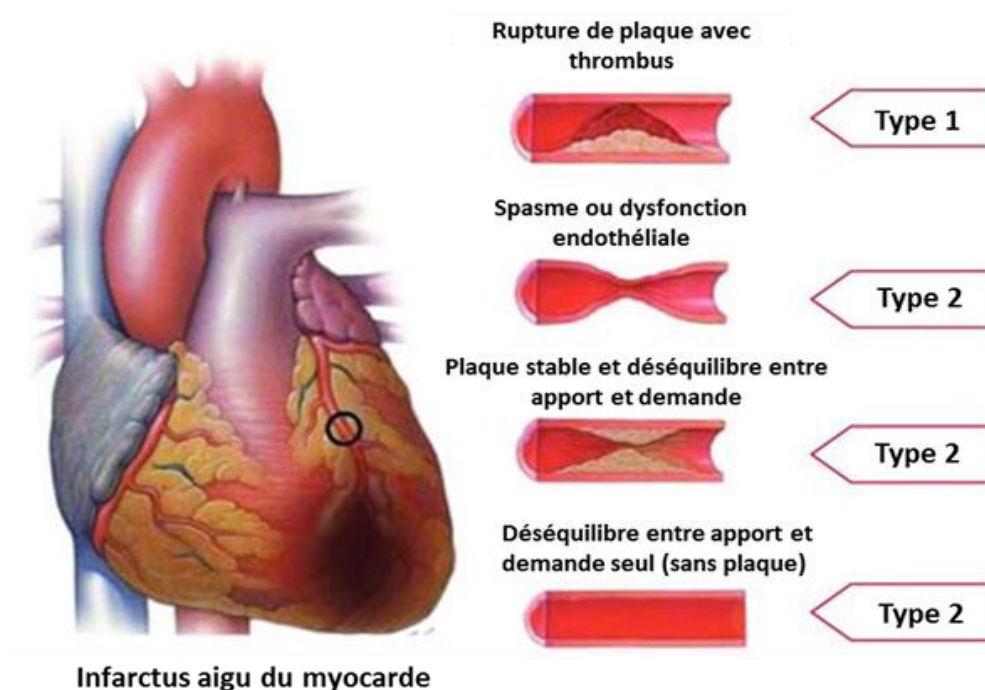


Figure 9. Les types 1 et 2 de l'IDM (traduite à partir de la version originale) [47]

IDM type 2 (secondaire) :

Cette deuxième catégorie est due à un déséquilibre en oxygène entre l'apport et la demande résultant d'une condition autre qu'une coronaropathie sous-jacente. Spasme et dysfonctions endothéliales jouent un rôle majeur dans le développement de ce type d'IDM [51-53].

IDM type 3 :

Décès d'origine cardiaque suite à des symptômes suggérant une ischémie myocardique et des modifications au niveau de l'ECG (nouvelles ou présumées nouvelles) ou l'apparition d'un nouveau bloc de branche gauche [47]. Le décès est survenu avant le prélèvement sanguin ou avant l'augmentation des biomarqueurs cardiaques.

IDM type 4 et 5

Un IDM peut survenir lors d'une intervention coronaire percutanée (ICP) (type 4) ou d'un pontage coronaire (type 5) [47]. Une élévation des cTns est observée à la fin de l'intervention.

4.3. Pathophysiologie de l'IDM :

La pathophysiologie de l'IDM, définie comme étant une formation de thrombus suite à une rupture de plaque d'athérosclérose, a significativement évolué lors des deux dernières décennies. L'étude *VIRGO* (Variation in Recovery: Role of Gender on Outcomes of Young Acute Myocardial Infarction Patients) a montré qu'une femme sur 8 se présentant avec un syndrome coronarien aigu ne peut pas être classée selon la définition universelle de l'IDM [54]. A l'instar des hommes qui se présentent le plus souvent avec des coronaropathies occlusives, les coronaropathies non occlusives sont plus répandues chez les femmes [55].

IDM avec obstruction :

L'IDM avec obstruction est engendré principalement par une rupture ou une érosion d'une plaque d'athérosclérose. Cette dernière est définie comme étant une réaction inflammatoire en réponse à l'accumulation des lipides au niveau de la paroi artérielle (**Figure 10**) [56]. L'hypercholestérolémie, en particulier l'augmentation des LDL, est considérée comme un facteur principal favorisant la formation d'une plaque d'athérosclérose. La première étape dans la formation d'une plaque consiste à la pénétration des LDL dans l'espace sous-endothélial favorisée par l'augmentation de la perméabilité endothéliale. Ces LDL sont alors piégés dans l'espace intimal en interagissant avec la matrice extracellulaire (MEC) [56]. Ces molécules de LDL vont ensuite subir une série de modifications, principalement l'oxydation, qui est responsable de l'initiation de la réponse inflammatoire qui s'intensifie par l'infiltration des monocytes et des lymphocytes T et la sécrétion d'un cocktail de cytokines [56]. Des métalloprotéinases (MMPs) capables de dégrader la MEC sont également libérées par les cellules de la plaque.

La deuxième conséquence de l'oxydation des LDL est la formation des cellules spumeuses qui sont des macrophages gorgées de LDL oxydés. Quant aux LDL extracellulaires, ils se regroupent au centre de la plaque pour former un amas appelé noyau graisseux. D'un autre côté, des cellules musculaires lisses (CML) migrent à partir de la média vers l'intima où ils prolifèrent. Les CML acquièrent ensuite un phénotype sécrétoire produisant de la MEC. L'accumulation de la MEC aboutit à la formation de la *chape fibreuse*.

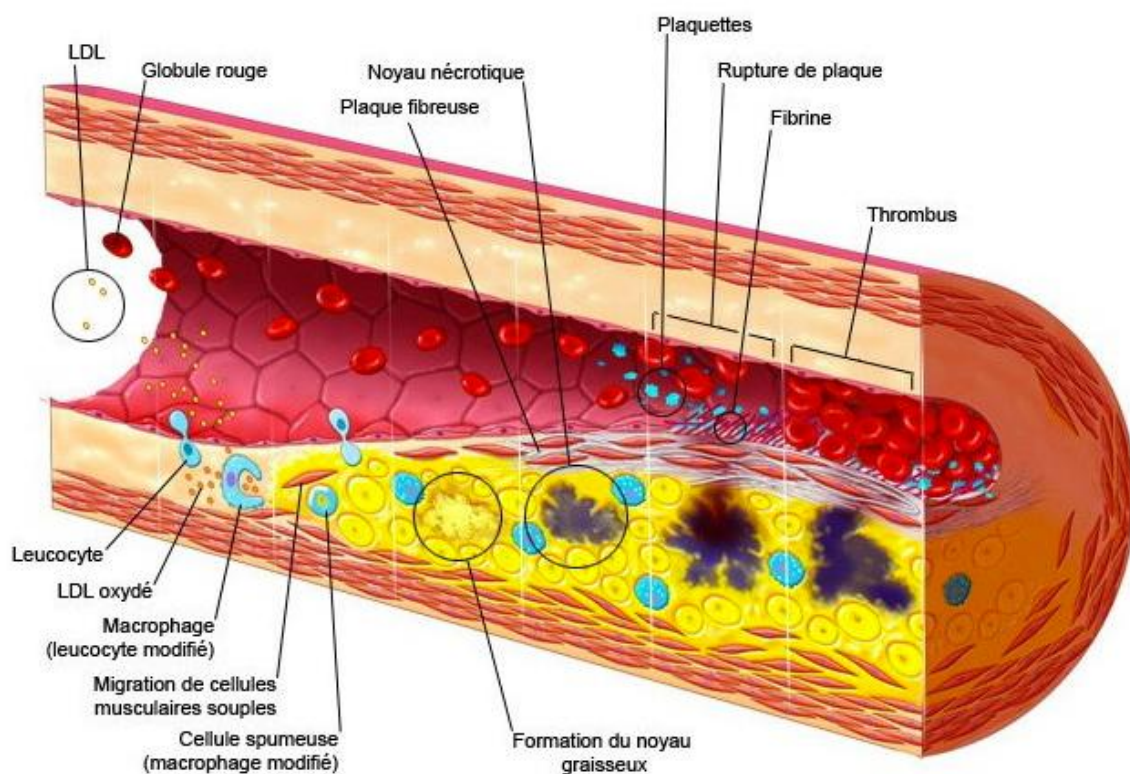


Figure 10. Les étapes de formation d'une plaque d'athérosclérose

<http://jb-ricco.com/quest-ce-que-latherosclerose/>

Ce qui fait le danger d'une plaque n'est pas tant sa taille mais les complications possibles issues de la rupture ou de l'érosion de l'endothélium revêtant la chape fibreuse (**Figure 10**) [56]. Une plaque est considérée vulnérable, si elle contient un grand centre lipidique et une chape fibreuse fine. La rupture de la chape fibreuse met en contact le sang

avec les éléments thrombogènes de la plaque. Cela induit l'agrégation plaquettaire et la cascade de coagulation aboutissant à un phénomène de thrombose. Dans 20-40% des cas d'IDM [57], il n'existe pas une rupture de la plaque mais une érosion superficielle mettant en contact le sang avec l'espace sous-endothélial, mais les conséquences en matière de thrombose sont similaires. La formation de thrombus peut entraîner un rétrécissement de la lumière sans toutefois entraîner une occlusion complète, le syndrome résultant est alors l'angor instable. En cas d'une occlusion complète, le patient souffre alors d'un IDM.

Les femmes présentent plus souvent que les hommes une coronaropathie non-obstructive (15% versus 8%) [6]. Les données d'angiographie et d'échographie intravasculaire de l'étude *PROSPECT* (The Providing Regional Observations to Study Predictors of Events in the Coronary Tree), ont montré que les femmes avec syndrome coronarien aigu présentaient une coronaropathie moins extensive [58]. En outre, elles présentent moins de rupture de plaque que les hommes (6,6% versus 16,3% $p = 0,002$) [58]. Ces observations ont ultérieurement été confirmées dans l'étude *ADAPT-DES* (the assessment of dual antiplatelet therapy with drug-eluting stents) où les femmes avaient une chape fibreuse moins fine par rapport aux hommes et moins de rupture de plaque. Cette différence atténuait avec l'âge en étant significative seulement chez les patients de moins de 65 ans [6]. Les facteurs protégeant les femmes contre une coronaropathie lourde avant la ménopause semblent être plus liés à leur profil lipidique favorable que les hormones sexuelles [55]. De plus, le sexe féminin et le tabagisme sont les facteurs de risque les plus associées avec l'érosion de la plaque d'athérosclérose [59].

IDM sans obstruction :

L'ischémie myocardique peut également se présenter sans coronaropathie obstructive (**Figure 11**). Malgré le risque de développer des complications CV, ces patients sont faussement rassurés et reçoivent moins de thérapies que ceux avec obstruction [14]. L'étude *WISE* (Women's Ischemia Syndrome Evaluation) a montré que la moitié des femmes s'étant présenté pour une ischémie myocardique n'avaient pas de coronaropathie obstructive (définie comme $\geq 50\%$ de sténose au niveau d'au moins une artère coronaire) [7, 8].

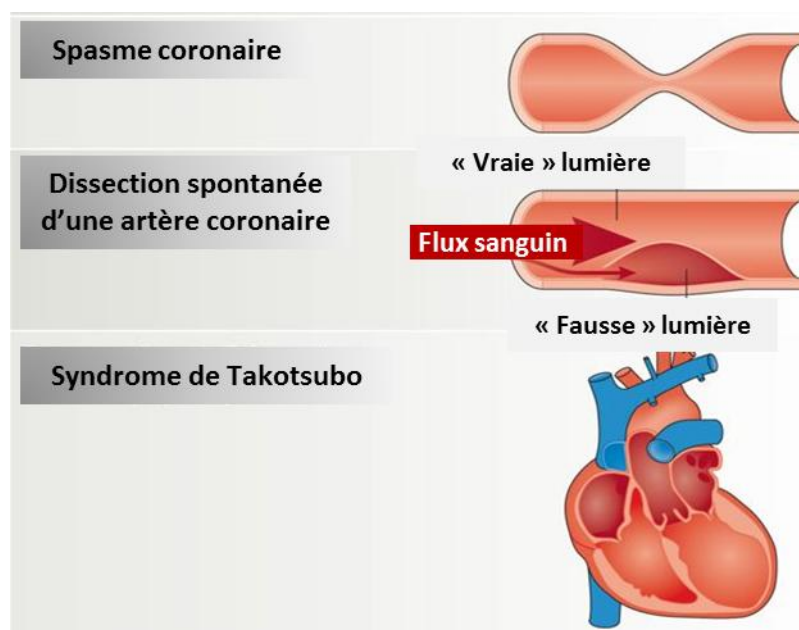


Figure 11. Pathophysiologie de l'IDM sans obstruction (Traduite depuis la version originale) [60]

Le spasme coronaire est une vasoconstriction intense conduisant à l'obstruction partielle ou complète de l'artère coronaire (**Figure 11**) [61]. Il survient souvent au repos, particulièrement pendant la nuit. Sur l'ECG, le spasme coronaire est souvent associé à une dépression du segment ST. Le mécanisme pathogénique semble inclure plusieurs facteurs, plus particulièrement l'hyperréactivité des CML, le système nerveux autonome et les cellules endothéliales [6, 61].

La dissection spontanée d'une artère coronaire (DSAC) est définie comme étant une déchirure au niveau de la paroi artérielle qui n'est pas d'origine iatrogénique ou traumatique (**Figure 11**). Le progrès dans l'utilisation des techniques d'imagerie coronaire a amélioré le diagnostic de cette manifestation. La DSAC serait à l'origine d'environ 1,7-4% des syndromes coronariens aigus [62, 63]. De plus, il est bien plus présent chez les femmes (92-95%) notamment d'âge jeune (entre 44 et 55 ans) [6]. La dissection peut avoir lieu entre n'importe laquelle des 3 couches de la paroi artérielle (adventice, media ou intima). Plusieurs facteurs semblent être responsables de ce phénomène. Dans la majorité des cas, les patients

souffrent d'une artériopathie fragilisant la paroi artérielle [6]. Des cas associés à des dysplasies fibromusculaires ont également été rapportés [6].

Le syndrome de Takotsubo, également appelé le *syndrome des cœurs brisés* est caractérisé par un apex en forme de ballon (**Figure 11**). Il se présente avec des symptômes très similaires à un syndrome coronarien aigu, avec une douleur thoracique et des modifications ischémiques au niveau de l'ECG [64]. Une cardiotoxicité aux catécholamines suite à un stress physique ou émotionnel a été désignée comme une des principales causes de ce syndrome [64]. 1-2% des patients se présentant pour un syndrome coronarien aigu sont diagnostiqués pour avoir le syndrome de Takotsubo dont 90% sont des femmes ménopausées [64-66]. Parmi les caractéristiques cliniques de ce syndrome: des anomalies au niveau de la mobilité de la paroi ventriculaire, augmentation importante des peptides natriurétiques, augmentation légère des cTns, récupération de la FV systolique dans les 3 à 6 mois [6].

La dysfonction coronaire microvasculaire (DCM) contribue également aux signes et aux symptômes d'ischémie non-obstructive. Elle correspond à une altération au niveau de la régulation des vaisseaux de résistance myocardiques également appelés artérioles coronaires [67]. La prévalence de cette dysfonction microvasculaire est plus élevée chez les femmes, qui représentent 70% des patients [68]. Une altération au niveau de la fonction endothéliale des artérioles coronaires est considérée comme l'un des principaux mécanismes responsables de DCM. Cette dysfonction endothéliale entraîne une réponse exagérée aux stimuli vasoconstricteurs et une incapacité de produire du monoxyde d'azote en réponse à ces stimuli [67]. Un déséquilibre au niveau du système nerveux autonome induisant une vasoconstriction exagérée a également été suggéré [67].

4.4. Diagnostic de l'IDM :

Le diagnostic de l'IDM se base sur l'élévation des biomarqueurs cardiaques, préférentiellement les cTns, accompagnée d'une évidence de l'ischémie myocardique aiguë : symptômes ischémiques, des modifications au niveau de l'ECG ou toute autre évidence de nécrose myocardique (**Figure 12**).

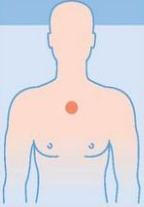
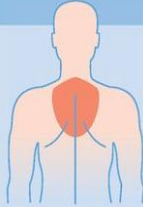

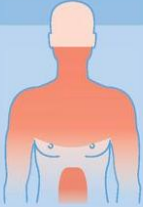

	Likelihood of myocardial infarction (MI)				
	LOW				HIGH
I. Clinical setting Symptoms and vital signs					 CPR/shock
II. Electro-cardiogram (ECG)	Normal ECG	ST depression (mild)		ST depression	ST elevation
III. Troponin level at 0h		-	-/+	+	+++ ++++
IV. Troponin change (within 1, 2 or 3h)		-	-/+	+	+++ If any of the above, consider direct rule-in
Triage decision	Rule-out MI		Observe		Rule-in MI
Differential diagnosis	Noncardiac		Unstable angina	Other cardiac	NSTEMI STEMI

Figure 12. Diagnostic de l'IDM [69]

Les caractéristiques cliniques de l'ischémie myocardique :

Les symptômes ischémiques sont une combinaison de douleur thoracique, qui peut s'étendre au niveau des membres supérieurs, de la mâchoire inférieure, du cou, et de l'épigastre (**Figure 12**), et ce à l'effort comme au repos et ne disparaît pas avec le mouvement de la région douloureuse. Fatigues, dyspnée, nausées, hypersudation et palpitations peuvent également être observées [70].

Les différentes études montrent que la douleur thoracique est le symptôme le plus répandu chez les deux sexes [71-73]. Dans le registre *GRACE* (Global Registry of Acute Coronary Events) incluant plus de 19000 hommes et femmes, la proportion des patients ayant présenté une douleur thoracique était comparable entre les femmes (92%) et les hommes

(94%) [71]. Dans le même registre, les femmes présentaient plus souvent des symptômes atypiques (douleurs maxillaires, nausées et vomissements) en absence de douleur thoracique.

Dans une autre cohorte incluant des patients de plus jeune âge (≤ 55 ans), la douleur thoracique était le symptôme le plus répandu chez les deux sexes (86% chez les hommes et 81% chez les femmes) [72]. En absence de douleur thoracique chez ces patients, les mêmes symptômes atypiques ont été observés chez les deux sexes (fatigue, sensation de chaleur, dyspnée, hypersudation, douleur au niveau de l'épaule et du bras gauche). Néanmoins, les femmes se présentaient avec un nombre plus élevé de ces symptômes [72].

Dans le registre américain *NRMI* (National Registry of Myocardial Infarction) incluant plus d'un million de patients, une interaction entre le sexe, l'âge et la douleur thoracique a été observée [73]. Dans cette cohorte, les patients ne présentant pas une douleur thoracique étaient le plus souvent des NSTEMI (Non ST-segment elevation myocardial infarction) et recevant moins de thérapie de reperfusion, et ce indépendamment du sexe. L'absence de douleur thoracique a été observée chez 35% de patients et était plus répandue chez les femmes (45%) par rapport aux hommes (30%). Cette différence était plus importante chez les jeunes patients et rétrécissait avec l'âge [73].

Les femmes tendent à se présenter plus tard que les hommes après le début de la douleur [74, 75] particulièrement les femmes âgées de moins de 60 ans [75]. Cette observation impose des campagnes de sensibilisation du risque de maladies ischémiques chez les femmes et notamment des symptômes qualifiés d'atypiques.

ECG :

L'ECG constitue le premier test diagnostique chez les patients soupçonnés d'avoir un IDM. Il doit être promptement enregistré et interprété, idéalement dans les 10 minutes suivant la présentation du patient [76]. Afin de pouvoir détecter toute modification, l'enregistrement de plusieurs ECG est requis, particulièrement si le premier ECG n'est pas évocateur d'IDM. Des modifications au niveau du segment ST, des ondes T et Q permettent aux cliniciens de déterminer l'artère responsable de l'IDM, estimer la taille du myocarde en ischémie, et de

déterminer l'approche thérapeutique à suivre. Les manifestations les plus précoces de l'ischémie myocardique sont bien le segment ST et l'onde T. Un sus-décalage prolongé du segment ST (>20 minutes) est un indicateur d'une occlusion coronaire aiguë et d'une nécrose myocardique. L'IDM est qualifié de STEMI (ST segment elevation myocardia infarction), ou NSTEMI en fonction respectivement de la présence ou de l'absence de cette modification (**Figure 12**).

Le temps de référence (≤ 10 min) entre la présentation du patient et le premier ECG est moins respecté chez les femmes par rapport aux hommes [77]. Des différences sont également observées au niveau du diagnostic final des femmes et des hommes. Dans l'étude *GUSTO IIb* incluant plus de 12000 patients, STEMI était beaucoup moins fréquent chez les femmes par rapport aux hommes (27% versus 37%). De plus, parmi les patients avec NSTEMI et angor instable, les femmes étaient plus diagnostiquées pour angor instable [78]. La faible prévalence de STEMI chez les femmes a ultérieurement été confirmée dans l'étude *GWTG-CAD* (Get With the Guidelines-Coronary Artery Disease) incluant 78254 patients (28,2% versus 35,1%; $p < 0,0001$) [79].

Mesure des cTns:

Les Tns sont des protéines structurales des muscles striées, squelettiques et cardiaques. Leur rôle principal est de réguler la contraction en fonction du calcium intracellulaire. Parmi les 3 sous-unités (I, T et C), les isoformes I et T sont spécifiques du muscle cardiaque. Les cTns représentent les biomarqueurs préférentiels pour le diagnostic de l'IDM, et ce grâce à leur haute spécificité et sensibilité par rapport à d'autres biomarqueurs tels que la CK, la fraction MB de la CK ou la myoglobine (**Figure 13**) [76]. Les cTns représentent le marqueur de référence pour la détection de la nécrose myocardique, que ce soit d'origine ischémique ou pas. La moitié des patients se présentant avec une douleur thoracique, ont un niveau élevé de cTns [80].

La définition universelle de l'IDM a fixé la limite de référence supérieure de cTns au 99^{ème} percentile d'une population de référence. Les techniques de dosage dites hypersensibles se caractérisent par des valeurs du 99^{ème} percentile très basses et une précision analytique de

10% pour des valeurs proches voire inférieures au 99^{ème} percentile. La commercialisation de ces techniques ont permis la détection de la cTn dans la population saine [81]. De plus, l'utilisation de ces techniques a augmenté le diagnostic de l'IDM et a permis une meilleure identification des patients à risque d'une récurrence d'IDM ou de mortalité [82, 83].

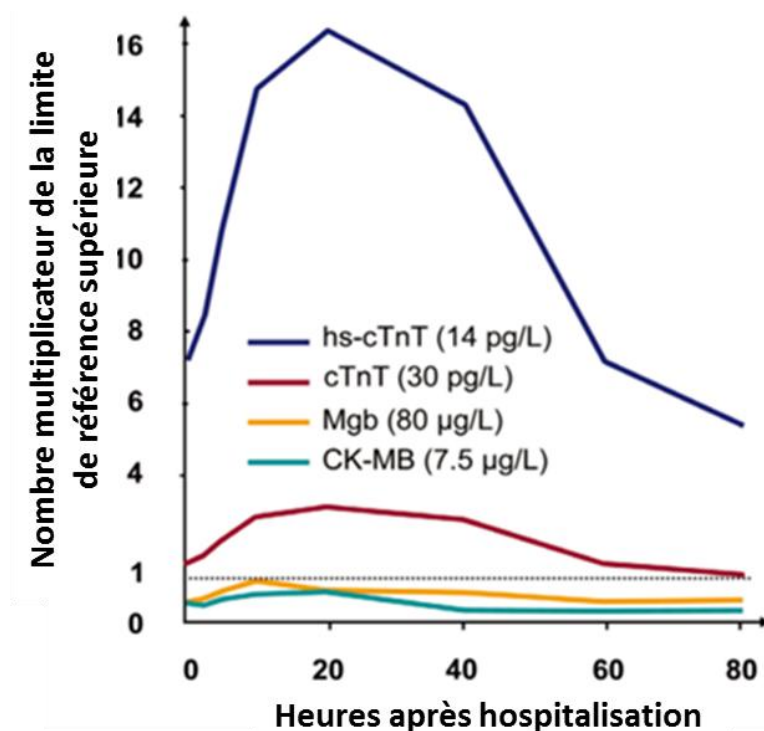


Figure 13. Les biomarqueurs de la nécrose myocardique. Traduite depuis la version originale [81]

Les concentrations de cTns sont inférieures chez les femmes par rapport aux hommes [84, 85]. Cette différence pourrait être justifiée par la faible masse du VG chez les femmes [86]. Néanmoins, il a récemment été montré que les valeurs supérieures de cTns chez les hommes persistaient même après ajustement avec la masse ventriculaire [87].

Le diagnostic de l'IDM était plus souvent manqué chez les femmes, notamment celles âgées de moins de 60 ans [88, 89]. Comme la limite de référence supérieure de cTns est 1,2-2,4 fois plus élevée chez les hommes par rapport aux femmes [85], l'utilisation d'un seuil de cTns spécifique de chaque sexe s'est imposée. Shah et ses collègues ont comparé l'utilisation d'un seul seuil générique de cTn versus l'utilisation de deux seuils spécifiques à chaque sexe,

chez 1126 patients suspectés d'avoir un syndrome coronarien aigu [86]. L'utilisation du seuil spécifique à chaque sexe a permis une augmentation importante dans le nombre de femmes diagnostiquées (16% versus 22%, $p < 0,001$). Cette augmentation était moins importante chez les hommes (19% versus 21%, $p < 0,021$). L'utilisation du seuil spécifique a également permis une meilleure stratification des femmes à risque de récurrences ou de mortalité que le seuil générique [86].

4.5. Prise en charge de l'IDM:

ICP est la stratégie préférentielle pour traiter les patients avec un STEMI dans les 12 heures suivant le début de symptômes ou dans les 3 heures suivant le diagnostic confirmé de STEMI [70]. L'utilisation de l'ICP prime sur celle des thérapies fibrinolytiques. Une réduction plus importante au niveau de la mortalité, de l'incidence de l'AVC et d'IDM a été observée avec l'ICP primaire par rapport à la fibrinolyse [70]. L'ICP améliore la survie aussi bien chez les hommes que les femmes avec STEMI [6]. Dans le cas où l'ICP n'est pas disponible, la fibrinolyse peut être promptement administrée. Chez les patients NSTEMI, la décision de l'utilisation d'une stratégie invasive (ICP ou pontage coronaire) est basée sur l'estimation des risques ischémique et hémorragique [76]. Des médicaments sont également administrés afin de soulager la douleur ischémique tels les nitrates, les bêtabloquants et les opioïdes. Afin de minimiser la formation et la propagation du thrombus, des antiplaquettaires et anticoagulants peuvent également être administrés.

Les femmes reçoivent moins de traitements médicamenteux et de thérapies invasives [6] et accèdent plus tardivement au traitement par rapport aux hommes [74, 75, 79]. Dans l'étude *GWTC-CAD* [79], les femmes recevaient moins d'aspirine et de bêtabloquant dans les 24 heures suivant leur présentation à l'hôpital (91% versus 93,3% et 84,7% versus 87,2%; $p < 0,0001$ pour chaque comparaison). Parmi les patients STEMI ayant reçu une reperfusion (fibrinolyse ou ICP), les femmes étaient moins souvent traitées (56,3% versus 73%, $P < 0,0001$). D'un autre côté, le risque hémorragique suite à une ICP est supérieur chez les femmes [90]. Malgré que l'approche radiale semble réduire le risque d'hémorragie, elle est plus difficile chez les femmes étant donné la petite taille de leurs artères radiales [6].

4.6. Mortalité post-IDM :

Malgré le grand progrès au niveau de la prise en charge de l’IDM, la mortalité intra-hospitalière suite à un STEMI reste importante. Elle varie entre 4 et 15% dans les différents registres européens [70]. Dans les cinq ans suivant l’IDM, le risque de mortalité et d’évènement CV est 30% plus élevé chez les patients atteints d’IDM par rapport à la population générale [91].

De nombreuses études ont montré que les taux de mortalités supérieures chez les femmes étaient justifiées par l’âge plus avancé et l’accumulation des comorbidités notamment l’hypertension, le diabète et l’IC chez ces femmes [78, 92-94]. Néanmoins, la différence dans le risque de mortalité entre les deux sexes semble être affectée par l’âge ainsi que par le type d’IDM. Dans une étude incluant 78254 patients, l’analyse univariée a révélé une mortalité intra-hospitalière plus accrue chez les femmes aussi bien dans la cohorte globale que dans le groupe STEMI. Dans le modèle multivariable, cette différence a disparu dans la cohorte globale mais a persisté chez les STEMI (OR (intervalle de confiance (IVC) 95%), 1,12 (1,02-1,23); $p = 0,015$) [79]. Cette différence a été expliquée par une mortalité accrue chez les femmes STEMI lors des premières 24h d’hospitalisation comme elles recevaient moins de thérapies pendant cette période.

Les études *ISAR-RISK* et *ART*, où 1604 hommes et femmes ont été appariés pour l’âge (67 ans) et les facteurs de risque, ont révélé une mortalité à long terme (5 ans) comparable entre les deux sexes. La mortalité à court terme (1 an) dans ce groupe de patients était plus accrue chez les femmes [95]. Similairement, dans une cohorte canadienne de 70628 patients, la mortalité dans les 30 jours suivant un IDM était plus accrue chez les femmes, particulièrement celles âgées de moins de 55 ans [96].

5. Remodelage ventriculaire post-IDM :

Après un IDM, une série d'évènements moléculaires et cellulaires sont déclenchés afin de préserver le reste du myocarde et de remplacer les cardiomyocytes nécrosés. Comme les cardiomyocytes perdent leur capacité proliférative après la naissance [97], le remplacement de la région myocardique nécrosée par un tissu fibrotique représente la seule alternative pour conserver l'intégrité structurale du cœur, éviter la rupture de sa paroi et maintenir sa fonction contractile. S'il est excessif, ce processus de réparation peut devenir délétère, favorisant le remodelage du cœur et l'IC.

5.1. Pathophysiologie de la cicatrisation myocardique:

Ce processus a été divisé en 4 étapes (*Figure 14*): la phase de mort des cardiomyocytes, la phase d'inflammation aigüe, la formation du tissu de granulation et la formation du tissu fibrotique [98]. Dans les 30 minutes suivant l'ischémie, les cardiomyocytes subissent une mort cellulaire irréversible aboutissant à l'activation de la réponse inflammatoire [99]. Suite à cette mort cellulaire, des signaux endogènes sont libérés par les cellules nécrosées afin d'informer les cellules immunitaires de la présence d'une nécrose [100]. Dans les quelques heures suivant l'IDM, les neutrophiles et les monocytes sont rapidement infiltrés dans la zone nécrosée afin de nettoyer les débris cellulaires. Pour pénétrer dans le tissu, ces cellules inflammatoires sécrètent des MMPs qui dégradent la MEC [99]. Après la phagocytose de débris cellulaires, les neutrophiles et les monocytes cèdent la place à d'autres populations cellulaires, notamment les fibroblastes et les cellules endothéliales, qui prolifèrent et migrent vers la zone infarctée [101].

L'activation du TGF β (transforming growth factor beta) représente un lien moléculaire essentiel entre la phase d'inflammation et celle de granulation [102]. Lors de la phase de granulation, le tissu nécrosé est remplacé progressivement par un tissu cicatriciel. Pour ce faire, les fibroblastes deviennent les cellules majoritaires de la zone infarctée et adoptent un phénotype sécrétoire et prolifératif connu sous le nom des myofibroblastes [103]. Les myofibroblastes jouent un rôle primordial dans le processus de cicatrisation à travers la sécrétion de la MEC [104]. Le dépôt de collagène de type III est essentiel pour augmenter la résistance de la paroi ventriculaire et la protéger contre la rupture [103]. D'un autre côté, les

cellules endothéliales forment des vaisseaux sanguins afin d'assurer un apport suffisant en oxygène et en nutriment aux myofibroblastes. De plus, les cardiomyocytes de la zone bordante et des zones non-infarciées deviennent hypertrophiques afin de compenser la baisse de contractilité [105].

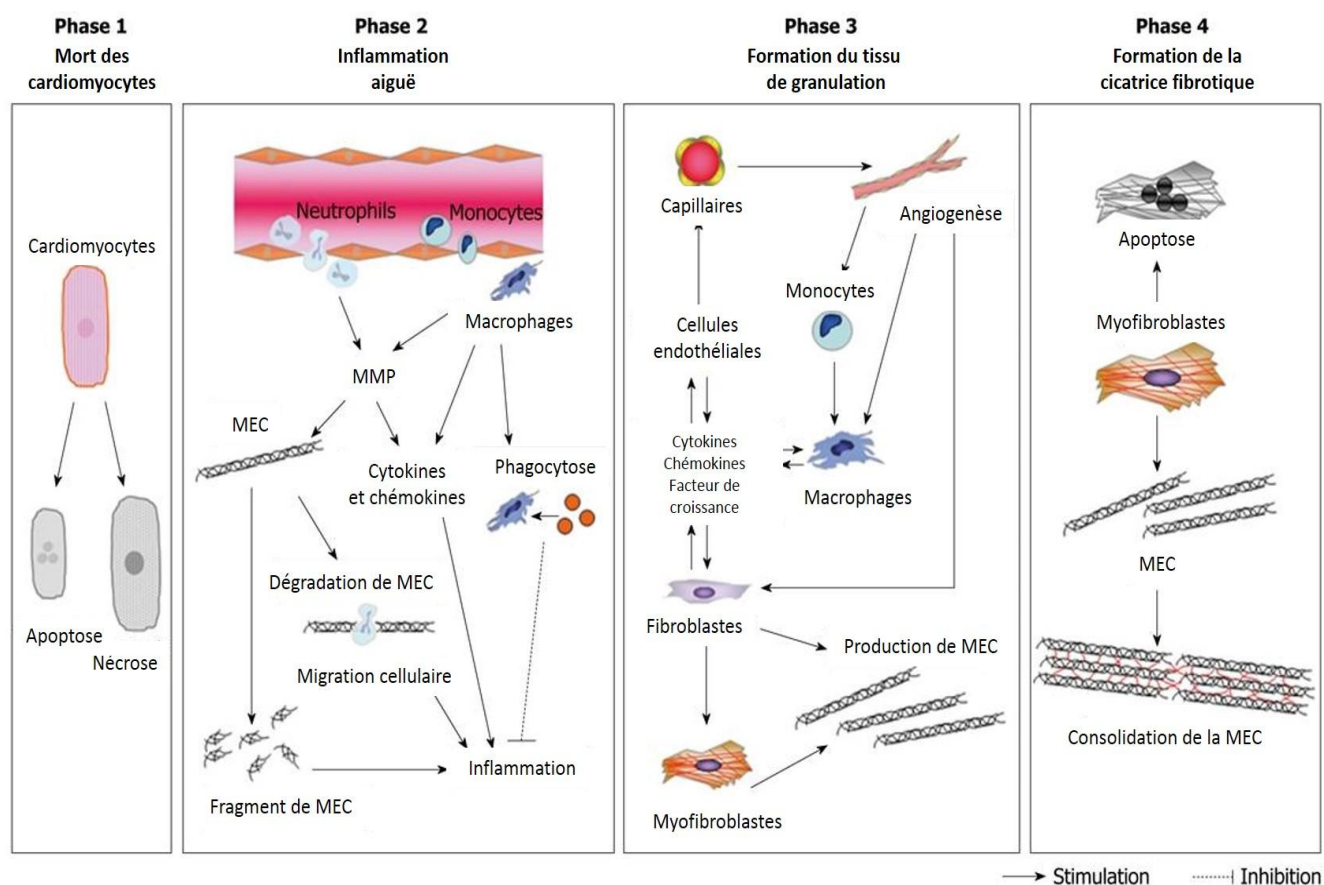


Figure 14. La pathophysiologie de la cicatrisation post-IDM (Traduite à partir de la version originale [98]).

La dernière phase de réparation est caractérisée par la maturation du collagène. Le collagène de type III est remplacé par celui du type I [106] et ce grâce aux lysyls oxydases (LOX), qui sont exprimés par les myofibroblastes résiduels. L'expression des LOX augmente pendant les 3-7 jours suivant l'IDM au niveau de la zone bordante [106]. La maturation des fibres de collagène donne au tissu cicatriciel plus de résistance mécanique et élastique [103]. Cette phase est également caractérisée par la mort des myofibroblastes. Contrairement à la peau et aux autres organes, où les myofibroblastes survivent peu après la cicatrisation, dans le

cœur, ces cellules peuvent persister des décennies après l'IDM [104]. Les myofibroblastes sont requis pour maintenir la MEC qui est constamment exposée au stress mécanique engendré par la contraction cardiaque [107].

5.2. Remodelage délétère:

Le remodelage délétère se développe dans environ 30% des patients ayant subi un IDM [108]. La taille de l'infarctus représente l'un des facteurs principaux qui déterminent la sévérité du remodelage et l'altération de la fonction systolique [109]. Le remodelage délétère modifie la morphologie du cœur qui passe d'une forme elliptique à une forme sphérique [110] et est associé avec un risque élevé d'IC (*Figure 15*).

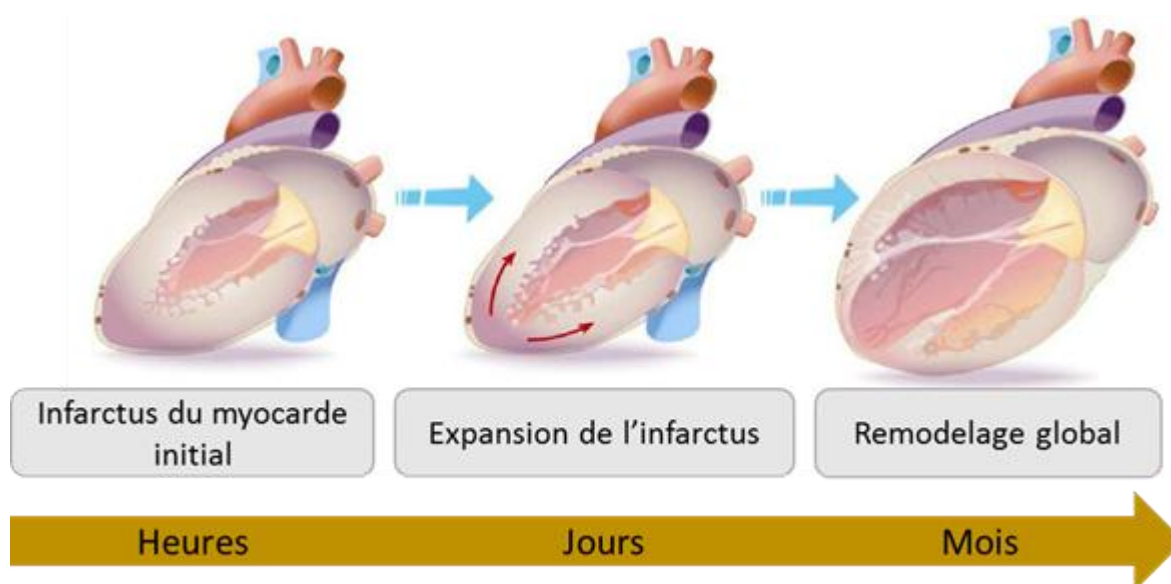


Figure 15. Modifications morphologiques du cœur lors du remodelage délétère.

<https://www.semanticscholar.org/paper/Evaluation-of-Injectable-Hyaluronic-Acid-Hydrogel-Dorsey>

Une des caractéristiques principales du remodelage délétère est le dépôt excessif de MEC, appelée fibrose. La fibrose peut également s'étendre au niveau de la zone non-infarctée et est alors appelée fibrose réactive [103]. Le remodelage délétère est également caractérisé par une hypertrophie des cardiomyocytes, en réponse à l'augmentation de la tension mécanique du myocarde et la baisse de contractilité [111]. La rigidité issue de la fibrose ainsi que l'épaississement de la paroi ventriculaire suite à l'hypertrophie des cardiomyocytes

altèrent la fonction diastolique du cœur. La fibrose est également associée avec des troubles du rythme [112] et corrèle avec l'incidence d'arythmies et d'arrêts cardiaques après un IDM [113].

Le mécanisme derrière la fibrose réactive reste à élucider. Un des facteurs qui pourrait être à l'origine, est le stress mécanique au niveau du myocarde sain qui augmente l'activation de TGF β [114], qui induit à son tour les voies associées à la fibrose et à la sécrétion de la MEC. Un autre facteur est les myofibroblastes résiduels. Ces derniers continuent à sécréter des facteurs pro-fibrotiques qui migrent vers les zones saines et stimulent la sécrétion de la MEC par les fibroblastes (fibrose interstitielle), ainsi que par l'adventice des artères coronaires (fibrose péri-vasculaire) [103]. La fibrose interstitielle est responsable d'une altération au niveau de la fonction systolique, quant à la fibrose péri-vasculaire est associée à une réduction du flux sanguin, prédisposant les cardiomyocytes à une mort ischémique [103].

Le SNS et le système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (RAAS pour *Renin-Angiotensin-Aldosterone System*) constituent deux régulateurs critiques du remodelage délétère après un IDM (**Figure 16**). Ils représentent les deux principales cibles de la thérapie préventive contre le remodelage délétère. Dans le cœur, le SNS agit via les neurotransmetteurs adrénaline et noradrénaline en interagissant notamment avec le récepteur adrénergique β 1. L'activation du SNS après un IDM est nécessaire afin d'augmenter le rythme cardiaque et maintenir un débit cardiaque suffisant [115]. Si cette activation persiste, elle engendre des effets délétères sur la structure et la FV. La surexpression du récepteur β 1 dans les cardiomyocytes de souris a montré une augmentation du débit cardiaque, à court terme, et une hypertrophie ventriculaire et un dépôt excessif de MEC à long terme [115]. De plus, la suractivité du SNS favorise l'apoptose des cardiomyocytes [116]. Le SNS est également responsable de l'activation du système RAAS.

Une augmentation significative dans l'expression de l'angiotensinogène, le précurseur de l'angiotensine, a été observée dans les segments myocardiques non-infarctés 5 jours après un IDM, et a montré une corrélation significative avec la taille de l'infarctus [117]. Le RAAS exerce son effet délétère notamment à travers l'angiotensine II. Une perfusion prolongée (14 jours) de l'angiotensine II chez le rat a engendré un dépôt fibrotique excessif aussi bien péri-

vasculaire qu'interstitiel [118]. De plus, l'angiotensine exerce un effet cytotoxique direct sur les cardiomyocytes, en favorisant leur hypertrophie et accélérant leur apoptose [119]. L'effet délétère de l'angiotensine passe à travers son interaction avec les récepteurs de type 1 (AT-1R) [120], alors que l'interaction de l'angiotensine II avec le récepteur de type 2 est plus tôt contre-régulatrice et aboutit à des effets cardioprotecteurs.

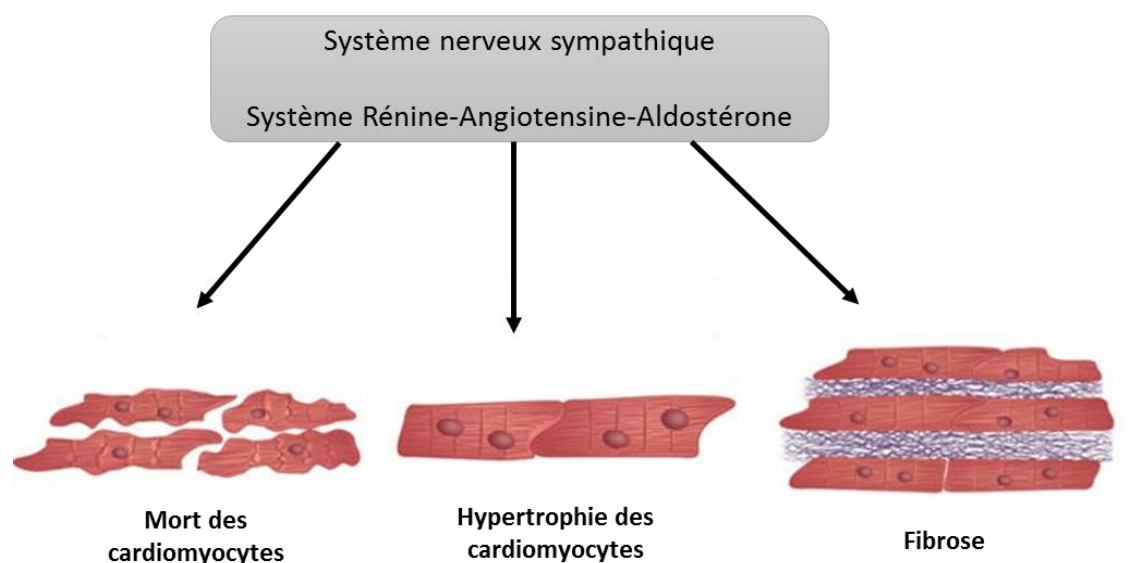


Figure 16. Rôle du système nerveux sympathique et du système Rénine-Angiotensine-Aldostérone dans le remodelage délétère post-IDM. Image éditée et traduite à partir l'image originale [121].

Le RVG est caractérisé par une augmentation progressive dans les VTD et VTS [122]. Les méthodes d'imageries les plus utilisées sont l'échographie et l'IRM (imagerie par résonance magnétique) cardiaque. Afin d'éviter des variances interindividuelles en matière de taille ventriculaire, notamment entre les femmes et les hommes, les volumes cardiaques sont exprimés sous forme d'indices corporels en divisant le volume par la surface corporelle [122, 123]. Une diminution dans la FE du VG est également observée après un IDM.

5.3. Différences hommes-femmes au niveau du remodelage post-IDM:

L'incidence du remodelage délétère après un IDM est comparable entre les deux sexes [124]. Néanmoins, les cœurs des femmes et des hommes ne répondent pas de la même façon à ce stress (**Figure 17**) [125, 126].

Dans les modèles animaux :

Les études chez les rongeurs ont révélé d'importantes différences entre les deux sexes en réponse à l'ischémie myocardique. Les femelles avaient des infarctus de taille plus petite, moins de nécrose au niveau de la zone infarctée et une meilleure récupération de la FV [55, 127-129]. Après une occlusion coronaire chez des rats hypertensifs, les femelles avaient développé une hypertrophie concentrique sans dilatation et sans amincissement de la zone infarctée alors que les mâles présentaient une hypertrophie excentrique avec dilatation de la cavité ventriculaire et l'amincissement de la zone infarctée (**Figure 17**) [130].

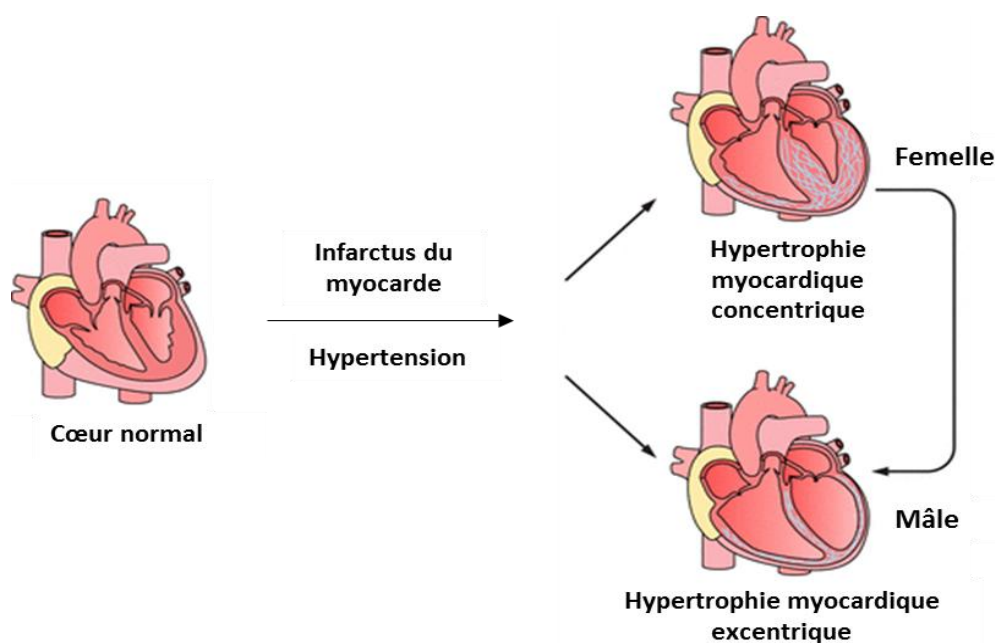


Figure 17. Différence hommes-femmes au niveau du RVG post-IDM.

Editée et traduite à partir de l'image originale [55].

D'un autre côté, les cœurs féminins semblent réagir mieux à la revascularisation après un épisode ischémique. Dans un modèle d'ischémie/reperfusion, les femelles avaient une meilleure récupération de la contractilité et de la compliance cardiaque et avaient moins

d'apoptose [131, 132]. En outre, la survie lors des premiers jours post-IDM était plus élevée chez les femmes [55]. Cette différence semble être attribuée à la taille de l'infarctus, qui est plus petit chez les femmes. De plus, les mâles avaient un processus de cicatrisation plus tardif aboutissant à une rupture cardiaque précoce et à un remodelage délétère plus prononcé à long terme [133]. En outre, la pression au niveau de la paroi ventriculaire était plus importante chez les mâles, ce qui est justifié en partie par la réponse inflammatoire exagérée et la dégradation accrue de la MEC dans ce groupe [134, 135]. La testostérone joue un rôle aggravant du remodelage excentrique en phase aigüe aboutissant à la rupture ventriculaire et l'altération de la FV alors que les estrogènes ne semblent pas exercer un effet protecteur [133].

Chez l'homme :

Dans une étude de population générale, l'obésité et l'hypertension étaient plus associées avec l'hypertrophie concentrique chez les femmes, alors que chez les hommes, l'hypertrophie excentrique dominait [136]. Après un IDM, une étude post-mortem a montré que l'apoptose au niveau de la zone bordante de l'infarctus était 10 fois plus élevée chez les hommes que les femmes [137]. Ces résultats suggèrent que les hommes modulent différemment les voies apoptotiques au niveau de la zone bordante et que les femmes sont partiellement protégées contre l'ischémie myocardique. Néanmoins, aucune corrélation entre le sexe, le remodelage et l'apoptose n'a été analysée dans cette étude [137].

L'association du sexe avec la reperfusion et le RVG a été évaluée dans une cohorte de 283 patients avec STEMI [126]. L'angioplastie semblait être plus efficace chez les femmes par rapport aux hommes. Les femmes avaient une meilleure récupération myocardique après la reperfusion, des infarctus plus petits et moins de détérioration microvasculaire par rapport aux hommes aussi bien à la phase aigüe qu'à 4 mois [126]. De plus, le remodelage cardiaque a été comparé entre 28 femmes et 72 hommes en stade final d'IC [9]. Les différences entre les deux sexes semblent dépendre de l'étiologie. Les caractéristiques morphologiques et cellulaires étaient comparables entre les hommes et les femmes avec cardiomyopathie idiopathique. Chez les patients avec cardiomyopathie ischémique, les hommes avaient des masses cardiaques et ventriculaires plus élevées alors que les femmes avaient une paroi

ventriculaire plus épaisse. La différence au niveau de la masse ventriculaire était justifiée par une hypertrophie des cardiomyocytes qui était 2 fois plus importante chez les hommes. Aucune différence n'a été observée au niveau de la fonction cardiaque [9].

6. Insuffisance cardiaque :

La société européenne de cardiologie définit l'IC comme étant un syndrome clinique caractérisé par des symptômes typiques (tels que l'essoufflement, la fatigue et le gonflement des chevilles) qui pourraient être accompagnés par des signes (une pression veineuse jugulaire élevée, un craquement dans les poumons et un œdème périphérique) issue d'une défaillance structurelle et/ou fonctionnelle du cœur [138]. Cette défaillance aboutit à une réduction du débit cardiaque et/ou une augmentation de la pression intracardiaque et ce à l'effort comme au repos. Les étiologies de l'IC sont diverses et incluent, entre autres, l'hypertension, les coronaropathies et les valvulopathies [139]. L'hypertension est le facteur de risque le plus associé avec l'IC chez les femmes [6].

Dans les pays développés, l'incidence de l'IC représente 1-2% de la population adulte et excède les 10% chez les individus âgés de plus de 70 ans [140-143]. L'étude *Rotterdam* a montré que l'incidence de l'IC augmente avec l'âge et passe de 0,9% chez la catégorie d'âge 55-64 ans, à 17,4% chez les individus âgés de plus de 85 ans [142].

La terminologie utilisée pour la classification de l'IC est basée sur la mesure de la FE du VG [138]. Les patients avec IC peuvent être classés comme ayant une FE préservée (FE $\geq 50\%$), intermédiaire (FE = 40-49%) ou réduite (FE $< 40\%$) [138]. Des différences au niveau de l'étiologie, des comorbidités, et même de la réponse aux traitements existent entre ces groupes [138]. Les patients présentant une FE réduite sans symptômes sont diagnostiqués comme ayant une dysfonction systolique asymptomatique.

Les patients avec une FE réduite présentent principalement une dysfonction systolique due à une dilatation ventriculaire, alors que les patients avec une FE préservée, sont plus caractérisés par une dysfonction diastolique, due notamment à un épaissement de la paroi ventriculaire (**Figure 18**). Comparés aux patients avec une FE réduite, les patients ayant une FE préservée sont plus âgés, plus souvent des femmes, ayant un historique d'hypertension et de fibrillation atriale et moins souvent un historique d'IDM [144, 145]. Dans l'étude *Framingham*, les femmes représentaient 40% des patients avec une FE réduite et 65% de ceux ayant une FE préservée [139].

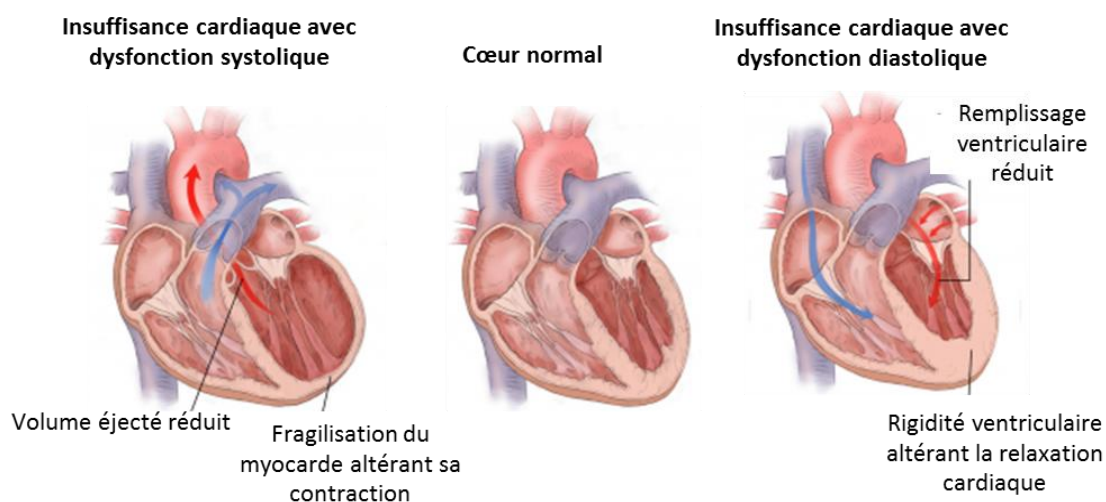


Figure 18. *Dysfonction ventriculaire gauche lors d'une IC.*

(Traduite à partir de la version originale).

<https://www.emsworld.com/article/12053437/diagnosis-and-treatment-of-the-patient-with-heart-failure>.

L'IC avec une FE réduite peut être qualifiée, selon son étiologie, d'ischémique ou non-ischémique. L'IC ischémique est principalement induite par l'IDM, la coronaropathie et les dysfonctions microvasculaires [6]. L'étude *VALIANT* (VALsartan In Acute myocardial iNfarcTion trial) comprenant plus de 10000 patients avec IDM ayant développé une IC ou une dysfonction systolique asymptomatique, a comparé le risque d'IC entre les femmes et les hommes [5]. Les femmes avaient plus de risque de développer une IC par rapport aux hommes et le risque d'hospitalisation à cause d'IC était supérieur chez les femmes (21% chez les femmes versus 13% chez les hommes).

Le diagnostic de l'IC ainsi que les stratégies thérapeutiques sont les mêmes chez les hommes et les femmes. Le diagnostic est basé sur la caractérisation clinique ainsi que l'échocardiographie. Les thérapies médicamenteuses principales de l'IC sont les bêtabloquants et les inhibiteurs de l'enzyme de conversion. Ces thérapies réduisent la morbidité et la mortalité uniquement chez les patients ayant une FE réduite [138]. L'efficacité de ses traitements semble être comparable entre les deux sexes [6] sauf que les femmes sont souvent sous-représentées dans ces essais cliniques. Néanmoins, des différences existent entre les deux sexes au niveau de l'effet de la digoxine et des thérapies de resynchronisation

cardiaques. La digoxine est plus toxique chez les femmes chez lesquelles elle cause plus de mortalité [146]. Au contraire, l'utilisation des thérapies de resynchronisation cardiaque semblent plus réduire la mortalité chez les femmes que les hommes [6].

7. Mécanismes responsables des différences hommes-femmes dans les MCV :

Les mécanismes épigénétiques associés aux chromosomes sexuels ainsi que les hormones sexuelles jouent un rôle primordial dans les différences CV observées entre les deux sexes.

7.1. Mécanismes génétiques :

Le chromosome Y porte des gènes qui sont non seulement impliqués dans la détermination du sexe mais également dans d'autres fonctions biologiques y comprises CV. Des loci présents au niveau du chromosome Y sont associés avec le risque d'hypertension et d'hypercholestérolémie, et même de coronaropathie [147-149].

Chez les femelles, les gènes échappant à l'inactivation du chromosome X semblent également être à l'origine de certaines des différences CV observées entre les deux sexes. Un des deux chromosomes X passe à l'état inactif chez la femelle entraînant l'extinction transcriptionnelle de plusieurs milliers de gènes afin de compenser la dose entre les deux sexes. Certains de ces gènes échappent à cette inactivation, ils sont de l'ordre de 15% chez l'humain et de 3% chez la souris [150]. La contribution des gènes du chromosome X au MCV reste à élucider étant donné que les études GWAS (pour Genome Wide Association Studies) ont rarement inclus ce chromosome dans leurs analyses [55].

De plus, des variants génétiques localisés au niveau des autosomes peuvent agir différemment chez les femmes et les hommes. Dans une étude GWAS incluant 224459 participants, 49 loci associés avec la distribution corporelle des graisses ont été identifiées, parmi lesquels, 19 avaient un effet plus puissant chez les femmes [151]. Ces loci étaient associés avec des processus affectant la distribution de graisse tels que l'adipogenèse, l'angiogenèse et la résistance à l'insuline. De plus, des polymorphismes au niveau du gène chymase 1, impliqué dans l'hypertrophie et la fibrose, étaient associés avec la masse ventriculaire chez les hommes mais pas les femmes souffrant de sténose aortique [152]. Des polymorphismes au niveau du gène codant pour le récepteur de la bradykinine type 1, impliqué dans le système rénine-angiotensine, semblent avoir un effet différent au niveau de la stimulation de ce récepteur chez les hommes et les femmes [153].

Des gènes localisés au niveau des chromosomes X ou les autosomes peuvent être différenciellement exprimés entre les deux sexes. Parmi ces gènes, ceux codant pour des cytochromes, des anhydrases carboniques et des peptides natiuretiques [55]. Chez les insuffisants cardiaques, les femmes ont généralement une expression plus élevée des gènes associés avec le métabolisme d'énergie que les hommes, suggérant que les femmes seraient capables de maintenir leur fonction métabolique dans des conditions pathologiques [55]. Chez les patients souffrant de sténose aortique, des différences au niveau de l'expression des gènes associés à l'inflammation et à la fibrose, ont été observées et ce en faveur de la répression de ces processus chez les femmes [154].

7.2. Mécanismes épigénétiques :

Les modifications épigénétiques regroupent la méthylation d'ADN et des histones ainsi que l'acétylation des histones. Les facteurs environnementaux peuvent induire des modifications épigénétiques différemment chez les hommes et les femmes, induisant ainsi des différences au niveau du phénotype CV. De plus, des modifications acquises lors de la vie *in utero* peuvent affecter le phénotype à l'âge adulte. L'étude de la méthylation de 15 loci chez des femmes et hommes exposés avant leur naissance à la famine de 1944 aux Pays-Bas a révélé des différences au niveau de certains loci entre les deux sexes [155]. La prévalence d'hypertension était supérieure chez ces hommes et femmes par rapport aux contrôles qui n'étaient pas exposés suggérant que la malnutrition lors de la gestation prédispose à l'hypertension [156].

D'autre part, les hormones sexuelles sont capables d'induire des modifications au niveau des histones. Les estrogènes et les androgènes se fixent sur des éléments de réponse aux hormones (HRE pour hormone response elements) au niveau de l'ADN et attirent des cofacteurs capables de modifier l'acétylation des histones [55].

Les ARNs non codants sont également des régulateurs épigénétiques. Dans le modèle *in vivo* de surcharge de pression, la fibrose cardiaque était plus accrue chez les mâles [157]. La comparaison du profil transcriptomique a révélé une induction dans l'expression des gènes

de la fibrose et une répression dans les gènes mitochondriaux comparés aux femelles. Cette différence serait attribuée à l'estradiol (E2) qui atténue le développement de la fibrose chez les femelles à travers la modulation des microARNs (miRs) 21, 24, -27a/b, et 106a/b [157].

7.3. Hormones sexuelles :

Les hormones sexuelles sont synthétisées principalement au niveau des gonades (testicules et ovaires) mais peuvent également être synthétisées par d'autres types cellulaires tels que les cardiomyocytes. De plus, la testostérone peut être métabolisée en estrogène favorisant la contribution de cette dernière dans la pathophysiologie CV chez les mâles. La majorité des études se sont concentrées sur les effets CV de l'estrogène et de ses dérivés.

L'E2 est l'estrogène la plus abondante dans la circulation [55]. Elle est principalement produite par les ovaires et peut être localement produite à travers la conversion de la testostérone. Chez les deux sexes, cette conversion peut avoir lieu dans plusieurs tissus extra-gonadaux, y compris le tissu adipeux, le cœur et les vaisseaux [55]. La production de l'E2 augmente remarquablement chez les hommes obèses [158]. De plus, les hommes âgés semblent avoir des concentrations plus élevées d'E2 comparés aux femmes du même âge [159].

L'association des polymorphismes au niveau des récepteurs à l'estrogène ER α et β (ER pour estrogen receptor) avec les MCV a préalablement été rapportée. En particulier, un polymorphisme au niveau du récepteur ER α est associé avec un risque élevé d'IDM [160], alors que le polymorphisme d'ER β est associé avec une augmentation au niveau de la masse ventriculaire ainsi qu'un épaissement de la paroi ventriculaire [161]. Ces récepteurs ont été identifiés au niveau de l'endothélium vasculaire, des CML vasculaires, des cardiomyocytes et des fibroblastes cardiaques, chez les deux sexes [55]. L'expression cardiaque du récepteur ER α semble être comparable entre les deux sexes alors que celle de l'ER β est plus élevée chez les hommes [162]. Les deux récepteurs sont surexprimés dans le myocarde des hommes et des femmes souffrant de sténose aortique ce qui suggère leur rôle dans la pathophysiologie de la maladie [162]. L'expression génique et protéique du récepteur ER α est augmentée dans les cœurs de patients en stade final d'IC [163].

Les estrogènes jouent un rôle dans les différents processus associés avec l'IDM allant de la mort cellulaire jusqu'à la réponse inflammatoire et la fibrose (**Figure 19**).

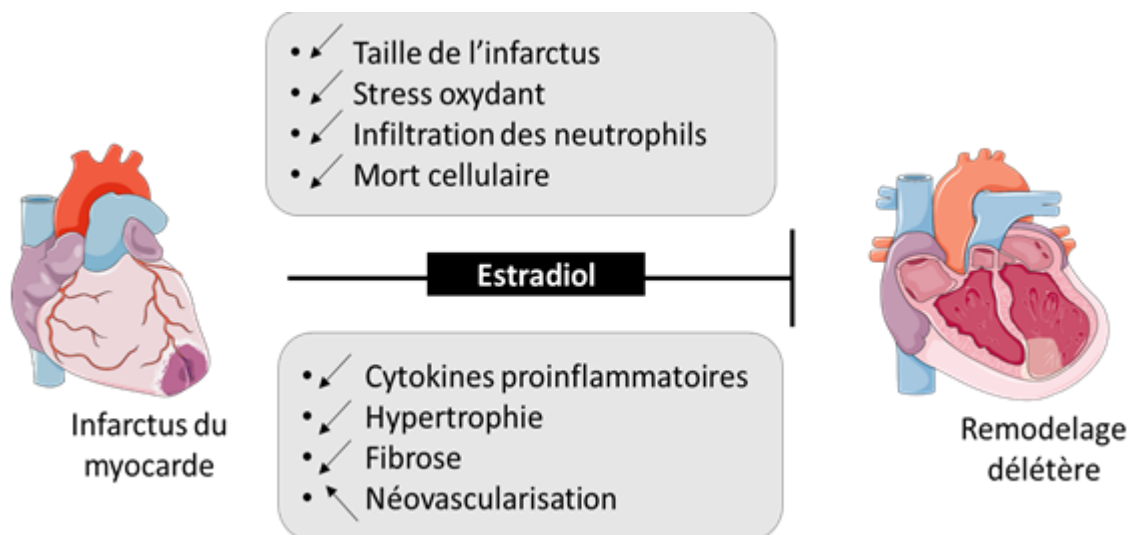


Figure 19. Effets protecteurs des estrogènes contre le remodelage délétère après un IDM.

Mort cellulaire :

La perte des cardiomyocytes augmente avec l'âge chez les hommes mais pas chez les femmes [164]. D'un autre côté, la mort cellulaire est plus importante dans le cœur insuffisant des hommes par rapport aux femmes [165]. Les cœurs des femmes sont également mieux protégés de l'apoptose induite par l'ischémie. La zone périphérique de l'infarctus contient 10 fois plus d'apoptose chez les hommes par rapport aux femmes [137]. Des observations similaires ont été rapportées chez des modèles *in vivo* d'ischémie/reperfusion [55]. Cette mort cellulaire accrue chez les mâles suite à l'ischémie/reperfusion semble être due à la réduction de la protéine pro-apoptotique Bcl2 chez les mâles et une augmentation de la protéine anti-apoptotique Bax chez les femelles [166]. L'E2 joue un rôle primordial dans la protection des cardiomyocytes contre l'apoptose à travers la modulation de PI3K/PKB, TNF α , p38 (α et β) et p53 [55]. De plus, l'E2 favorise la néovascularisation du tissu ischémique en augmentant la mobilisation et l'incorporation des cellules progénitrices endothéliales [167]. D'un autre côté,

la testostérone semble aggraver la lésion cardiaque en réduisant la protéine anti-apoptotique Bcl-xL [168] et en induisant les protéines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β et IL-6 [169].

Inflammation:

Dans les modèles *in vivo* d'ischémie myocardique, les cœurs des femelles sont plus protégés, et ce en produisant moins de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-1 et IL-6 [135, 170]. L'estrogène joue un rôle primordial dans cette réponse inflammatoire en régulant l'expression de ces cytokines à travers la régulation des monocytes et des macrophages [171]. L'E2 protège contre l'ischémie en réduisant l'infiltration des neutrophiles, la production du stress oxydant et la nécrose [172]. En réponse à un stimulus inflammatoire, le facteur de transcription NF- κ B, qui est le régulateur clé de la réponse inflammatoire, est capable de réduire la transcription du récepteur α de l'estrogène au niveau des cardiomyocytes [173]. Stimulé par l'E2 ; l'ER α à son tour est capable d'inhiber NF- κ B.

Hypertrophie et fibrose:

L'administration de l'E2 , dans des modèles d'ischémie myocardique, a permis de réduire la taille de l'infarctus et d'améliorer la fonction cardiaque [55]. L'E2 joue un rôle anti-hypertrophique à travers la régulation du facteur natriurétique atrial (ANF) et la chaîne lourde de myosine (MHC β) [174]. Ces effets protecteurs semblent être exercés à travers le récepteur ER α . Dans le modèle de surcharge de pression, le traitement par l'agoniste spécifique de ce récepteur a ralenti la progression de l'hypertrophie ventriculaire aboutissant à une meilleure fonction systolique et moins de fibrose [175]. En outre, l'E2 régule le profil transcriptomique cardiaque différemment chez les hommes et les femmes [176, 177]. L'E2 induit par exemple l'expression du récepteur d'une autre hormone qui est la progestérone spécifiquement chez les femmes, les protégeant ainsi contre le remodelage délétère [176]. D'un autre côté, l'E2 induit l'expression du gène codant pour MYLIP (myosin regulatory light chain interacting protein) et ce spécifiquement chez les mâles entraînant une altération de la fonction contractile [177].

La comparaison du profil transcriptomique du VG des patients atteints de sténose aortique a révélé une induction des voies de signalisation associées à la fibrose chez les hommes [154]. Chez les femmes, une répression au niveau des voies de signalisation associées à l'inflammation et la MEC a été observée [154]. En outre, l'estrogène atténue le développement de la fibrose au niveau du cœur, en inhibant directement la synthèse du collagène, et en régulant les taux du collagène du type I et III [55]. De plus l'E2 inhibe l'expression des MMPs par les fibroblastes cardiaques et ce à travers l'activation du récepteur ER α et la voie de signalisation de MAPK-ERK1/2 [178].

8. Biomarqueurs du remodelage ventriculaire post-IDM :

Les biomarqueurs les plus constamment associés avec le RVG sont impliqués dans le stress cardiaque, la nécrose des cardiomyocytes, ainsi que l'inflammation et le turnover de la MEC. Malgré les nombreux biomarqueurs ayant montré leur association avec le RVG post-IDM, le biomarqueur idéal n'a pas encore été découvert. Afin d'atteindre cet objectif, des études plus larges avec des critères d'évaluation standardisés, et des validations indépendantes sont requises.

8.1. Marqueurs de la tension mécanique :

Les peptides natriurétiques, BNP (Brain Natriuretic Peptide) et sa fraction terminale NT-proBNP sont les deux biomarqueurs les plus reconnus pour le diagnostic de l'IC et de la dysfonction ventriculaire gauche. Ils sont principalement synthétisés par les cardiomyocytes ventriculaires lorsque la tension exercée sur ces derniers augmente. Le BNP (le peptide actif) et le NT-proBNP (le peptide inactif) sont libérés en quantités équimolaires dans la circulation sanguine.

Rôle du BNP :

La délétion du BNP a généré des souris normotensives présentant une fibrose ventriculaire sans aucun signe d'hypertrophie [179]. Il est intéressant de noter que cette fibrose cardiaque était moins importante chez les femelles comparées aux mâles [179]. Le BNP représente alors un facteur anti-fibrotique qui régule localement le RVG. Le BNP semble prévenir le développement de la fibrose à travers l'inhibition du TGF β et de l'enzyme de conversion de l'angiotensine [179]. En revanche, une hypotension a été observée chez les souris sur-exprimant BNP ce qui suggère que le BNP régule la pression artérielle en favorisant la vasodilatation des vaisseaux sanguins lorsqu'il circule en grandes quantités lors des maladies cardiaques [180].

Un variant génétique au niveau du locus *NPPA-NPPB* codant pour les peptides natriurétiques ANP (pour Atrial Natriuretic Peptide) et BNP, entraînant une augmentation

dans l'expression de ces peptides, était associé avec moins de susceptibilité à l'hypertrophie cardiaque renforçant le rôle cardioprotecteur de ces derniers [181].

Prédiction du remodelage :

Plusieurs études ont analysé la capacité du BNP et du NT-proBNP à prédire la FV et le RVG après un IDM [2]. La majorité de ces études incluait moins de 100 patients. De plus, ces peptides ont été mesurés à des temps différents et la FV était évaluée par différentes techniques. Aucune de ces études n'a analysé la capacité de ces peptides à prédire le RVG séparément chez les femmes et les hommes.

Malgré que ce peptide semble prédire la FV indépendamment du temps, le moment du dosage avec la meilleure valeur prédictive reste à déterminer [2]. Les taux de NT-proBNP mesurés à l'admission [182], au moment de la revascularisation [183] et à la sortie de l'hôpital étaient associés avec le risque de dysfonction ou du RVG [184]. Dans une étude comparant plusieurs temps de mesure (quelques jours à 6 semaines), le temps optimal était entre le 3^{ème} et le 4^{ème} jour post-IDM [185]. Contrairement, dans la cohorte *REVE-2* (Remodelage Ventriculaire-2) la meilleure valeur prédictive du BNP a été observée lors du suivi (1 mois, 3 mois et 1 an) et aucune association n'a été observée pour les mesures précoces (entre le 3^{ème} et le 7^{ème} jour post-IDM). La comparaison de la valeur prédictive des marqueurs cardiaques NT-proBNP, CK et cTnT a montré que le NT-proBNP était le meilleur prédicteur du RVG global et qu'il était le seul à pouvoir prédire le remodelage du myocarde sain [182].

Différence entre les hommes et les femmes:

Le sexe et l'âge représentent deux principaux déterminants de la concentration du BNP et du Nt-proBNP. Plusieurs grandes études de populations ont montré que les concentrations de ces peptides augmentent avec l'âge et que les femmes ont des taux supérieurs par rapport aux hommes [186-188]. De plus, cette différence entre les deux sexes semble persister avec l'âge [189].

Les taux de BNP ont été comparés chez des femmes saines post-ménopausées avant et après la thérapie de remplacement hormonal [190]. Après 3 mois de thérapie, les taux du BNP et d'ANP ont significativement augmenté chez ces femmes suggérant l'effet stimulateur des estrogènes sur les peptides natriurétiques et leur effet cardioprotecteur chez les femmes. Cette différence pourrait également être attribuée à l'effet inhibiteur des androgènes sur les peptides natriurétiques [191]. Les taux des peptides natriurétiques ont significativement augmenté chez les rats castrés et cette augmentation a été rectifiée après administration de la testostérone [191]. L'influence du sexe et des hormones sur les concentrations plasmatiques des peptides natriurétiques a plus largement été étudiée chez 4056 hommes et femmes [3]. Ces dernières ont été divisées en 4 groupes selon leur statut hormonal : femmes pré-ménopausées sans ou avec contraception et des femmes post-ménopausées recevant ou pas une thérapie de remplacement hormonal. Les concentrations les plus faibles du NT-proBNP ont été mesurées chez les hommes alors que les plus élevées ont été observées chez les femmes pré-ménopausées recevant la contraception hormonale.

Une autre explication des taux de peptides natriurétiques supérieurs chez les femmes serait la différence dans les taux d'hémoglobine entre les deux sexes. Une corrélation négative a été observée entre les taux du BNP, d'ANP et la concentration d'hémoglobine [189]. Les taux inférieurs d'hémoglobine chez les femmes seraient responsables d'une ischémie myocardique et que cette dernière augmenterait l'expression des peptides natriurétiques. L'ischémie myocardique a été montrée capable d'induire l'expression du BNP indépendamment de la tension mécanique [192].

Des mutations au niveau du gène *NPPB* ont été trouvées associées avec des niveaux élevés de BNP et NT-proBNP, chez des patients présentant des coronaropathies [193]. De plus, ces patients avaient une FV meilleure et étaient protégés contre le remodelage délétère. Particulièrement le génotype rs198389 AA était associé avec un risque élevé de coronaropathies obstructives et une athérosclérose sévère, chez les femmes, mais pas chez les hommes, ce qui pourrait suggérer que le BNP serait plus impliqué dans la pathophysiologie des coronaropathies chez les femmes [194].

8.2. Marqueurs de la nécrose myocardique :

De nombreuses études ont montré que les biomarqueurs de la nécrose myocardique notamment CK et cTns étaient associées avec la FV post-IDM, ce qui suggère que le degré d'endommagement myocardique lors de l'IDM conditionne la FV plus tard. Les taux des deux marqueurs sont inférieurs chez les femmes par rapport aux hommes [11]. Néanmoins, l'association de ces marqueurs avec le RVG n'a pas encore été étudiée séparément chez les femmes et les hommes.

Les concentrations des deux biomarqueurs mesurées à différents temps post-IDM corrèlent avec la taille de l'infarctus [195]. Les taux des cTns et de la CK mesurés quelques jours post-IDM, ainsi que leurs valeurs maximales étaient prédicteurs de la dysfonction ventriculaire [182, 195-197]. Dans l'étude *PROTECTION AMI* incluant 1066 patients traités par angioplastie coronaire primaire, la cTnI a été mesurée à plusieurs temps (de l'admission à 80 heures). L'association de la cTnI avec la FV a été observée à tous les temps. La plus forte association a été observée pour les valeurs obtenues entre 30 et 40 heures post-IDM [198]. De même que le BNP, l'association de la cTnI avec le RVG était absente pour les valeurs de base dans la cohorte *REVE-2* [199]. Chez les patients pour lesquels la cTnI était encore détectable pendant le suivi (1 mois, 3 mois et 1 an) avaient un risque élevé du RVG. Dans cette étude, la cTnI était encore détectable chez 19% des patients à 1 mois et a diminué à 13% et 7% à 3 mois et 1 an, respectivement [199].

8.3. Marqueurs de l'inflammation :

La réponse inflammatoire induite par la nécrose des cardiomyocytes joue un rôle primordial dans la pathogenèse du RVG. Une réponse inflammatoire excessive aboutit à une dilatation exagérée au niveau du VG. De nombreuses études ont mis en évidence l'association entre les concentrations des facteurs inflammatoires à la phase aigüe et le risque de développer un RVG délétère.

Des différences au niveau de la réponse inflammatoire existent en général entre les femmes et les hommes aussi bien au niveau de la réponse innée ou acquise [200]. Suite à un IDM, les mâles montrent une réponse inflammatoire plus excessive [133, 134]. Dans un

modèle *in vivo* d'ischémie/reperfusion, la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , et IL-6) était supérieure chez les mâles [170]. Ces différences entre les deux sexes suggèrent d'étudier, séparément chez les femmes et les hommes, la valeur prédictive des marqueurs inflammatoires.

Cellules inflammatoires :

L'association des différents types cellulaires avec le RVG a été investiguée. Le taux de PBMC (peripheral blood mononuclear cells) déterminés dans les 24 heures suivant un IDM étaient associés avec le RVG délétère 6 mois plus tard [201]. Néanmoins, la capacité des PBMC à prédire le RVG est faible et a complètement été abolie en présence du BNP [202]. L'association des différents sous-types cellulaires a également été observée. Les taux élevés de neutrophiles, mesurés à l'admission, étaient associés avec le risque de développer un remodelage délétère dans la phase chronique [203]. D'un autre côté, l'augmentation des taux de monocytes (monocytose) observée lors des premiers jours post-IDM corrélait négativement avec la FE et était associée avec le risque de rupture ventriculaire [204]. Plus particulièrement, les valeurs maximales de la sous-population des monocytes CD14(+) CD16(-) étaient prédictives d'une dysfonction ventriculaire [205]. De plus, un taux faible de lymphocytes à l'admission était associé avec une dysfonction ventriculaire [206]. Le ratio neutrophiles : lymphocytes est aussi capable de prédire le RVG [207].

CRP :

La CRP (pour C reactive protein) est un marqueur de l'inflammation sécrété par les hépatocytes. L'association de la CRP avec le RVG post-IDM est controversée. Les taux de la CRP mesurés à l'admission ainsi que les valeurs maximales corrélaient positivement avec le RVG délétère [208]. Des données de l'étude *REVE-2* ont montré que la CRP aussi bien mesurée à la phase aiguë que pendant le suivi n'était pas un prédicteur du RVG [199]. Les taux de CRP sont affectés par le sexe avec les femmes ayant des niveaux plus élevés [209]. Cette différence impose l'ajustement par le sexe dans les études analysant la capacité prédictive de ce marqueur.

Cytokines et chimiokines :

Les taux de ces médiateurs inflammatoires sont affectés après un IDM et sont également capables de prédire son évolution. L'IL-1 joue un rôle clé dans l'amplification de la réponse inflammatoire post-IDM. Une augmentation dans les taux plasmatiques de l'isoforme IL-1 β est observée dans les 2 heures suivant l'IDM [210]. En outre, les concentrations de l'IL-1 β mesurée 2 mois post-IDM avaient une forte valeur prédictive de la FV évaluée à 1 an [211]. IL-10 quant à lui, est une cytokine antiinflammatoire. Les concentrations sériques de cette cytokine mesurées 7 jours post-IDM étaient positivement corrélées avec la FE [212]. Une autre cytokine a également montré son association avec le RVG, il s'agit de l'IL-21. Cette cytokine mesurée quelques jours post-IDM (moyenne 2 jours) étaient un prédicteur indépendant du risque du remodelage délétère à 6 mois [213].

Le récepteur de l'IL-33 connu sous le nom de ST2 (suppression of tumorigenicity 2) est sécrété par les cardiomyocytes et les fibroblastes suite à un stress mécanique [214]. Des taux élevés de ST2 sont associés avec une fibrose myocardique excessive et un remodelage délétère [214]. La valeur pronostique de ST2 chez les insuffisants cardiaques a été confirmée dans plusieurs études afin de prédire le risque de mortalité et d'hospitalisation [214]. Dans une cohorte de patients avec IDM, les taux sériques de ST2 mesurés à l'admission corrélaient inversement avec la FV à 6 mois [215]. De plus, ce biomarqueur est capable de prédire le risque de mortalité et d'IC après un IDM [215]. Des taux inférieurs de ST2 chez les femmes ont été observés dans une étude de population générale incluant 3450 participants [216]. Cette différence semble être attribuée aux hormones sexuelles, étant donné que les femmes sous thérapie hormonale avaient les concentrations les plus faibles de ST2 [216].

Les taux de chimiokines augmentent rapidement dans le cœur après un IDM afin de recruter les cellules inflammatoires au niveau de la zone infarctée [208]. Une augmentation est également observée dans la circulation dans les 3 heures suivant un IDM ce qui confère aux chimiokines un potentiel de biomarqueurs. Le MIF (pour macrophage migration inhibitory factor) est une chimiokine/cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les cardiomyocytes nécrosés et les PBMC [217]. Cette chimiokine est dotée de propriétés cardio-protectrices mais en cas d'augmentation prolongée, elle est associée avec un remodelage délétère. Les

taux élevés de MIF, mesurés à l'admission, sont associés avec une taille d'infarctus plus importante et une dysfonction ventriculaire à 3 jours et à 3 mois post-IDM [218]. En outre, d'autres chimiokines telles que MIP-1 α (Macrophage inflammatory protein-1 alpha) et RANTES (Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted) mesurées à une phase très aigüe post-IDM (3 heures) corrélaient positivement avec la FV [219, 220].

8.4. Marqueurs de la fibrose :

La dérégulation de la MEC après un IDM contribue fortement au développement du remodelage délétère. Cette dérégulation engendre soit un dépôt excessif de collagène aboutissant à une fibrose, soit une dégradation accrue/dépôt insuffisant de collagène aboutissant à une dilatation du VG [221]. Le turnover de la MEC après un IDM peut être analysé à travers la mesure des marqueurs reflétant sa synthèse et sa dégradation. Les régulateurs de la dégradation de la MEC les MMPs et leurs inhibiteurs TIMPs peuvent également être mesurés. Les collagènes de type I et III sont les constituants majeurs de la MEC dans le cœur [221]. Les études *in vivo* ont montré que les mâles produisaient plus de MMPs suite à un IDM ce qui conduisait à une dégradation plus importante de collagène au niveau de la zone infarctée et un risque élevé de rupture ventriculaire [135]. L'utilité des marqueurs de fibrose à prédire le remodelage a été observée à la phase aigüe.

Collagène :

Manhenke et ses collègues ont étudié la modulation des différents marqueurs de la synthèse et de la dégradation de collagène après un IDM [222]. Ils ont observé une dégradation accrue dans le collagène de type I à la phase aigüe post-IDM compensée par une augmentation dans la synthèse du collagène de type III à la même phase. La synthèse des deux types de collagène persistait dans le temps (jusqu'à un 1 an post-IDM) suggérant une persistance dans l'état fibrotique même à la phase chronique du remodelage. L'augmentation post-IDM du N terminal du procollagène de type III (marqueur de la synthèse du collagène de type III) et du C terminal du télopeptide du collagène de type I (marqueur de la dégradation du collagène de type I), étaient montrées associées avec le risque du RVG

délétère [199]. De plus, le ratio de ces deux marqueurs ≤ 1 , mesuré à un mois post-IDM, était un prédicteur indépendant du RVG à 1 an [223].

MMPs et TIMPs:

Parmi tous les biomarqueurs associés avec le remodelage, les plus grandes associations ont été observées avec les régulateurs de la MEC : les MMPs et les TIMPs [2]. L'étude la plus exhaustive de l'association de ces biomarqueurs avec le remodelage a été conduite dans la cohorte *REVE-2* incluant 245 patients avec IDM [224]. Les taux sériques de MMPs (1, 2, 3, 8, 9 et 13) et des TIMPs (1, 2, 3 et 4) ont été mesurés au moment de la sortie de l'hôpital et 1 mois, 3 mois et 1 an plus tard. Les taux de MMP-1 étaient comparables entre les différents temps. Les taux de MMP-2, MMP-3, TIMP-2, et TIMP-4 étaient bas à la phase aiguë et augmentaient avec le temps. Alors que MMP-8, MMP-9 et TIMP-1 étaient élevés à la phase aiguë et diminuaient avec le temps. Parmi ces biomarqueurs, seuls les valeurs de MMPs 8 et 9 mesurées à la phase aiguë, corrélaient avec le RVG à 1 an. Dans l'analyse multivariée, MMP8 mais pas MMP9 était un prédicteur indépendant du RVG [224]. De plus MMP8 était le seul associé avec le risque de mortalité CV et de ré-hospitalisation pour une IC.

Galectine 3 :

La Galectine 3 appartient à la famille des lectines. Sécrétée principalement par les macrophages activés et les fibroblastes en prolifération, elle est impliquée dans les processus d'inflammation et de fibrose [208]. La capacité pronostique de la galectine 3 a été montrée dans l'IC [225]. Des taux élevés de cette protéine sont associés avec la progression de l'IC et un mauvais pronostic. L'association de cette protéine avec le RVG a également été étudiée chez des patients avec IDM. Les taux sériques de la galectine 3 mesurée quelques jours post-IDM étaient un prédicteur de la diffusion de la fibrose au niveau des zones non-infarciées du myocarde [226]. De plus, les taux sériques de galectine 3 mesurés 2 jours post-IDM étaient un prédicteur indépendant du RVG [227]. Des études en population ont montré des taux plus élevés de cette protéine chez les femmes [228, 229], ce qui a imposé l'utilisation des seuils spécifiques à chaque sexe pour l'analyse.

8.5. Biomarqueurs transcriptomiques :

En fonction de leur potentiel codant pour les protéines, les ARNs sont classés en deux grandes familles : les ARNs codants et les ARNs non codants. Parmi les ARNs non-codants, les miRs (19-25 nucléotides) et les longs ARNs non-codants (lncARNs, >200 nucléotides) sont les plus étudiés en pathophysiologie CV. L'utilisation des puces à ARN et du séquençage a significativement contribué à la découverte de nouveaux biomarqueurs transcriptomiques.

8.5.1. ARNs codants :

La capacité des PBMC à prédire le RVG est faible et a complètement été abolie en présence du BNP [202], ce qui attire l'attention vers le transcriptome de ces cellules et sa capacité prédictive. Dans un modèle d'hypertension, les cellules immunitaires subissaient les mêmes modifications transcriptomiques que les cardiomyocytes ce qui suggère que les cellules immunitaires pourraient refléter ce qui se passe dans le cœur [230]. De plus, Wingrove et ses collègues ont montré que l'expression génique des PBMC corrélait avec la sévérité de la coronaropathie [231].

La signature transcriptomique de la dysfonction ventriculaire a été déterminée grâce à l'utilisation des puces à ARN effectuées sur les échantillons sanguins de patients avec IDM. Ces analyses ont permis de déterminer les voies de signalisation perturbées lors du processus du RVG et d'identifier de nouveaux biomarqueurs, et ce en se basant sur le réseau d'interaction protéines-protéines [232]. Le métabolisme de collagène, la prolifération cellulaire et la croissance représentent les processus les plus perturbés chez les patients ayant développé une dysfonction ventriculaire [233]. Dans une autre étude, l'expression des gènes associés à l'angiogenèse au niveau des cellules sanguines étaient significativement affectée chez les patients avec une faible FE [234]. La combinaison de trois gènes (VEGF-B, PGF et THBS1) impliqués dans ce processus avait une capacité prédictive de la dysfonction ventriculaire qui était supérieure à celle du NT-proBNP. [234]. Une autre combinaison incluant 4 gènes (VEGF-B, DAXX, TNXB et LTBP4) impliqués dans l'angiogenèse, la fibrose et l'apoptose a également été identifiée [233]. L'analyse du transcriptome associé

avec l'inflammation a révélé d'autres gènes (TRAF2, SHKBP1 et UBC) avec une valeur prédictive qui était plus élevée que celle des biomarqueurs cardiaques [235]. En outre, l'expression de TGFBR1 mesurée dans le sang de 115 patients avec IDM augmente significativement chez les patients avec une dysfonction ventriculaire et avait une valeur prédictive ajoutée aux biomarqueurs cardiaques [236].

L'ensemble de ces études montrent le potentiel de la perturbation transcriptomique au niveau des cellules sanguines à prédire le RVG post-IDM. Ces études ont été effectuées sur un nombre limité de patients ce qui justifie l'absence de l'effet du sexe sur l'expression et le potentiel prédictif de ces gènes. Il serait intéressant de déterminer au niveau des cellules sanguines les voies de signalisation associées avec le RVG, distinctement chez les femmes et les hommes. Cela permettrait une mise en évidence de nouveaux biomarqueurs transcriptomiques capables de prédire le RVG de manière spécifique à chaque sexe.

8.5.2. ARNs non-codants :

Les miRs :

Les miRs sont exprimés de manière ubiquitaire dans le système CV et sont impliqués dans plusieurs processus : développement, apoptose, fibrose, néo-angiogenèse et hypertrophie des cardiomyocytes [237]. La capacité des miRs à réguler plusieurs processus pathophysiologiques est justifiée par la multiplicité des gènes cibles. Les miRs détectés dans le sang sont connus sous le nom de miRs circulants. Ces miRs proviennent des cellules mortes suite à une apoptose ou sont activement sécrétés par des cellules vivantes [237]. Ces miRs circulants peuvent être associés à des protéines ou même présents dans des microvésicules, des exosomes ou des corps apoptotiques. Ces entités d'ARNs sont très stables ce qui en fait des biomarqueurs très attractifs.

La capacité des miRs à prédire le risque d'IDM a été investiguée dans une cohorte prospective de 840 participants. Parmi les 19 miRs mesurés dans le plasma, trois miRs (126, 223 et 197) étaient associés avec le risque d'avoir un IDM pendant 10 ans [238]. Une association positive a été observée pour le miR-126 alors que les miRs 223 et 197 avaient une

association négative avec le risque d'IDM [238]. Dans une étude similaire de 212 participants, l'association de 179 miRs avec le risque d'IDM fatal pendant 10 ans a été analysée [239]. Dix miRs ont été différentiellement exprimés entre le groupe contrôle et le groupe ayant subi un IDM.

Des études *in vivo* ont montré que l'expression des miRs est rapidement et dynamiquement régulée au niveau cardiaque suite un IDM [237]. De plus, le profil plasmatique des miRs change après un IDM, notamment ceux enrichis au niveau cardiaque (1, 133, 499, 208) [237], conférant à ces miRs le potentiel de diagnostiquer l'IDM. L'utilisation de ces miRs pour le diagnostic de l'IDM est limitée par la technique de mesure (qPCR) longue et fastidieuse. Ces miRs peuvent également être utilisés pour prédire le risque de dysfonction ventriculaire post-IDM. Dans une cohorte de 500 patients avec IDM, les miRs 208 et 499 corrélaient inversement avec la FE [240]. Quant aux miR-1 [241] et miR-133 [242], ils n'ont pas montré d'association avec la dysfonction et le RVG.

Même les miRs non-enrichis au niveau cardiaque peuvent prédire le RVG. L'augmentation des miRs 194 et 34a après un IDM prédisait l'IC ischémique et corrélait avec la dimension télé-diastolique du VG [243]. La capacité du miR-150 à prédire la variation au niveau du VTD a été validée dans deux cohortes indépendantes [244]. De plus, la capacité prédictive de ce miR a dépassé celle du NT-proBNP et il était capable de reclasser 50% des patients qui étaient mal-classés avec le biomarqueur cardiaque. Une combinaison incluant les miRs 146-a et 21, mesurés 5 jours post ICP, prédisait le risque du RVG à 1 an [245].

Le potentiel des miRs 222-3p ; 21-5p et 23a-3p et leur gène cible SOD2 (superoxyde dismutase 2) comme biomarqueurs du RVG a été montré chez 256 patients de l'étude *REVE-2* [246]. L'association de ces molécules avec le remodelage délétère semble être affectée par le sexe. L'augmentation de la SOD-2 à 3 mois et 1 an dans le groupe avec RVG délétère était observée spécifiquement chez les femmes [246]. De plus, la dérégulation du miR-222-3p était spécifique aux hommes (diminution à la sortie de l'hôpital, augmentation à 1 an). Cette différence est justifiée par l'effet stimulateur des estrogènes sur l'expression de la SOD2. Cette étude attire l'attention vers l'utilité des miRs comme biomarqueurs spécifiques à chaque sexe.

Les lncARNs :

Les lncARNs constituent la vaste majorité des ARNs non codants [247]. Par rapport aux ARNs messagers, les lncARNs sont caractérisés par une haute spécificité au niveau du type cellulaire, du tissu, du stade de développement et même de l'état pathologique [247]. La fonction des lncARNs dépend de leur localisation cellulaire. Les lncARNs de localisation nucléaire sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle et épigénétique [247]. Ceux de localisation cytoplasmique, jouent un rôle dans la traduction, la stabilité et la dégradation des ARNs messagers [247]. Certains peuvent également agir comme des éponges contre les miRs et les facteurs protéiques.

Malgré le grand nombre d'études montrant la valeur diagnostique et pronostique des miRs avec le RVG, peu est connu sur les lncARNs. Une étude GWAS a révélé une association entre des polymorphismes au niveau du locus du lncARN MIAT (myocardial infarction associated transcript) et le risque d'IDM [248]. Dans le cœur, l'IDM induit des modifications importantes au niveau de l'expression des lncARNs [249].

Les lncARNs peuvent également être mesurés dans le sang ce qui leur confère un potentiel de biomarqueurs. La majorité des lncARNs présents dans le plasma après un IDM sont d'origine mitochondriale [250]. LIPCAR, un de ces lncARNs mitochondriaux, était augmenté lors de la phase chronique post-IDM (3 mois et 1 an) [250]. Chez les patients souffrant d'IC systolique, l'augmentation de LIPCAR était plus importante et capable de prédire la mortalité CV [250]. Un autre lncARN appelé MYHEART (myosin heavy-chain-associated RNA transcript), est exprimé spécifiquement au niveau du tissu cardiaque et exerce un rôle protecteur contre le remodelage hypertrophique [251]. De plus, MYHEART augmente significativement dans le plasma 1 heure après un IDM et corrèle avec les taux sériques de cTnT [252]. L'expression plasmatique du lncARN UCA1 (urothelial carcinoma-associated 1), le marqueur du cancer de la vessie et du poumon, était diminuée à la phase aigüe post-IDM et augmentée 3 jours plus tard [253]. L'IDM affecte également l'expression des lncARNs au niveau des cellules sanguines. Les lncARNs aHIF, ANRIL, KCNQ1OT1 et MALAT1 sont régulés dans les cellules sanguines des patients avec IDM par rapport aux

contrôles [254]. De plus la combinaison KCNQ1OT1-ANRIL permettait la reclassification de 40% des patients mal-classés avec le modèle clinique seul.

Les ARNs circulaires :

La communauté scientifique s'est récemment intéressée à une autre classe d'ARN non-codants appelés ARN circulaires et à leurs rôles pathophysiologiques dans les MCV [255]. Ces ARNs doivent leurs noms à leur forme originale en cercle. Ils sont très abondants dans notre organisme et phylogénétiquement conservés [255]. De plus, ils sont stables à la dégradation par les endonucléases ce qui leur confère un potentiel de biomarqueurs. L'ARN circulaire MICRA (Myocardial Infarction associated circular RNA) a récemment été identifié dans les cellules sanguines des patients avec IDM [256]. Les patients avec une faible expression de MICRA avaient un risque élevé de dysfonction ventriculaire. Cette observation a été validée dans deux cohortes indépendantes.

9. Biomarqueurs cardiovasculaires spécifiques des femmes :

Les biomarqueurs de la pathophysiologie CV :

Dans une étude de population incluant 3439 participants, trente biomarqueurs impliqués dans les pathophysiologies des MCV ont été comparés entre les femmes et les hommes [87]. En général, les femmes avaient des taux plus élevés de biomarqueurs lipidiques (plus de HDL et moins de LDL) et moins de biomarqueurs associés avec la dysfonction endothéliale, le recrutement des cellules inflammatoires et l'inflammation vasculaire. L'association de ces biomarqueurs avec le sexe était affectée par la composition corporelle, la distribution des graisses et la ménopause [87].

La proneurotensine :

La neurotensine est l'hormone de satiété et est impliquée dans le métabolisme des lipides. La capacité de N terminal précurseur de cette hormone, la proneurotensine à prédire la mortalité et la morbidité CV a été étudiée dans une population générale de 4632 participants [257]. Les taux de proneurotensine, mesurés à jeun, étaient plus élevés chez les femmes par rapport aux hommes et étaient prédictifs du risque du diabète, de MCV et de mortalité CV, spécifiquement chez les femmes. L'interaction entre la proneurotensine et le sexe au niveau de la prédiction des MCV était significative ($p < 0,001$) [257]. La valeur pronostique de la proneurotensine a été analysée dans la cohorte *Framingham Heart* incluant 3439 participants [258]. La capacité de la proneurotensine à prédire l'incidence de MCV était comparable entre les deux sexes. Dans une autre cohorte américaine de 1697 participants, la capacité de proneurotensine à prédire la mortalité de toutes causes était supérieure chez les femmes [259]. De plus, la proneurotensine prédisait la mortalité CV spécifiquement chez les femmes.

La thymosine β -4:

La thymosine β -4 (TB4) est une protéine codée par un gène localisé sur le chromosome X et est dotée de propriétés cardioprotectrices. Les taux de TB4 ont été mesurés

dans le plasma de 657 patients contrôles ou souffrant d'IC avec FE préservée ou réduite [260]. La TB4 était augmentée dans le groupe d'IC avec FE préservée comparée aux contrôles, et ce spécifiquement chez les femmes. L'analyse de la capacité diagnostique de cette protéine a révélé un potentiel discriminatoire entre les contrôles et le groupe d'IC avec FE préservée spécifiquement chez les femmes. Du point de vue pronostique, la TB4 prédisait le risque de mortalité à 2 ans spécifiquement chez les femmes, et ce indépendamment du NT-proBNP.

Les biomarqueurs du pronostic suite à un IDM non-occlusif:

Les femmes présentant un syndrome coronarien aigu sans obstruction coronaire ont un risque élevé d'évènements CV adverses et d'IC [261]. La valeur pronostique des marqueurs de l'inflammation (IL-6, hs-CRP et sérum amyloïde A) a été étudiée chez 390 femmes présentant des symptômes ischémiques sans signe d'obstruction [261]. Les taux élevés d'IL-6 et du sérum amyloïde A étaient associés avec une mortalité accrue. Parmi ces trois marqueurs, l'IL-6 était un prédicteur indépendant du risque de mortalité et d'hospitalisation pendant les 6 ans suivant l'accident ischémique.

Matériels & Méthodes

1. Cohortes :

Les patients des cohortes présentées dans ce manuscrit ont rempli un consentement écrit, conformément à la déclaration d'Helsinki et en accord avec les comités d'éthique locaux. Au Luxembourg, il s'agit du *Comité National d'Éthique et de la Recherche* (CNER).

1.1. Cohorte LUCKY :

Il s'agit d'un registre national de patients diagnostiqués avec un IDM aigu et traités avec une angioplastie coronaire. Le registre a été créé par l'institut national de chirurgie cardiaque et de cardiologie interventionnelle Luxembourgeois (INCCI) et le département de cardiologie du Centre Hospitalier du Luxembourg (CHL). Les patients ont été consécutivement recrutés entre 2006 et 2012. Les données cliniques des patients ont été collectées au moment de l'admission. Des informations relatives à l'état de santé des patients jusqu'à un an après l'IDM sont disponibles dans le registre. Le diagnostic de l'IDM était basé sur les symptômes cliniques et les modifications au niveau des enzymes cardiaques, à savoir la cTnT et la CK, ainsi que l'ECG. Les patients ont été classés en deux groupes en fonction de leur profil ECG.

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

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

La reperfusion a été effectuée dans les 12 heures suivant le début de la douleur thoracique par angioplastie coronaire. Les échantillons sanguins ont été obtenus au moment de la reperfusion et également deux fois par jour par la suite afin de mesurer les taux de biomarqueurs cardiaques. Ces prélèvements ont été effectués par le laboratoire de biologie médicale du CHL. Les plasmas ont été séparés et conservés à -80°C dans des tubes citratés.

Tableau 1. Comparaison des caractéristiques cliniques et démographiques entre les femmes et hommes de la cohorte LUCKY.

	Tous les patients (N=608)	Femmes (N=138, 23%)	Hommes (N=470, 77%)	Valeur de p (Femmes versus Hommes)
Age, médiane (rang), année	60 (30-91)	70 (33-91)	57 (30-88)	<0,001
Femmes préménopausées (âge ≤ 50), n (%)	17 (2,8)	17 (12,3)	-	-
IMC (rang)	27 (18-51)	26 (18-47)	27 (18-51)	0,003
Leucocytes, médiane (rang), ×10 ⁹ /L	10,75 (1,11-7250)	10,27 (4,96-7250)	10,92 (1,11-6350)	0,357
Marqueurs plasmatiques, valeurs maximales, médiane (rang)				
CK, U/L	1497,6 (34-13038)	1353 (57-9233)	1639 (34-13038)	0,246
cTnT, µg/L	3,9 (0,01-31,64)	3,73 (0,01-26,93)	3,96 (0,03-31,64)	0,939
NT-proBNP à la reperfusion, médiane (rang), pg/mL	205,2 (5-35000)	481,1 (45,26-15679)	160,2 (5-35000)	<0,001
Temps ischémique, médiane (rang), heures	3,12 (0,6-12)	3,12 (0,6-12)	3,36 (0,8-12)	0,46
FE à 4 mois, médiane (rang), %	50 (15-89)	50 (20-86)	50 (15-89)	0,903
FEr (FE≤40%), n(%)	120 (19)	28 (20)	92 (19)	0,92
Antécédents CV, n (%)				
IDM	59 (10)	7 (5)	52 (11)	0,034
Diabète	126 (21)	32 (23)	94 (20)	0,406
Hypertension	279 (46)	69 (50)	210 (45)	0,286
Hypercholestérolémie	255 (42)	61 (44)	194 (41)	0,557
Tabac	273 (45)	54 (39)	219 (47)	0,068
Type d'IDM (STEMI), n (%)	483 (79)	113 (82)	370 (79)	0,473
Classification NYHA (>=II), n (%)	120 (20)	45 (33)	75 (16)	<0,001
Médicaments préadmission, n (%)				
Statines	113 (19)	25 (18)	88 (18)	1
Aspirine	120 (20)	27 (20)	93 (20)	1
β-Bloquants	124 (20)	35 (25)	89 (19)	0,117
Inhibiteurs de l'angiotensine	70 (12)	16 (12)	54 (11)	1
Inhibiteurs de l'enzyme de conversion	70 (12)	19 (14)	51 (11)	0,363
Clopidogrel	40 (7)	9 (7)	31 (7)	1
Nitrates	25 (4)	7 (5)	18 (4)	0,474
Antagonistes du calcium	17 (3)	3 (2)	14 (3)	0,774
Diurétiques	18 (3)	9 (7)	9 (2)	0,009

Le suivi a eu lieu 4 mois après la survenue de l'IDM par ECG. Une échocardiographie a également été effectuée afin d'évaluer la FV. En fonction de leur FE, les patients ont été divisés, selon l'étude, en deux ou trois groupes. **Tableau 1** présente les caractéristiques démographiques et cliniques des patients, ainsi que la comparaison de ces caractéristiques entre les femmes et les hommes. Les différentes étapes de cette étude sont présentées dans la **Figure 20**.

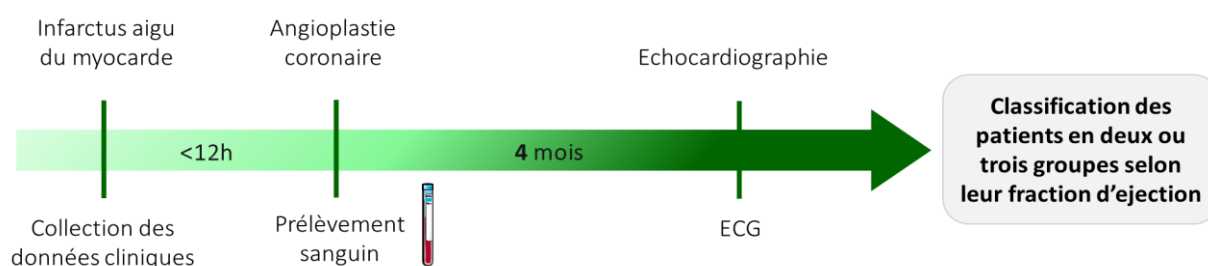


Figure 20. Les étapes de l'étude LUCKY

1.2. Etude LIFE-Heart:

Une validation indépendante a été effectuée chez 294 patients de la cohorte N°2 de l'étude LIFE-Heart pour la troisième étude présentée dans ce manuscrit.

L'étude LIFE-Heart a été établie afin d'étudier les facteurs de risque génétiques et non génétiques de l'athérosclérose. Les patients de cette étude appartiennent aux différents stades de coronaropathies et ont été répartis en trois cohortes différentes. Les patients de la cohorte 2 ont été diagnostiqués pour un IDM comme première manifestation de coronaropathies. 70% des patients étaient diagnostiqués avec un STEMI (CK 36 ± 34 U/L) et le reste avec un NSTEMI (CK 15 ± 14 U/L). Tous les patients ont été traités par angioplastie coronaire.

Le sang veineux des patients a été obtenu entre 6 et 36 heures (moyenne 20 ± 8 heures) après l'angioplastie coronaire dans des tubes PAXgene™ (BD Biosciences) afin de conserver la stabilité d'ARN. Les biomarqueurs cardiaques, inflammatoires, et métaboliques ont été mesurés le jour du prélèvement sanguin par le système MODULAR ANALYTICS (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Le suivi des patients a eu lieu en médiane 99 jours post-IDM. Le recrutement des patients s'est effectué consécutivement entre juillet 2008 et octobre 2012. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique de la faculté de médecine de l'université de Leipzig (Reg. No 276-2005) et inscrite sur le site ClinicalTrials.gov sous la référence NCT00497887.

L'expression de notre gène d'intérêt (CDKN1C) a été analysée dans les données de puce à ARN. L'ARN total a été extrait des PBMC en utilisant TRIzol reagent (*Invitrogen*) et quantifié par Nanodrop (*ThermoFisher*). 500ng d'ARN a été précipité par éthanol à l'aide du Glyco-Blue (*Invitrogen*) et ensuite dissout à une concentration de 50-300ng/μl. La puce à ARN Illumina HT-12 v4 Expression BeadChips (*Illumina, San Diego, CA, USA*) a été utilisée pour l'hybridation de l'ARN. Le traitement des données et le control-qualité ont été expliqués en détail dans [262, 263]. Les différentes étapes de cette étude sont présentées dans la **Figure 21**. La comparaison des caractéristiques démographiques et cliniques entre les femmes et les hommes de cette cohorte est présentée dans le **tableau 2**.

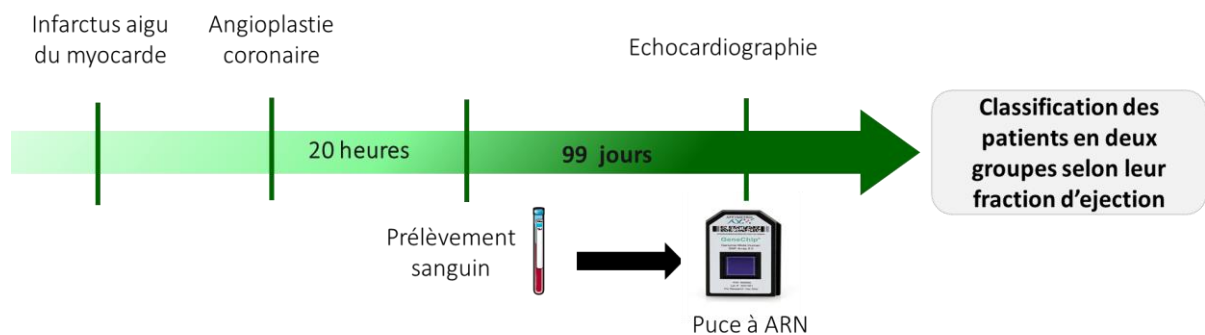


Figure 21. Les étapes de l'étude LIFE-Heart

Tableau 2. Comparaison des caractéristiques cliniques et démographiques entre les femmes et hommes de la cohorte LIFE-Heart.

	Tous les patients (N=294)	Femmes (N=82, 28%)	Hommes (N=212, 72%)	P value (Femmes vs, hommes)
Age, médiane (rang), année	60 (26-84)	67 (40-84)	57 (26-84)	6,6x10⁻⁴
IMC (rang)	27,8 (20-50,6)	27,3 (20,4-50,6)	27,8 (20-48)	0,51
Cellules sanguines à l'admission, médiane (rang)				
Leucocytes, ×10 ⁹ /L	10 (4,7-22,9)	10,1 (5,9-22,9)	10 (4,7-22,5)	0,67
Neutrophiles, %	72,7 (48,3-92,9)	73,2 (56,2-92,9)	72,4 (48,3-90,4)	0,086
Lymphocytes, %	17,2 (4-37)	17,2 (4-33,6)	17,2 (4,3-37)	0,63
Monocytes, %	8,7 (2,5-16)	8,2 (3,1-12,6)	9,1 (2,5-16)	9,2x10⁻⁵
Plaquettes, ×10 ⁹ /L	226 (3-542)	256 (86-542)	221 (3-538)	6,2x10⁻⁴
Biomarqueurs, médiane (rang)				
CK, U/L	640 (37,7-16900)	614 (47,2-4030)	640 (37,7-16900)	0,27
cTnT, µg/L	1,95 (0,007-17,8)	1,56 (0,007-6,08)	2,39 (0,02-17,8)	0,054
hsCRP, mg/L	22,5 (0,63-422)	19,7 (0,97-203)	23,6 (0,63-422)	0,48
NT-proBNP, pg/mL	1710 (36,8-33700)	2390 (41,3-22700)	1380 (36,8-33700)	4,3x10⁻⁴
FE, médiane (rang)	55 (18-71)	55,5 (20-71)	54 (18-70)	0,083
Antécédents CV, n (%)				
IDM	8 (2,7%)	1 (1,2%)	7 (3,3%)	0,45
Diabète	63 (21%)	24 (29%)	39 (18%)	0,056
Hypertension	153 (52%)	46 (56%)	107 (50%)	0,44
Hypercholestérolémie	40 (14%)	11 (13%)	29 (14%)	1,00
Tabagisme	202 (69%)	39 (48%)	163 (77%)	2,6x10⁻⁶

1. Quantification des biomarqueurs cardiaques :

1.1. NT-proBNP :

Le NT-proBNP a été mesuré dans les sérums des patients de la cohorte LUCKY obtenus à partir du sang veineux récupéré au moment de la revascularisation. Les sérums ont été conservés à -80°C jusqu'au dosage du NT-proBNP par les laboratoires de biologie médicale luxembourgeois *Laboratoires Réunis*. Ce dosage s'est fait par électrochimiluminescence (ECLIA) qui utilise l'analyseur Elecsys 2010 (*Roche Diagnostics*). Le dosage se fait au moyen de deux anticorps monoclonaux reconnaissant deux épitopes localisés au niveau de la partie N-terminale du proBNP. Le cycle analytique dure 18 minutes et comprend deux étapes d'incubation.

La première incubation consiste à incuber 15µl du sérum ou du plasma avec deux anticorps monoclonaux anti-NT-proBNP dont un biotinylé et l'autre marqué au ruthénium qui forment un complexe en sandwich en présence du NT-proBNP.

La deuxième incubation consiste à l'addition de microparticules tapissées de streptavidine dans la cuvette réactionnelle. Le complexe immunitaire se lie à la phase solide par l'interaction biotine-streptavidine. Le mélange réactionnel est ensuite transféré dans la cellule de mesure où les microparticules sont capturées magnétiquement au niveau de la surface de l'électrode et la fraction libre est éliminée. L'application d'un voltage génère une chimiluminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur. Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Celle-ci est générée, par l'analyseur utilisé, par une calibration en 2 points et une courbe de référence mémorisée dans le code-barres du réactif.

La méthode permet le dosage du NT-proBNP aussi bien sur les échantillons sériques que plasmatiques présentant un domaine de mesure analytique de 5-35 000pg/ml ou 0,6-4130 pmol/L. Le taux de réaction croisée avec les autres peptides est très faible. La variabilité liée à la méthode est de moins de 5%. La sensibilité fonctionnelle est de 50pg/ml étant la concentration en analyte la plus basse, mesurable de manière reproductible et donnant un coefficient de variation inter-séries de 20 %.

1.2. cTnT et CK :

Le sang veineux périphérique des patients de la cohorte LUCKY a été récupéré au moment de l'admission et deux fois par jours, par la suite afin de déterminer les valeurs maximales des biomarqueurs de la nécrose myocardique, à savoir la cTnT et la CK.

Le Troponin T STAT (Short Turn Around Time), CARDIAC T de chez Roche a été utilisé pour le dosage de la cTnT. La méthode est basée sur l'utilisation de deux anticorps monoclonaux spécifiques de la cTnT dont un biotinylé et l'autre marqué au ruthénium. Le dosage se fait par ECLIA et utilise l'analyseur Cobas e601 (*Roche Diagnostics*). La durée du cycle analytique est de 9 minutes comprenant une seule étape d'incubation du plasma ou du sérum avec les anticorps monoclonaux et les microparticules tapissées de streptavidine. Les différents composants forment un sandwich qui se fixe à la phase solide. Les microparticules sont ensuite maintenues au niveau de l'électrode de la cellule de mesure et une chimiluminescence est générée après l'application d'une différence de potentiel. La lecture se fait par un photomultiplicateur. Les limites de détection de l'essai sont comprises entre 0,01-25µg/L. La sensibilité fonctionnelle de l'essai est de 0,03µg/L, qui est mesurable d'une manière reproductible avec un coefficient de variation de 10%.

La CK est mesurée par la méthode recommandée par la Fédération Internationale de Chimie Clinique (IFCC) qui est basée sur l'activation par la N-acétylcystéine. Le dosage a été effectué dans le Cobas c501 (*Roche Diagnostics*).

La cTnT hypersensible (hs-TnT) a été mesuré dans le plasma de 315 patients au moment de la revascularisation (*Roche diagnostics*) en utilisant l'analyseur Cobas e601. La limite de détection est 0,003µg/L. Le seuil au 99^{ème} percentile est 0,014 µg/L avec une imprécision de 10% à 0,013µg/L.

2. Isolation des cellules sanguines humaines :

2.1. Isolation des neutrophiles humains primaires :

Les neutrophiles primaires ont été isolés à partir du sang total de volontaires sains prélevé dans des tubes héparinés. La technique d'isolation classique basée sur le Dextran/Ficoll a été utilisée.

Le gradient de Ficoll (*Lymphoprep de MP Biomedicals, Illkirch, France*) permet la séparation des neutrophiles des PBMC. Le sang frais est dilué dans du tampon salin phosphate (PBS pour phosphate buffered saline) contenant du Ca^{2+} et du Mg^{2+} . Le Ficoll est ensuite ajouté et l'ensemble est centrifugé à 400xg pendant 30 minutes à température ambiante. Après élimination du plasma, de l'anneau cellulaire de PBMC et des résidus du Ficoll, le culot sanguin contenant les globules rouges et les neutrophiles est alors gardé et traité par une solution à 1 % de Dextran 500 (*Amersham Biosciences Diegem, Belgique*) et 0,85 % de NaCl, dilué dans du milieu de culture RPMI. La sédimentation des cellules est ensuite effectuée à 4°C pendant une heure. Après l'avoir récupéré et dilué dans du milieu RPMI, le surnageant est centrifugé à 4°C, 200xg pendant 10 minutes. Afin de lyser les globules rouges, le culot est resuspendu dans l'eau stérile à 4°C pendant 10 secondes et la suspension est transvasée dans une solution de NaCl (0,43M). L'ensemble est centrifugé à 4°C, 200xg pendant 10 minutes. Les neutrophiles obtenus sont quantifiés en présence du bleu de trypan. Le nombre de cellules souhaité est lysé dans 1ml du TriReagent® (*Sigma, Bornem, Belgium*), qui protège aussi les ARN contre la dégradation, et conservé à -80°C jusqu'à extraction d'ARN.

La pureté de la population cellulaire a ensuite été déterminée en utilisant l'anticorps anti-CD16 pour les neutrophiles (*Immunotools, Friesoythe, Allemagne*) avec le cytomètre BD FACSCanto™ (*BD Biosciences*). La pureté était supérieure à 93 %.

2.2. Isolation des monocytes et des lymphocytes humains primaires :

L'isolation des monocytes a été effectuée à partir du sang provenant des patients atteints d'hémochromatose. La poche du sang (250-500ml) a été obtenue après la saignée du

patient au département d'Hématologie/Hémato-Oncologie/Cancérologie du CHL. Tous les patients ont signé un consentement éclairé.

La première étape de cette expérience consiste à l'isolation des PBMC en utilisant le gradient Ficoll et les tubes Leucosep (*Greiner, Wemmel, Belgique*). Ces derniers contiennent une membrane poreuse permettant la séparation du plasma, des PBMC et des globules rouges. Le Ficoll est centrifugé 1 minute à 200xg. Un volume de 30ml de sang total est distribué dans les tubes qui sont centrifugés de nouveau 30 minutes à 400xg. Le plasma est éliminé et l'anneau cellulaire représentant les PBMC est récupéré, lavé avec du PBS contenant du Ca^{2+} et du Mg^{2+} et centrifugé 15 minutes à 200xg à 15°C. Le culot est ensuite resuspendu dans du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} contenant 2mM d'EDTA (Éthylènediaminetétraacétique) et centrifugé 15 minutes à 200xg à 10°C. Le culot est ensuite resuspendu dans du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} contenant 2mM d'EDTA et 0,5% de sérum de veau fœtal (SVF). Les PBMC présents dans cette suspension sont quantifiés par le bleu de trypan. La suspension est ensuite centrifugée 15 minutes à 200xg à 10°C. Les cellules sont ensuite reprises dans du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} contenant 2mM d'EDTA et 0,5% de SVF afin de procéder à la séparation des monocytes.

L'isolation des monocytes des PBMC se fait par sélection négative grâce au kit Monocyte Isolation kit II (*Miltenyi, Royaume-Uni*). Tout d'abord, les PBMC sont incubés avec un Fc Blocking Reagent permet la saturation des récepteurs Fc présents sur la surface des cellules et inhibe la fixation non-spécifique des anticorps biotinylés ajoutés par la suite (anti-CD3 et anti-CD7 marqueurs des lymphocytes T, anti-CD16 marqueur des neutrophiles, anti-CD19 marqueur des lymphocytes B, anti-CD56 marqueur des cellules NK, anti-CD123 marqueur des cellules progénitrices, granulocytes et mégacaryocytes et la glycophorine qui permet de retenir les globules rouges). La deuxième étape consiste à l'incubation des PBMC avec un anticorps anti-biotine couplé à des microbilles magnétiques. Le mélange est ensuite déposé sur une colonne magnétique placée sur un aimant. Trois lavages successifs avec du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} contenant 2mM d'EDTA et 0,5% de SVF sont réalisés afin de récupérer les monocytes non marqués. L'effluent est centrifugé à 4°C pendant 10 minutes à 300xg. Le culot est resuspendu dans du milieu RPMI contenant du SVF et les cellules sont

énumérées. Le nombre de cellules souhaité est lysé dans 1ml du TriReagent® (*Sigma, Bornem, Belgium*) et conservé à -80°C jusqu'à extraction d'ARN.

La pureté des cellules était supérieure à 90 % et a été déterminée par l'utilisation d'anticorps anti-CD14 pour monocytes (*BD Biosciences*) avec le cytomètre BD FACSCanto™ (*BD Biosciences*).

3. Mesure de l'expression génique :

3.1. Extraction d'ARN :

A partir du sang total :

Le kit PAXgene™ blood RNA (*Qiagen, Venlo, Netherlands*) a été utilisé pour l'extraction des ARN totaux à partir des tubes PAXgene™. Il permet la purification de l'ARN intracellulaire à partir d'un volume initial de 2,5ml du sang total humain. Les échantillons sanguins ont été conservés à -20°C depuis le prélèvement. La purification d'ARN commence par une étape de centrifugation dans des tubes PAXgene Blood RNA (BRT) afin de sédimenter les acides nucléiques. Après avoir lavé et resuspendu le culot, l'étape suivante consiste à la digestion des protéines à l'aide des tampons optimisés par la Protéinase K (PK). Afin de favoriser l'homogénéisation du lysat cellulaire, une étape de centrifugation additionnelle est réalisée à travers les colonnes PAXgene Shredder (PSC). Le surnageant est ensuite transféré dans un nouveau tube de microcentrifugation. De l'éthanol est ajouté pour ajuster les conditions de fixation et le lysat est déposé dans une colonne PAXgene RNA (PRC). Au cours d'une courte étape de centrifugation, l'ARN se fixe sur la membrane de la colonne à base de gel de silice et les contaminants résiduels passent à travers cette membrane. Plusieurs étapes de lavages sont réalisées afin d'éliminer les résidus des contaminants. Lors de ces lavages, la membrane est traitée à la DNase I afin d'éliminer toute trace d'ADN génomique. L'ARN est finalement élué dans le tampon d'éluion (BR5). Le rendement d'ARN à partir de 2,5ml de sang dépend fortement du donneur, ça varie entre 4 et 10µg. L'ARN est ensuite purifié et concentré au moyen du kit RNeasy MinElute™ (*Qiagen*). L'ARN a été quantifié à l'aide du spectrophotomètre ND-1000 (*NanoDrop® Technologies, Wilmington, USA*). La dégradation d'ARN a été vérifiée grâce au 2100 Bioanalyzer® (*Agilent Technologies, Massy, France*) en utilisant des lames RNA 6000 Nano chips.

A partir des cellules sanguines isolées :

Les différents sous-types de leucocytes ont été lysés dans du TriReagent® (*Sigma, Bornem, Belgium*). L'ARN a été purifié au moyen du kit RNeasy® Microkit (*Qiagen*). Après décongélation des lysats cellulaires sur glace, un volume en chloroforme, équivalent au 1/5^{ème}

du volume initial du lysat est ajouté. Une étape de centrifugation est réalisée afin de séparer la phase aqueuse riche en acide nucléique et la phase organique riche en protéines. La phase aqueuse est ainsi récupérée et mélangée avec de l'éthanol 70%. L'ensemble est déposé sur une colonne RNeasy MinElute (*Qiagen*) afin de favoriser la fixation de l'ARN sur la membrane de la colonne. Une série de lavages par des tampons et de l'éthanol 80% est effectuée afin d'éliminer les contaminants résiduels. Une digestion à la DNase I est également réalisée afin d'éliminer l'ADN génomique qui peut être copurifié avec l'ARN. L'ARN est finalement élué dans de l'eau exempte de nucléases et quantifié à l'aide du spectrophotomètre ND-1000 (*NanoDrop® Technologies, Wilmington, USA*).

3.2. Transcription inverse et PCR quantitative :

L'ARN purifié a été rétro-transcrit en ADN complémentaire (ADNc) grâce à la l'enzyme SuperScript II (*Invitrogen*) dans un mélange réactionnel contenant également : RT Buffer 5X, des amorces aléatoires, des dNTPs 2,5mM (*Invitrogen*) et du dithiothreitol (DTT) 100mM (*Invitrogen*). Le programme PCR pour la SuperScript II est : 50 min à 42°C puis 15 min à 70°C. Deux contrôles ont été réalisés lors de la transcription inverse : un contrôle sans enzyme permettant de vérifier la présence de l'ADN génomique et un contrôle sans ARN pour vérifier la dimérisation des amorces lors de la réaction qPCR ou une éventuelle contamination du mélange réactionnel.

Les amorces utilisées pour la mesure des différents gènes ont été conçues à l'aide du logiciel Beacon Designer 8 (*Palo Alto, Etats Unis*). Les amorces amplifient tous les isoformes du gène si ce dernier en possède. Afin d'éviter toute amplification de l'ADN génomique, les séquences des amorces ont été placées de part et d'autre des jonctions exon-exon. La mise au point des amorces a permis la détermination de la température d'hybridation optimale ainsi que l'efficacité de PCR. Les séquences des amorces utilisées ainsi que leurs températures d'hybridation et leurs efficacités sont présentées dans le **tableau 3**.

Les ADNc obtenus ont été ensuite dilué 10 fois et mis en présence de amorces complémentaires et du SYBR® Green Master Mix (*Biorad, Hercules, Etats-Unis*) pour

mesurer l'expression génique par qPCR. Le SYBR® Green Master Mix contient de l'ADN polymérase (Taq polymérase), des nucléotides, du Sybr green I, un tampon de PCR et du MgCl₂. Ces différents éléments sont chauffés à 95°C pendant 2 minutes afin de dénaturer l'ADN, activer la polymérase et homogénéiser le milieu réactionnel. Le mélange subit 40 cycles de PCR. Chaque cycle est constitué de trois étapes : une première qui consiste en la dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 30 secondes, une seconde qui permet l'hybridation des amorces sur les brins d'ADNc suivie d'une étape de synthèse et d'élongation d'un nouveau brin par la Taq polymérase. La spécificité des amplicons a été vérifiée par l'analyse de la courbe de fusion, et le Sybr green qui est un agent intercalant fluorescent a permis la mesure de la quantité d'ADN amplifiée par la mesure de la fluorescence. La qPCR a été effectuée dans un thermocycleur Biorad CFX 96. Les résultats ont été normalisés par le SF3A1, et les valeurs d'expression ont été calculées par la méthode du delta delta CT (Cycle threshold) avec le logiciel Biorad CFX Manager.

Tableau 3. Séquences des amorces utilisées au cours de la qPCR

Gène	Séquence sens (5'→3')	Séquence anti-sens (5'→3')	Température d'hybridation (°C)	Efficacité de PCR (%)
LTBP4	GCTGCCTCCCCGCTGTGC	GGTGCGTGGGTGCGAATCC	58	100
LMNB1	AAGCCGCATGAGAATTGAGAG	TTGATCCCTTATTCCGCCATC	60	96.7
MMP9	AACTACGACACCGACGAC	CAGGCGGAGTAGGATTGG	62	107
TNXB	GTGGACCATCAGGGAGTGAG	CTGGGGAGCGAAAGTTTCTT	56	96
TGFBR1	CTTATTATGATCTTGTACCTTCTG	GGCATAACCAACATTCTCT	58	98.7
CDKN1C	CAAGAGGCTGCGGTGAG	GCTGCTACATGAACGGTCC	60	100.4
SF3A1	GATTGGCCCCAGCAAGCC	TGCGGAGACAACCTGTAGTACG	60	96.6

4. Analyses statistiques :

Une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme statistiquement significative dans l'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit.

4.1. Analyses standards :

La normalité de distribution des variables a été d'abord vérifiée par le test Shapiro Wilk. Le logiciel SigmaPlot version 12.0 a été utilisé pour réaliser les tests statistiques à 2 voies. Le test t de Student ou Mann Whitney ont été utilisés pour comparer deux groupes de variables continues respectivement de distribution gaussienne ou non. La comparaison de trois groupes a été réalisé par le test ANOVA pour les données gaussiennes et Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks pour les données non gaussiennes. Les tests Chi-square ou Fisher's exact ont permis la comparaison de deux ou trois groupes de variables catégorielles.

4.2. Analyses de prédiction :

La version 3.3.1 de la plateforme statistique R a été utilisée pour les analyses de prédiction. Les packages *Hmisc*, *PredictABEL*, *lmtest*, *rms*, *bootStepAIC*, *survival* et *survminer* ont été utilisés pour ces analyses.

Traitement des données :

L'imputation multiple à 100 itérations a été utilisée pour remplacer les données manquantes. Cette méthode est utilisée lorsqu'il y a plusieurs variables qui comportent des données manquantes. Elle consiste à imputer successivement plusieurs valeurs à chaque donnée manquante. Le mécanisme d'imputation est basé sur la définition d'un modèle réaliste de la distribution des données manquantes conditionnellement aux données observées. Chaque copie de données générée correspond à une distribution plausible des données manquantes. Le but de l'imputation est de réaliser des analyses statistiques valides tout en tenant compte de l'incertitude des données manquantes et tout en conservant les caractéristiques importantes et la structure des données (moyennes, variances, covariance

entre les variables en particulier). Les analyses statistiques réalisées sont menées sur chaque copie de données générées, puis les résultats sont combinés pour fournir un résultat global.

Des transformations sont exigées en cas d'utilisation de la régression logistique ou ordinale afin d'estimer un modèle prédictif optimal. Ces transformations ont pour objectif de rendre les données les plus conformes à la loi normale et de réduire l'intra-variabilité. Les données ont subi une transformation logarithmique de base 2 et une standardisation des données qui réduit la moyenne de la distribution à 0 et l'écart type à 1.

Prédiction de la dysfonction ventriculaire :

Nous avons utilisé la régression logistique (binaire) et ordinale pour caractériser la relation entre la FV évaluée 4 mois post-IDM, qui est une variable qualitative dépendante, et une ou plusieurs variables explicatives (facteurs de risque et biomarqueurs). Elle permet d'estimer l'odds ratio (OR, rapport des cotes) assortis de leur IVC (95%). L'OR donne une information sur la force et le sens de relation entre la variable dépendante et la variable explicative. Il est toujours positif, compris entre 0 et ∞ . Un OR égale à 1 est interprété comme une absence de relation entre les deux variables dépendante et explicative.

Les variables explicatives introduites dans cette analyse sont connues pour être associées avec le risque d'IDM et du RVG. Une analyse univariée a été d'abord réalisée où la relation entre chaque variable et la FV a été séparément analysée. L'analyse univariée génère des OR qui sont dits « bruts » ou « non ajustés ». Une analyse multivariée a ensuite été réalisée incluant toutes les variables explicatives et qui estime pour chaque variable un OR ajusté aux autres variables de ce modèle.

La régression logistique a été utilisée pour étudier l'association entre la FV et les biomarqueurs d'intérêt dans les études où les patients ont été divisés en deux groupes selon leur FE. Quant à la régression ordinale, elle a été utilisée dans les analyses comprenant trois groupes de patients.

Afin de déterminer la valeur prédictive ajoutée du biomarqueur d'intérêt, le critère d'Akaike (AIC pour Akaike Information Criterion) a été calculé pour le modèle clinique seul et après l'addition du biomarqueur. AIC permet d'analyser la robustesse des modèles en pénalisant ceux ayant trop de variables. Ce critère représente un compromis entre le biais qui diminue avec le nombre de variables et la parcimonie qui nécessite de décrire les données avec le nombre le plus petit de variables. Le meilleur modèle est celui possédant l'AIC la plus faible autrement dit celui apportant le maximum d'information sur la variable à expliquer avec le minimum de variables explicatives possible. Le Wald Chi test a été utilisé pour analyser la robustesse et la stabilité de chaque modèle séparément et le test du rapport des vraisemblances (Likelihood ratio test) pour comparer les modèles deux à deux. Une diminution significative dans l'AIC après l'addition du biomarqueur est interprétée comme une amélioration dans la robustesse et la valeur prédictive du modèle.

La capacité des biomarqueurs à améliorer la valeur prédictive du modèle clinique a également été évaluée par les analyses de reclassification utilisant le NRI (net reclassification index) et l'IDI (integrated discrimination improvement). Ces indicateurs permettent de déterminer si le biomarqueur d'intérêt est capable de reclasser les patients non ou mal-classés par le modèle clinique seul. Le NRI est interprété comme étant le net changement dans la proportion des patients ayant été correctement classés sous le nouveau modèle. Quant à l'IDI, il est interprété comme étant le pourcentage d'amélioration du pouvoir discriminatif du modèle après l'addition du biomarqueur d'intérêt.

Afin d'évaluer la robustesse du modèle, une validation interne à partir des mêmes données a été effectuée par *bootstrap*. Cette méthode est basée sur le ré-échantillonnage en créant plusieurs copies différentes des données originales et ce en supprimant certaines données et les remplaçant par d'autres données appartenant au même jeu de données. Dans nos analyses, cette opération a été répétée 150 fois et à chaque nouvelle copie de données la performance du modèle est testée par le calcul de l'AIC. Les résultats sont exprimés en pourcentage de copies de données permettant la génération du modèle le plus robuste, comme attesté par l'AIC le plus faible.

Prédiction de la mortalité:

Les courbes de survie Kaplan Meier ont été utilisées pour comparer entre les femmes et les hommes le risque de mortalité (de toute cause) pendant les 6 mois post-IDM. Cette méthode permet d'analyser la probabilité de survie sur un intervalle de temps. Cette probabilité est calculée en divisant le nombre de patients décédés sur celui des patients exposés au risque de décès pendant cet intervalle. La méthode Kaplan Meier réalise une estimation de la probabilité à chaque fois que le décès se produit d'où le profil en escalier de ces courbes. Le test de LogRank a été utilisé pour comparer les deux courbes.

La capacité des biomarqueurs à prédire la mortalité à 6 mois chez les femmes et les hommes a été analysée en utilisant le modèle à risques proportionnels de Cox. Ce modèle se rapproche des modèles de régression classique, dans le sens où on veut relier un événement à des variables explicatives. Il permet d'exprimer le risque de survenue d'un événement en fonction du temps et des variables explicatives, en calculant le rapport de hasard (hazard ratio, HR) qui exprime le risque estimé sur toute la durée de l'étude. L'association des biomarqueurs avec la mortalité a été évaluée aussi bien dans une analyse univariée que multivariée. Cette dernière incluait les mêmes variables que la régression logistique ou ordinale.

Résultats

Etude N°1 : Identification d'une combinaison de trois gènes capables d'améliorer la prédiction de la fonction ventriculaire après un IDM

Des études réalisées par notre équipe ont analysé l'association du profil transcriptomique des cellules sanguines avec la dysfonction ventriculaire post-IDM [232-236, 264]. Néanmoins, ces études ont été réalisées sur un faible nombre de patients. Parmi les gènes différentiellement exprimés entre les patients présentant ou non une dysfonction ventriculaire, cinq ont été sélectionnés pour une validation incluant un plus grand nombre de patients : LMNB1, MMP9, TXNB, LTBP4 et TGFBR1. La sélection de ces cinq gènes a été basée sur les critères suivant: 1) une valeur prédictive élevée comme attestée par un AUC (area under the receiver operating characteristic curve) > 0,7 - 2) un niveau d'expression élevé à modéré qui rend la détection de ces gènes par qPCR reproductible et fiable - 3) l'expression de ces gènes au niveau du cœur insuffisant (résultats non publiés) ce qui est en accord avec l'infiltration des cellules immunitaires sanguines dans le cœur après un IDM.

Pour cette validation, 449 patients du registre LUCKY ont été inclus. L'expression des cinq gènes a été mesurée par qPCR dans le sang total récupéré au moment de la revascularisation. En fonction de la FE, déterminée à 4 mois par échocardiographie, les patients ont été répartis dans deux groupes : FE réduite (FE_r, FE_≤40%) et FE préservée (FE_p, FE_>40%). Les patients avec une FE_r représentaient 18% de la cohorte. Ils étaient plus âgés que les patients du groupe avec FE_p, avaient des niveaux plus élevés de leucocytes, de CK, cTnT, et de NT-proBNP et ils étaient plus souvent diabétiques.

La comparaison des valeurs d'expression des cinq gènes entre les deux groupes de patients a révélé une surexpression de LMNB1, TGFBR1 et MMP9, et une sous-expression du LTBP4 dans le groupe avec une dysfonction ventriculaire (FE_r). Le niveau de TXNB était comparable entre les deux groupes FE_r et FE_p.

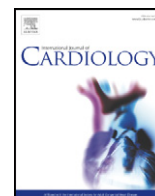
Nous avons ensuite souhaité déterminer le(s) type(s) de cellules immunitaires qui expriment ces gènes. Pour ce faire, nous avons mesuré leur expression dans les trois types cellulaires qui jouent un rôle clé dans la réponse inflammatoire post-IDM : les neutrophiles,

les monocytes et les lymphocytes. LMNB1 et MMP9 étaient principalement exprimés par les neutrophiles. Les gènes TXNB et LTBP4 quant à eux étaient plutôt exprimés par les monocytes et les lymphocytes. Le gène TGFBR1 était exprimé de façon comparable par les trois sous-types cellulaires.

La capacité de ces gènes à prédire la dysfonction ventriculaire a ensuite été analysée par régression logistique. L'analyse univariée a révélé l'association des cinq gènes avec la dysfonction ventriculaire. Dans un modèle multivarié incluant les paramètres connus pour être associés avec l'IDM et le RVG (âge, sexe, IMC, diabète, hypertension, hypercholestérolémie, tabac, antécédent d'IDM, temps ischémique, type d'IDM et nombre de leucocytes), trois parmi les cinq gènes prédisaient indépendamment la dysfonction ventriculaire. LTBP4 était négativement associé avec la dysfonction ventriculaire (OR [IVC 95%] 0,66 [0,47–0,93]) alors que TGFBR1 et TNXB avaient une association positive (1,68 [1,11–2,53] et 1,41 [1,04–1,90], respectivement).

Afin de déterminer la combinaison de gènes permettant la meilleure valeur prédictive, l'AIC a été calculée pour le modèle clinique seul et après l'inclusion des différentes combinaisons de gènes. Une diminution significative dans l'AIC (comme attestée par le likelihood ratio test) est interprétée comme une amélioration de la capacité prédictive du modèle. L'addition des trois gènes TNXB, TGFBR1 et LTBP4 était à l'origine de la meilleure prédiction, comme attestée par une diminution significative de l'AIC (383 versus 398 pour le modèle clinique, $p = 8.3 \times 10^{-5}$). La validation interne par bootstrap a été utilisée pour confirmer la valeur prédictive ajoutée des trois gènes. Parmi les 150 itérations réalisées, 61% (91) incluant les trois gènes étaient sélectionnés pour générer le modèle avec l'AIC le plus faible. De plus, la combinaison des trois gènes était capable de reclasser 45% des patients mal-classés avec le modèle clinique.

En conclusion, cette étude a permis l'identification d'une combinaison de trois gènes, exprimés par les cellules sanguines, capables d'améliorer la prédiction de la FV après un IDM.



A 3-gene panel improves the prediction of left ventricular dysfunction after acute myocardial infarction[☆]

Adeline Boileau, Torkia Lalem, Melanie Vausort, Lu Zhang, Yvan Devaux^{*},
On behalf of the Cardioline network (www.cardiolinc.org)

Cardiovascular Research Unit, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg



ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 July 2017

Received in revised form 16 October 2017

Accepted 31 October 2017

Keywords:

Myocardial infarction
Left ventricular dysfunction
Prognosis
Biomarker
Gene expression

ABSTRACT

Background: Identification of patients at risk of poor outcome after acute myocardial infarction (MI) would allow tailoring healthcare to each individual. However, lack of prognostication tools renders this task challenging. Previous investigations suggested that blood transcriptome analysis may inform about prognosis after MI. We aim to independently confirm the value of gene expression profiles in the blood to predict left ventricular (LV) dysfunction after MI.

Methods and results: Five genes (LMNB1, MMP9, TGFBR1, LTBP4 and TNXB) selected from previous studies were measured in peripheral blood samples obtained at reperfusion in 449 MI patients. 79 patients had LV dysfunction as attested by an ejection fraction (EF) $\leq 40\%$ at 4-month follow-up and 370 patients had a preserved LV function (EF $> 40\%$). LMNB1, MMP9 and TGFBR1 were up-regulated in patients with LV dysfunction and LTBP4 was down-regulated, as compared with patients with preserved LV function. The 5 genes were significant univariate predictors of LV dysfunction. In multivariable analyses adjusted with traditional risk factors and corrected for model overfitting, a panel of 3 genes – TNXB, TGFBR1 and LTBP4 – improved the prediction of a clinical model ($p = 0.00008$) and provided a net reclassification index of 0.45 [0.23–0.69], $p = 0.0002$ and an integrated discrimination improvement of 0.05 [0.02–0.09], $p = 0.001$. Bootstrap internal validation confirmed the incremental predictive value of the 3-gene panel.

Conclusion: A 3-gene panel can aid to predict LV dysfunction after MI. Further independent validation is required before considering these findings for molecular diagnostic assay development.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Left ventricular (LV) remodeling after acute myocardial infarction (MI) is a complex process which, when adequately regulated, restores the functional capacity of the infarcted heart. However, LV remodeling can become maladaptive, leading to LV dysfunction and ultimately

heart failure (HF). Heart failure is a grave condition with an ever increasing prevalence [1]. Prediction of the development of maladaptive LV remodeling after MI is challenging and would be a major breakthrough. A plethora of cardiovascular disease biomarkers have been identified [2], but there is still a need for novel biomarkers to identify patients at risk of developing LV remodeling and dysfunction after MI. While current guidelines recommend the use of brain natriuretic peptides (BNP)-monitoring to guide diagnosis and treatment of patients with acute or chronic HF [3], such biomarker-guided practice is not recommended in the post-MI setting.

In past studies [4–9], we examined whether gene expression profiles of blood cells may be used to predict LV remodeling and dysfunction after MI. The hypothesis of an association between blood cells transcriptome and outcome after MI was supported by the capacity of immune circulating cells to inform about some features of the inflammatory and healing processes that occur after MI [10]. It is now well established that immune cells play a major role in ischemic heart disease [11]. They link systemic to cardiac inflammation [12] and regulate LV remodeling [13]. Interestingly, gene expression profiles of blood cells are associated with LV remodeling in rats with aldosteronism and hypertensive heart disease [14]. Furthermore, gene expression profiles

Abbreviations: MI, myocardial infarction; LV, left ventricle; EF, ejection fraction; HF, heart failure; STEMI, ST-segment-elevation myocardial infarction; NSTEMI, non-ST-segment-elevation myocardial infarction; PCI, percutaneous coronary intervention; BMI, body mass index; TIMI, thrombolysis in MI; BNP, brain natriuretic peptides; Nt-proBNP, N-terminal proBNP; cTnT, cardiac troponin T; CPK, creatine phospho kinase; WBC, white blood cells; AIC, Akaike Information Criteria; IDI, integrated discrimination improvement; NRI, net reclassification index; CI, confidence intervals; OR, Odds ratios; $\Delta\Delta Ct$, relative quantification method; TGFBR1, transforming growth factor beta receptor 1; TNXB, tenascin XB; LTBP4, latent transforming growth factor beta binding protein 4; LMNB1, lamin B1; MMP9, matrix metalloproteinase 9.

[☆] The authors take responsibility for all aspects of the reliability and freedom from bias of the data presented and their discussed interpretation.

^{*} Corresponding author at: Cardiovascular Research Unit, Luxembourg Health Institute, L1526, Luxembourg.

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

of blood cells correlate with the presence and extent of coronary artery disease in patients undergoing angiography [15] and are used for the diagnosis of obstructive coronary artery disease in symptomatic non-diabetic patients [16].

In past investigations, microarray- and system-based approaches for biomarker discovery allowed the identification of several genes whose expression levels in peripheral blood cells may inform about prognosis after MI [4–9]. However, these studies were limited by small sample size. Here, we aimed to confirm in a large cohort of MI patients the association between the expression levels in the blood of 5 genes and LV dysfunction after MI. The rationale beyond the selection of these 5 genes is three-fold. Firstly, the 5 genes predicted LV dysfunction with areas under the receiver operating characteristic curve above 0.70 in discovery studies [5,6,8]. Secondly, their expression levels in blood cells were moderate to high and could reliably be detected using quantitative PCR. Lastly, they were expressed in biopsies from failing hearts (unpublished data), consistently with the recruitment of peripheral blood cells to the injured heart [11]. The selected 5 genes are: transforming growth factor beta receptor I (TGFBR1), tenascin XB (TNXB), latent transforming growth factor beta binding protein 4 (LTBP4), lamin B1 (LMNB1), and matrix metalloproteinase 9 (MMP9).

2. Methods

2.1. Patients and blood samples

From a total of 960 consecutive patients of the Luxembourg Acute Myocardial Infarction Registry completed at the Institut National de Chirurgie Cardiaque et de Cardiologie Interventionnelle and the Department of Cardiology of the Centre Hospitalier de Luxembourg [17], we enrolled 449 patients for which blood samples and follow-up data were available. All patients had acute MI and were treated with primary percutaneous coronary intervention (PCI). Acute ST-segment-elevation MI (STEMI) was the final diagnosis for 352 patients and 97 patients had non-ST-segment-elevation MI (NSTEMI). STEMI was defined by (1) clinically significant ST elevation (>1 mm); (2) occluded major coronary artery: thrombolysis in MI (TIMI) 0 flow in the left anterior descending, circumflex, or right coronary artery; and (3) peak creatine phospho kinase (CPK) activity >600 U/L (3 times above the upper limit of the reference interval). NSTEMI was defined by (1) no significant ST-elevation but significant ST depression (>1 mm); (2) significant lesion in a major coronary artery requiring PCI; and (3) positive cardiac troponin T (cTnT) concentration after 24 h (>0.03 $\mu\text{g/L}$). Most NSTEMI patients had a severe or sub-occlusive lesion in the left anterior descending, circumflex, or right coronary artery. Blood samples were withdrawn at the time of reperfusion via an arterial catheter into PAXgene™ RNA tubes (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium). Left ventricular (LV) ejection fraction (EF) was determined after 4 months using echocardiography. This time-point was chosen to ensure the completion of LV remodeling which dictates whether the heart will recover properly or show signs of dysfunction. The protocol has been approved by the ethics committee and the national committee for data protection of Luxembourg. All patients signed an informed consent. Consecutive patients were enrolled in the present study.

2.2. Measurement of gene expression

2.2.1. RNA extraction

Total RNA was extracted from PAXgene™ tubes with the PAXgene™ blood RNA kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) as described by the manufacturer. Extracted RNA was purified and concentrated using the RNeasy® MinElute™ kit (Qiagen). On-column DNase I treatment (Qiagen) was undertaken to digest potential contaminating genomic DNA. After extraction, RNA was quantified with the ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop® Technologies, Wilmington, USA). RNA quality was evaluated with the 2100 Bioanalyzer® apparatus (Agilent Technologies, Massy, France) and the RNA 6000 Nano chips.

2.2.2. Reverse-transcription and quantitative PCR

1 μg of total RNA was reverse-transcribed using the Superscript II RT kit (Life technologies, Belgium). Absence of contaminating genomic DNA was checked using controls with RNA but lacking reverse transcriptase. PCR was performed in a CFX96 thermocycler with the IQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad, Nazareth, Belgium). PCR primers were designed with the Beacon Designer software (Premier Biosoft, USA). The housekeeping gene SF3A1 was used for normalization purposes. The choice of SF3A1 has been previously rationalized [18]. For each gene measurement, a melting curve analysis and the sequencing of PCR products allowed attesting for the specificity of the amplification. An inter-run calibrator was used to normalize the variations between PCR plates. Gene expression levels were calculated by the relative quantification method ($\Delta\Delta\text{Ct}$) using the CFX Manager 2.1 software which takes into account primer efficacy (Bio-Rad). Primer sequences, hybridization temperatures and PCR efficiencies are provided in Table 3 (Supplementary data).

2.3. Statistical analyses

All statistical analyses started with a Shapiro-Wilk test to assess data normality. *t*-Test and Mann-Whitney test were used to compare two groups of continuous variables following a Gaussian or non-Gaussian distribution, respectively. The Chi-square test was used for qualitative data. The SigmaPlot v12.0 software was used for statistical analyses. All tests were two-tailed and a *P* value <0.05 was considered significant.

For prediction analyses, missing values were replaced using 100-fold multiple imputation. Continuous variables were scaled to mean = 0 and standard deviation = 1. Expression of genes was log10-transformed. Univariate and multivariable analyses with logistic regression were conducted to evaluate the ability of genes to predict LV dysfunction, either alone or in combination with various demographic and clinical parameters. Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI) were calculated. The Wald chi-square test was used to measure the statistical significance of the models. The Likelihood ratio test was used to compare 2 models. Bootstrap internal validation was used to test the robustness of the models. For each bootstrap sample, the whole model selection was performed to select the best model according to the Akaike Information Criteria (AIC). Computation of the net reclassification index (NRI) and the integrated discrimination improvement (IDI) was used for reclassification analyses. All prediction analyses were performed on the R version 2.14.2 statistical platform using the packages Hmisc, PredictABEL, lme4 and bootStepAIC.

3. Results

3.1. Study population

Characteristics of the 449 MI patients enrolled in this study are presented in Table 1 (Supplementary data). Median age was 61 and 75% were males. All patients had a successful revascularization. LV function was evaluated 4 months after MI and patients with an EF $\leq 40\%$ were considered as having LV dysfunction. Of the 449 MI patients enrolled in the study, 79 (18%) had LV dysfunction and 370 (82%) had a preserved LV function at 4-month follow-up. As compared to patients without LV dysfunction, patients with LV dysfunction were older, had higher white blood cell counts at admission, higher peak levels of CPK and cTnT, higher admission levels of NT-proBNP, and had more often type 2 diabetes.

3.2. Gene expression levels according to LV function

Expression levels of LMNB1, MMP9, TGFBR1, TNXB and LTBP4 were assessed using quantitative PCR in whole blood samples obtained at reperfusion in 449 MI patients. Levels of LMNB1, MMP9 and TGFBR1 were up-regulated in patients with LV dysfunction (4-month EF $\leq 40\%$) as compared to patients with preserved LV function (4-month EF $>40\%$). LTBP4 showed the opposite trend, being down-regulated in patients with LV dysfunction, and TNXB displayed comparable expression levels between patients with LV dysfunction and patients with preserved LV function (Fig. 1).

3.3. Gene expression in leukocyte subsets

To investigate the cellular origin of the 5 genes, neutrophils, monocytes and lymphocytes were isolated from the peripheral blood of healthy donors. LMNB1 and MMP9 were mostly expressed in neutrophils, TNXB and LTBP4 were predominant in monocytes and lymphocytes, and TGFBR1 was expressed at a similar level in all cell types (Fig. 1 in the Online Supplement).

3.4. Univariate analyses

We first determined the ability of the 5 genes individually to predict LV dysfunction (4-month EF $\leq 40\%$) using univariate logistic regression. The 5 genes were significant univariate predictors of LV dysfunction with odds ratios (OR) [95% confidence intervals (CI)] of 1.40 [1.12–1.74], 0.75 [0.57–0.98], 1.35 [1.07–1.69], 1.43 [1.15–1.79] and 1.26 [1.02–1.57] for LMNB1, LTBP4, MMP9, TGFBR1 and TNXB, respectively (Fig. 2).

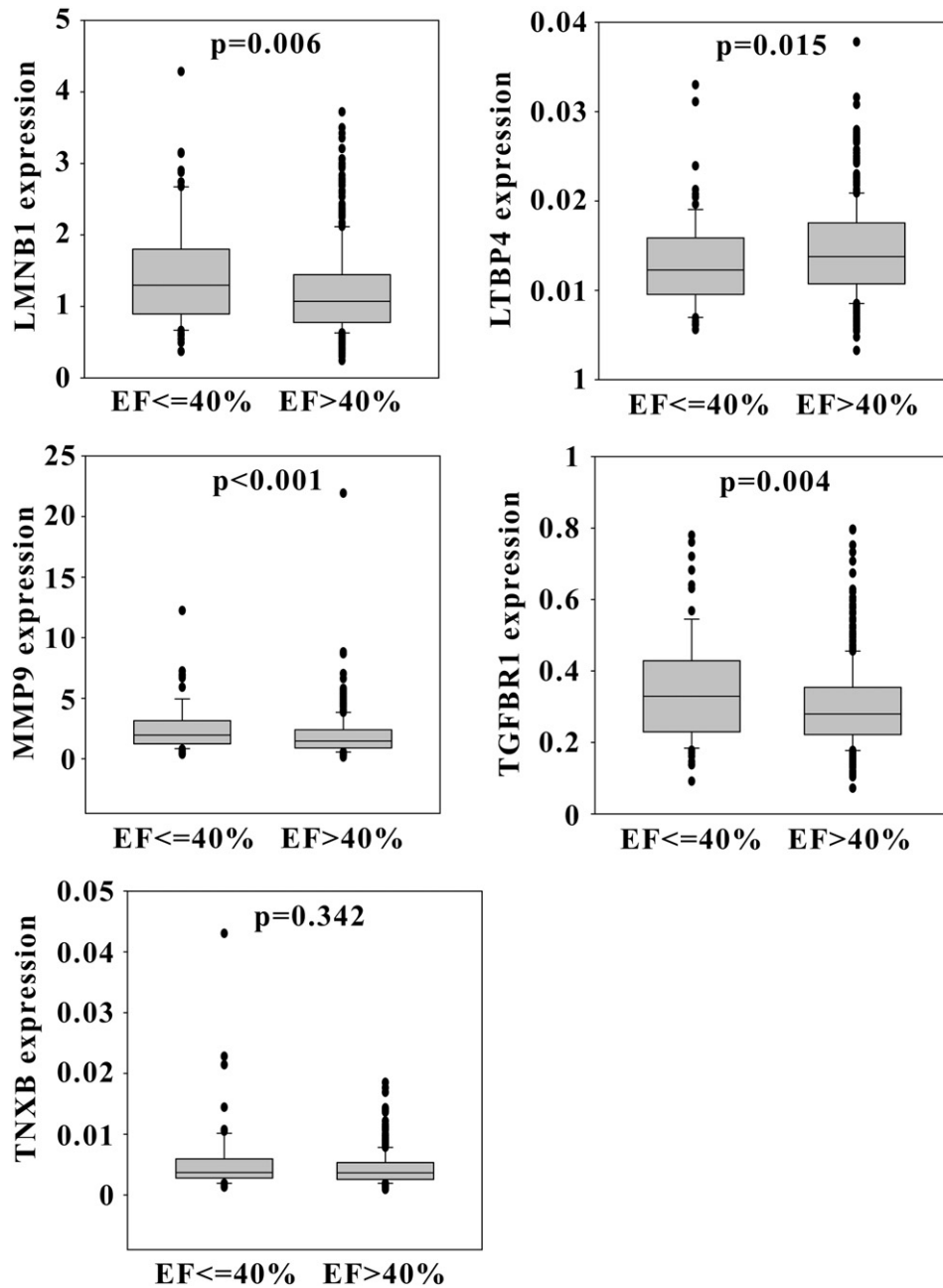


Fig. 1. Expression levels of 5 genes in 449 acute MI patients. Expression levels of LMNB1, MMP9, TGFBR1, TNXB and LTBP4 were assessed using quantitative PCR in whole blood samples obtained at reperfusion in 449 acute MI patients. Box-plots show the expression levels according to the EF at 4-month follow-up, patients with an EF ≤ 40% being considered as having LV dysfunction ($n = 79$) and patients with an EF > 40% being considered as having a preserved LV function ($n = 370$).

3.5. Multivariable analysis

We conducted multivariable analysis including the following parameters entered into a clinical model: age, gender, body mass index (BMI), diabetes, hypertension, hypercholesterolemia, white blood cells (WBC), MI type (anterior vs inferior), smoking, previous MI, ischemic time (delay between chest pain onset and reperfusion), troponin T, CPK and N-terminal proBNP (Nt-proBNP). As shown in Fig. 3A, in this clinical model, age and CPK were significant predictors of LV dysfunction. We then entered the 5 genes into the clinical model and we observed that LTBP4, TGFBR1 and TNXB were also significant predictors of LV dysfunction (Fig. 3B). TGFBR1 and TNXB showed positive associations with the risk of LV dysfunction (OR [95% CI] of 1.68 [1.11–2.53] and 1.41 [1.04–1.90], respectively) while LTBP4 showed the opposite

relationship (OR [95% CI] of 0.66 [0.47–0.93]), consistently with the gene expression data displayed in Fig. 1.

3.6. Selection of the optimal gene panel

To isolate the panel of genes necessary and sufficient to provide the optimal incremental predictive value, we calculated the AIC of the clinical model with each combination of 1 to 5 of the 5 genes. The use of the AIC instead of the widespread area under the curve allows for adjusting for the multiplication of variables entered in the predictive model, thus avoiding model overfitting. A lower AIC indicates a better model fit. As shown in Fig. 4A, a panel containing TNXB, TGFBR1 and LTBP4 provided the lowest AIC (383 vs 398 for the clinical model), and therefore the optimal predictive value. The difference between the clinical model only and

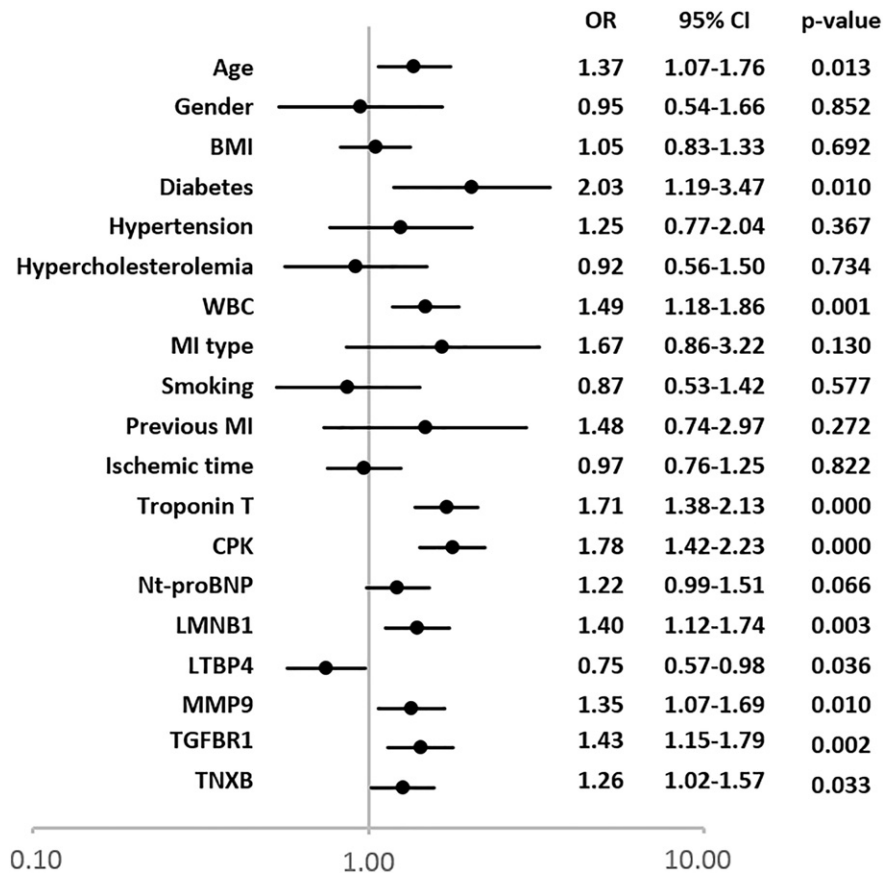


Fig. 2. Univariate analyses. The ability of 5 genes to predict LV dysfunction (4-month EF \leq 40%) was determined using univariate logistic regression in 449 acute MI patients. Odds ratios with 95% confidence intervals are shown. X axis is in log scale.

the clinical model with the 3-gene panel was significant ($p = 8E - 5$, likelihood ratio test). Adding the 3 genes to the clinical model resulted in a NRI of 0.45 [0.22–0.69], $p = 2E - 4$ and an IDI of 0.05 [0.02–0.08], $p = 1E - 3$. Table 2 (Supplementary data) provides the details of the statistical analyses for the clinical model alone and with each combination of genes.

To verify that the 3 genes TNXB, TGFBR1 and LTBP4 were necessary to reach the optimal predictive value, we carried out bootstrap internal validation. Through a random resampling of patients, this method allows to evaluate models robustness. Among the 150 sample iterations performed, 91 (61%) containing the 3 genes were selected to generate the prediction model with the lowest AIC, attesting for the necessity to add the 3 genes to the clinical model to reach the highest predictive value (Fig. 4B).

4. Discussion

In the present study, we confirmed the potential of gene expression profiles in the blood to predict LV dysfunction after MI. We identified a panel of 3 genes able to improve the prediction over traditional risk factors.

The 5 genes investigated here were selected from our past studies [5,6,8] which aimed at discovering novel biomarkers of LV remodeling after MI through systems-based approaches [9]. The impact of these studies was limited by small sample size and their findings needed confirmation. From the different genes found to be associated with LV remodeling in these studies, 5 genes were selected for the present validation study.

The gene LMNB1 encodes the lamin B1 protein. Lamins, defined as type V intermediate filament proteins, are the main structural components of the nucleus and contribute to the mechanical features of this organelle and of the entire cell [19]. In addition, lamins have been shown to modulate chromatin organization [20], transcription [21], DNA repair

[22] and can mediate nucleo-cytoskeletal connections [23]. Although an association of lamins A with dilated cardiomyopathy has been reported [24], whether LMNB1 is involved in cardiac disorders is unknown. MMP9 encodes the matrix metalloproteinase 9, a gelatinase which is released in large amounts by neutrophils and macrophages after MI and whose plasma levels are associated with LV remodeling after MI [25, 26]. TGFBR1 is coding for the receptor of TGF β 1 and activation of the TGF β 1-TGFBR1 axis triggers a switch from inflammation to fibrosis [27], which is consistent with the higher levels of TGFBR1 in patients with LV dysfunction. LTBP4 encodes the latent TGF β protein (LTBP) 4 which belongs to LTBP/fibrillin glycoproteins family [28] and is mainly expressed in the heart, skeletal and smooth muscles. LTBP4 controls TGF β signaling by sequestering TGF β in the extracellular matrix under its inactive form [29]. This sequestration prevents its interaction with cell surface receptors. The proteolysis of LTBPs leads to the release of the active form of TGF β and subsequently to the induction of the related-cell signaling pathways. In addition, LTBPs contribute to the assembly and secretion of TGF β [30]. Polymorphisms in LTBP4 have been reported to be associated with several disorders including dilated cardiomyopathy [29]. TNXB encodes the tenascin XB protein, a member of the family of tenascins [31] which are large extracellular matrix proteins. In human, TNXB deficiency is associated with Ehlers-Danlos syndrome, a connective tissue disorder characterized by hypermobility, vascular fragility and poor wound healing [32]. TNXB deficiency regulates collagen metabolism in skin and may be responsible for the reduced number of collagen fibrils observed in this disease [33]. It is thought that TNXB deficiency may confer cardiovascular protection by inhibiting aortic stiffness and by preventing coronary luminal obstruction [34], a hypothesis consistent with the observation that mice deficient for TNXB had a higher ejection fraction after alcohol-induced cardiomyopathy than wild-type mice [35].

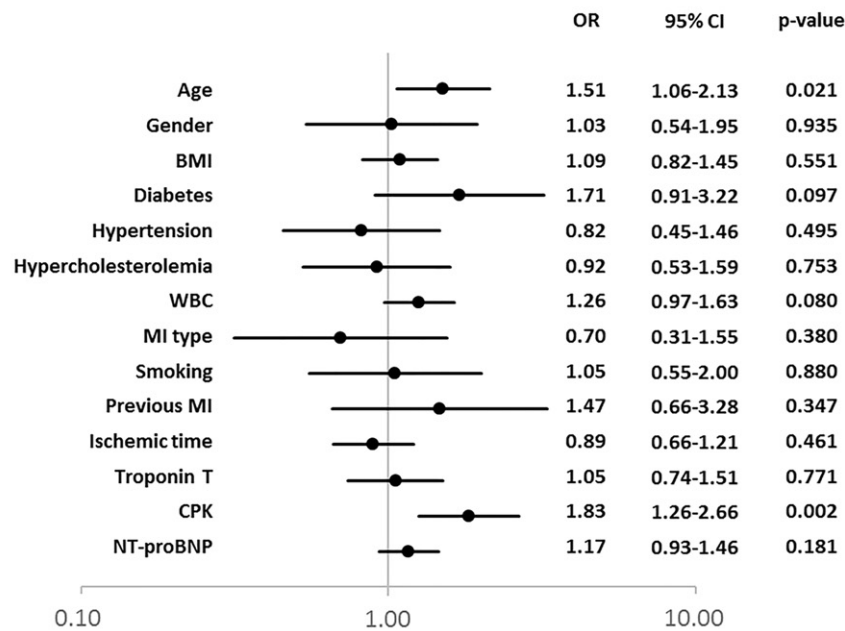
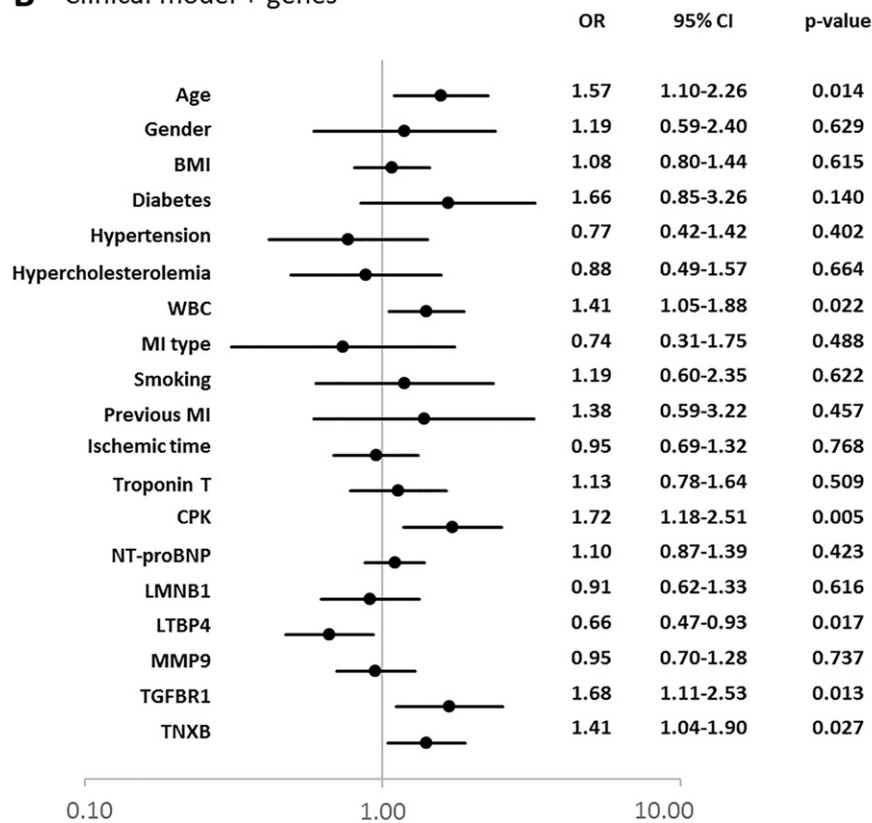
A Clinical model**B** Clinical model + genes

Fig. 3. Multivariable analyses. Multiple logistic regression was conducted to address the association of clinical variables and genes with LV dysfunction (4-month EF \leq 40%). A. Multivariate clinical model including clinical parameters and cardiac biomarkers. B. Multivariate model with clinical parameters and the 5 genes. Odds ratios with 95% confidence intervals are shown. X axis is in log scale.

Together with the known roles of blood cells in cardiac healing after MI [11–13] and with the observation that gene expression profiles of blood cells correlate with the extent of coronary artery disease [15] and are linked to LV remodeling in animal models [14], our data suggest that the 3 genes TGFBR1, LTBP4 and TNXB may functionally regulate LV

remodeling. However, this speculation requires further mechanistic investigations.

From a statistical perspective, we used previously developed methods [36,37] allowing for the isolation of combinations of biomarkers providing optimal predictive values. As mentioned earlier, the use of the AIC is

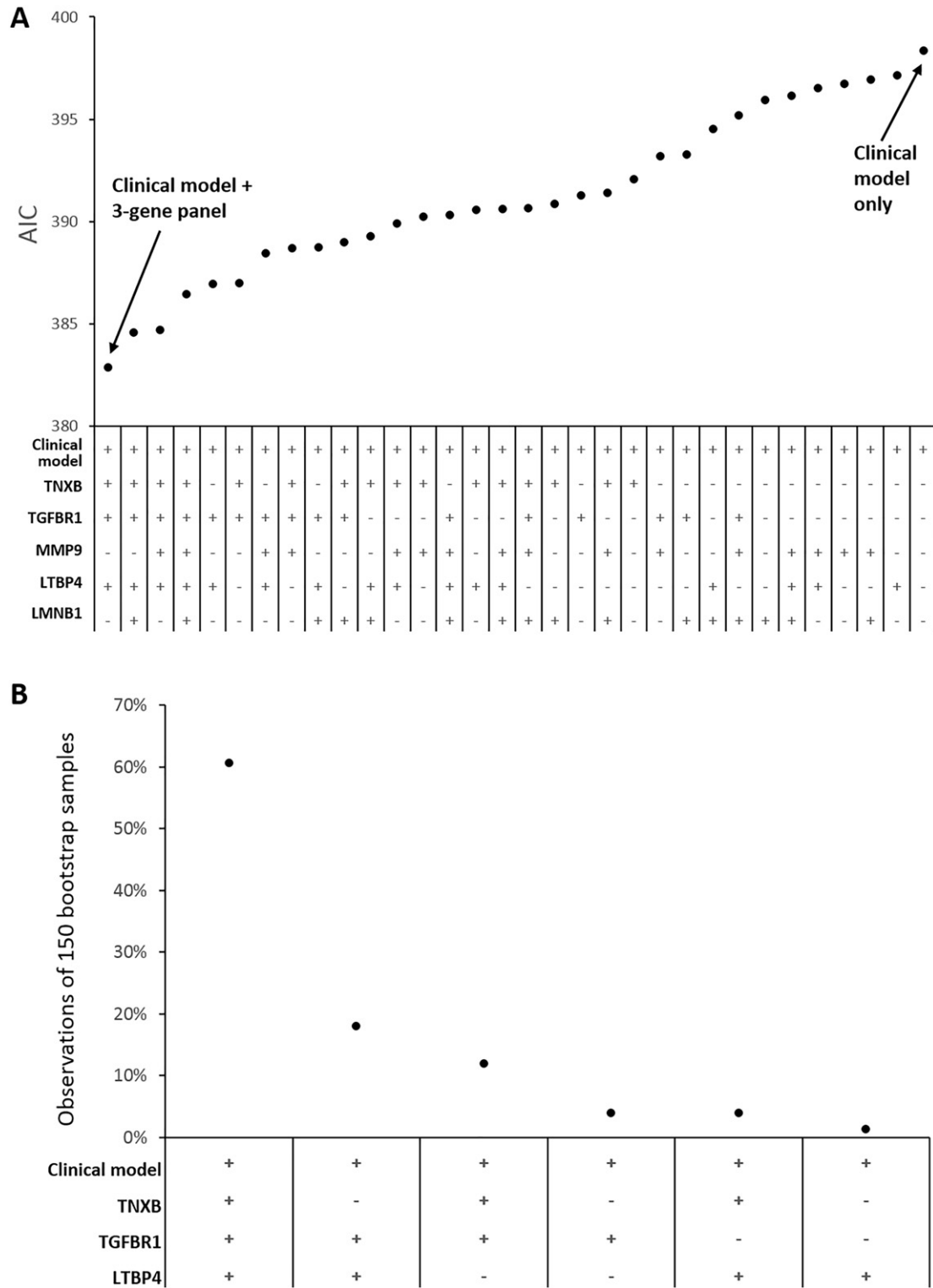


Fig. 4. Selection of the optimal gene panel. Multiple logistic regression was conducted to address the association of clinical variables and genes with LV dysfunction (4-month EF $\leq 40\%$). A. The Akaike Information Criteria (AIC) was calculated for the clinical model only and after adding each combination of 1 to 5 genes. A lower AIC indicates a better model fit. B. Bootstrap internal validation presenting the percentage of times a combination of genes which was selected as providing the best improvement of the prediction of the clinical model over 150 bootstrap iterations. All variables displayed in Fig. 3A were entered in the clinical model.

paramount for the analyses conducted in this study since it allows adjusting for the multiplication of variables entered in the predictive models to avoid model overfitting. The traditionally used area under the receiver operating characteristic curve is sensitive to the multiplication of input variables and can lead to erroneous results due to overfitting. The use of bootstrap internal validation allowed isolation of the smallest

panel of genes providing the highest predictive value. This method complements the comparison of AIC between different models and adds another level of confirmation that the 3 genes TNXB, TGFBR1 and LTBP4 were necessary and sufficient to reach the best predictive value.

From a clinical perspective, as the prevalence of HF [1] and the percentage of patients developing LV remodeling leading to HF after MI is

still high [38], finding novel strategies to accurately identify high risk patients at an early stage after MI would represent a major breakthrough towards precision healthcare. We [10,18,39] and others [14, 15] have shown that gene expression profiles of blood cells represent a non-invasive source of novel early biomarkers of cardiac disease. In vitro diagnostic assays based on gene expression profiles of blood cells have already been developed for the diagnosis of coronary artery disease [16]. Presuming the 3-gene panel of the present study can be further validated in independent patient populations, it could constitute the basis for the development and clinical application of a novel assay for outcome prediction after MI. This assay will have to be accurate, automated, and cost-effective. Considering the potential benefits of starting treatments to prevent HF development at an early stage after AMI, the assay will allow tailoring healthcare and reducing costs.

This study has some limitations. Firstly, the selection of the 5 genes was arbitrary, although based on significant associations with LV dysfunction after MI in discovery studies, moderate to high expression levels and presence in human cardiac biopsies from failing hearts. It cannot be excluded that other genes may provide a further incremental predictive value if combined with the 3-gene panel identified in the present study. Secondly, a causal relationship between the 3 genes and LV dysfunction is purely speculative and deserves further investigation. Furthermore, angiographic indices of coronary microvascular obstruction and data on the use of thrombus aspiration, which are associated with outcome after reperfusion, were not available for the present study. This crucial information has to be considered as a relevant limitation for the interpretation of the study results and its clinical application. Lastly, LV volumes which could have been used as other indices of ventricular remodeling were not available for the study.

In conclusion, a panel of 3 genes expressed in whole samples after MI has been identified and may aid in risk stratification after MI. The clinical usefulness of this finding remains to be addressed in prospective studies.

Funding Sources

A.B. is funded by the National Research Fund (grant # AFR 8832104). T.L. is funded by the Ministry of Higher Education and Research and the Society for Research on Cardiovascular Diseases of Luxembourg. L.Z.; M.V. and Y.D. are supported by the National Research Fund and the Ministry of Higher Education and Research of Luxembourg.

Author contributions

A.B., M.V. and T.L. performed the acquisition of the data. A.B., T.L. and L.Z. performed the analysis and the interpretation of the data. Y.D. drafted and edited the manuscript. All the authors approved the manuscript.

Disclosures

None.

Conflicts of interest

None.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.10.109>.

References

- N. Townsend, L. Wilson, P. Bhatnagar, K. Wickramasinghe, M. Rayner, M. Nichols, Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016, *Eur. Heart J.* 37 (42) (2016) 3232–3245.
- C.M. Dewey, K.M. Spittler, J.M. Ponce, D.D. Hall, C.E. Grueter, Cardiac-secreted factors as peripheral metabolic regulators and potential disease biomarkers, *J. Am. Heart Assoc.* 5 (6) (2016) <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.003101>.
- P. Ponikowski, A.A. Voors, S.D. Anker, H. Bueno, J.G.F. Cleland, A.J.S. Coats, et al., 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure, *Eur. J. Heart Fail.* 18 (8) (2016) 891–975.
- F.J. Azuaje, S. Rodius, L. Zhang, Y. Devaux, D.R. Wagner, Information encoded in a network of inflammation proteins predicts clinical outcome after myocardial infarction, *BMC Med. Genomics.* 4 (2011) 59.
- Y. Devaux, M. Bousquenaud, S. Rodius, P.-Y. Marie, F. Maskali, L. Zhang, et al., Transforming growth factor beta receptor 1 is a new candidate prognostic biomarker after acute myocardial infarction, *BMC Med. Genet.* 4 (1) (2011) 83.
- F. Azuaje, Y. Devaux, M. Vausort, C. Yvorra, D.R. Wagner, Transcriptional networks characterize ventricular dysfunction after myocardial infarction: a proof-of-concept investigation, *J. Biomed. Inform.* 43 (5) (2010) 812–819.
- Y. Devaux, F. Azuaje, M. Vausort, C. Yvorra, D.R. Wagner, Integrated protein network and microarray analysis to identify potential biomarkers after myocardial infarction, *Funct. Integr. Genomics* 10 (3) (2010) 329–337.
- F. Azuaje, Y. Devaux, D.R. Wagner, Integrative pathway-centric modeling of ventricular dysfunction after myocardial infarction, *PLoS One* 5 (3) (2010), e9661.
- F.J. Azuaje, F.E. Dewey, D.L. Brutsaert, Y. Devaux, E.A. Ashley, D.R. Wagner, Systems-based approaches to cardiovascular biomarker discovery, *Circ. Cardiovasc. Genet.* 5 (3) (2012) 360–367.
- Y. Devaux, Transcriptome of blood cells as a reservoir of cardiovascular biomarkers, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* 1864 (1) (2017) 209–216.
- M. Nahrendorf, F.K. Swirski, Innate immune cells in ischaemic heart disease: does myocardial infarction beget myocardial infarction? *Eur. Heart J.* 37 (11) (2016) 868–872.
- P. Libby, M. Nahrendorf, F.K. Swirski, Leukocytes link local and systemic inflammation in ischemic cardiovascular disease: an expanded “cardiovascular continuum”, *J. Am. Coll. Cardiol.* 67 (9) (2016) 1091–1103.
- R.A. Frieler, R.M. Mortensen, Immune cell and other noncardiomyocyte regulation of cardiac hypertrophy and remodeling, *Circulation* 131 (11) (2015) 1019–1030.
- I.C. Gerling, R.A. Ahokas, G. Kamalov, W. Zhao, S.K. Bhattacharya, Y. Sun, et al., Gene expression profiles of peripheral blood mononuclear cells reveal transcriptional signatures as novel biomarkers of cardiac remodeling in rats with aldosteronism and hypertensive heart disease, *JACC Heart Fail.* 1 (6) (2013) 469–476.
- J.A. Wingrove, S.E. Daniels, A.J. Sehnert, W. Tingley, M.R. Elashoff, S. Rosenberg, et al., Correlation of peripheral-blood gene expression with the extent of coronary artery stenosis, *Circ. Cardiovasc. Genet.* 1 (1) (2008) 31–38.
- J. Vargas, J.A.C. Lima, W.E. Kraus, P.S. Douglas, S. Rosenberg, Use of the Corus® CAD gene expression test for assessment of obstructive coronary artery disease likelihood in symptomatic non-diabetic patients, *PLoS Curr.* (2013) 5.
- D.R. Wagner, Y. Devaux, O. Collignon, Door-to-balloon time and mortality, *N. Engl. J. Med.* 370 (2) (2014) 178–182.
- M. Vausort, D.R. Wagner, Y. Devaux, Long noncoding RNAs in patients with acute myocardial infarction, *Circ. Res.* 115 (7) (2014) 668–677.
- Y. Gruenbaum, R. Foisner, Lamins: nuclear intermediate filament proteins with fundamental functions in nuclear mechanics and genome regulation, *Annu. Rev. Biochem.* 84 (2015) 131–164.
- M. Sadaie, R. Salama, T. Carroll, K. Tomimatsu, T. Chandra, A.R. Young, et al., Redistribution of the Lamin B1 genomic binding profile affects rearrangement of heterochromatic domains and SAHF formation during senescence, *Genes Dev.* 27 (16) (2013) 1800–1808.
- K.L. Reddy, J.M. Zullo, E. Bertolino, H. Singh, Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina, *Nature* 452 (7184) (2008) 243–247.
- K. Manju, B. Muralikrishna, V.K. Parmaik, Expression of disease-causing lamin A mutants impairs the formation of DNA repair foci, *J. Cell Sci.* 119 (Pt 13) (2006) 2704–2714.
- M. Crisp, Q. Liu, K. Roux, J.B. Rattner, C. Shanahan, B. Burke, et al., Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex, *J. Cell Biol.* 172 (1) (2006) 41–53.
- X. Wang, A. Zabell, W. Koh, W.H. Tang, Lamin A/C cardiomyopathies: current understanding and novel treatment strategies, *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* 19 (3) (2017) 21.
- D.R. Wagner, C. Delagardelle, I. Ernens, D. Rouy, M. Vaillant, J. Beissel, Matrix metalloproteinase-9 is a marker of heart failure after acute myocardial infarction, *J. Card. Fail.* 12 (1) (2006) 66–72.
- D. Kelly, S.Q. Khan, M. Thompson, G. Cockerill, L.L. Ng, N. Samani, et al., Plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-9: novel indicators of left ventricular remodelling and prognosis after acute myocardial infarction, *Eur. Heart J.* 29 (17) (2008) 2116–2124.
- M. Bujak, G. Ren, H.J. Kweon, M. Dobaczewski, A. Reddy, G. Taffet, et al., Essential role of Smad3 in infarct healing and in the pathogenesis of cardiac remodeling, *Circulation* 116 (19) (2007) 2127–2138.
- R. Giltay, G. Kostka, R. Timpl, Sequence and expression of a novel member (LTBP-4) of the family of latent transforming growth factor-beta binding proteins, *FEBS Lett.* 411 (2–3) (1997) 164–168.
- K.M. Lamar, T. Miller, L. Dellefave-Castillo, E.M. McNally, Genotype-specific interaction of latent TGFbeta binding protein 4 with TGFbeta, *PLoS One* 11 (2) (2016), e0150358.

- [30] K. Miyazono, A. Olofsson, P. Colosetti, C.H. Heldin, A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1, *EMBO J.* 10 (5) (1991) 1091–1101.
- [31] J. Bristow, M.K. Tee, S.E. Gitelman, S.H. Mellon, W.L. Miller, Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B, *J. Cell Biol.* 122 (1) (1993) 265–278.
- [32] G.H. Burch, Y. Gong, W. Liu, R.W. Dettman, C.J. Curry, L. Smith, et al., Tenascin-X deficiency is associated with Ehlers-Danlos syndrome, *Nat. Genet.* 17 (1) (1997) 104–108.
- [33] J.R. Mao, G. Taylor, W.B. Dean, D.R. Wagner, V. Afzal, J.C. Lotz, et al., Tenascin-X deficiency mimics Ehlers-Danlos syndrome in mice through alteration of collagen deposition, *Nat. Genet.* 30 (4) (2002) 421–425.
- [34] J.W. Petersen, J.Y. Douglas, Tenascin-X, collagen, and Ehlers-Danlos syndrome: tenascin-X gene defects can protect against adverse cardiovascular events, *Med. Hypotheses* 81 (3) (2013) 443–447.
- [35] L. Jing, L.J. Zhou, F.M. Zhang, W.M. Li, Y. Sang, Tenascin-x facilitates myocardial fibrosis and cardiac remodeling through transforming growth factor-beta1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma in alcoholic cardiomyopathy, *Chin. Med. J.* 124 (3) (2011) 390–395.
- [36] Y. Devaux, A. Salgado-Somoza, J. Dankiewicz, A. Boileau, P. Stammet, A. Schritz, et al., Incremental value of circulating MiR-122-5p to predict outcome after out of hospital cardiac arrest, *Theranostics* 7 (10) (2017) 2555–2564.
- [37] Y. Devaux, M. Vausort, G.P. McCann, D. Kelly, O. Collignon, L.L. Ng, et al., A panel of 4 microRNAs facilitates the prediction of left ventricular contractility after acute myocardial infarction, *PLoS One* 8 (8) (2013), e70644.
- [38] V. Auffret, G. Leurent, M. Gilard, J.P. Haco, E. Filippi, R. Delaunay, et al., Incidence, timing, predictors and impact of acute heart failure complicating ST-segment elevation myocardial infarction in patients treated by primary percutaneous coronary intervention, *Int. J. Cardiol.* 221 (2016) 433–442.
- [39] M. Vausort, A. Salgado-Somoza, L. Zhang, P. Leszek, M. Scholz, A. Teren, et al., Myocardial infarction-associated circular RNA predicting left ventricular dysfunction, *J. Am. Coll. Cardiol.* 68 (11) (2016) 1247–1248.

Appendix A. Supplementary data

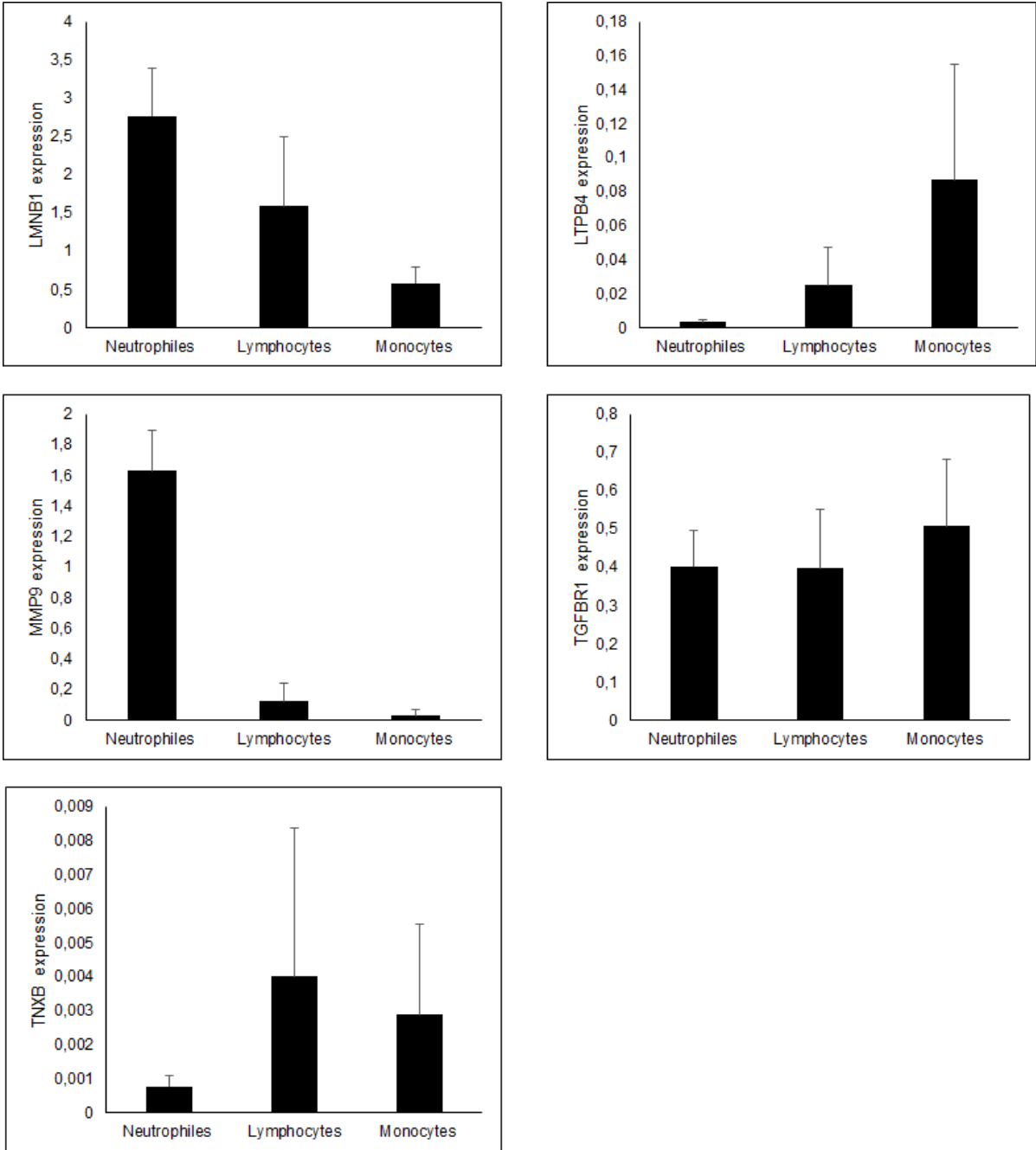
Supplementary Methods

Isolation of different leukocyte subtypes

Enriched fractions of different leukocyte subtypes were obtained from blood samples of healthy donors. Neutrophils were isolated by Ficoll gradient (MP Biomedicals, Illkirch, France) followed by dextran sedimentation (Amersham, Rosendaal, The Netherlands) and monocytes were purified from peripheral blood mononuclear cells isolated by Ficoll gradient in LeucoSep™ tubes (Greiner Bio One, Wemmel, Belgium) by negative selection using the Monocyte Isolation Kit II (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). Non-monocyte cells, i.e. T cells, B cells, natural killer cells, dendritic cells and basophils retained on the column by the antibody cocktail were recovered and considered as being predominantly lymphocytes.

Supplementary Figure 1

Legend: Gene expression levels in leukocyte subsets. Peripheral blood was obtained from healthy donors ($n \geq 2$) and different cell populations were isolated as described in Methods. Expression levels were assessed by quantitative PCR using SF3a1 as a reference gene for normalization.



Supplementary table 1. Characteristics of the population of MI patients.

	All (n = 449)	EF ≤ 40% (n = 79)	EF > 40% (n = 370)	p-value (EF ≤ 40% vs. EF > 40%)
Age, median (range)	61 (30-91)	65 (37-89)	60 (30-91)	0.011
Sex, male, n (%)	339 (75)	59 (74)	280 (80)	0.28
Body mass index, median (range)	27 (18-51)	28 (19-51)	27 (18-47)	0.55
WBC, median (range), x10⁹/L	10.7 (1.1-29)	12 (4.8-29)	10.4 (1.11-29)	<0.001
Biomarkers, median (range)				
CPK, U/L	1484 (34-13038)	3163 (34-12096)	1344 (76-13028)	<0.001
cTnT, µg/L	3.82 (0.01-26.93)	6.99 (0.03-26.93)	3.44 (0.01-25.66)	<0.001
Nt-proBNP, pg/mL	209 (5-35000)	676 (5-13977)	169 (10.55-35000)	<0.001
Ischemic time, 1 = 24h, median (range)	0.15 (0.03-0.94)	0.15 (0.04-0.62)	0.15 (0.03-0.94)	0.58
MI type, 1 = anterior, n (%)	348 (77)	66 (83)	282 (76)	0.68
4-month EF, median (range)	50 (15-89)	39 (15-40)	50 (42-89)	<0.001
Medical history, n (%)				
Previous MI	51 (11)	11 (14)	40 (11)	0.56
Diabetes	98 (22)	26 (33)	72 (20)	0.025
Hypertension	217 (48)	41 (52)	176 (50)	0.80
Hypercholesterolemia	199 (44)	33 (41)	166 (47)	0.38
Smoking	205 (45)	33 (41)	172 (49)	0.26
Pre-admission medications, n (%)				
Statins	89 (20)	18 (22)	71 (20)	0,64
Aspirin	85 (19)	13 (16)	72 (20)	0,53
β-Blockers	94 (21)	17 (21)	77 (22)	1
Angiotensin inhibitors	51 (11)	10 (12)	41 (11)	0,84
ACE inhibitors	56 (12)	14 (17)	42 (12)	0,19
Clopidogrel	24 (5)	4 (5)	20 (5)	1
Nitrates	18 (4)	3 (4)	15 (4)	1
Calcium antagonists	15 (3)	2 (2)	13 (3)	1
Diuretics	13 (3)	3 (4)	10 (3)	0.7

Discharge medications, n (%)				
Statins	391 (87)	61 (77)	330 (89)	0.008
Aspirin	421 (93)	64 (81)	357 (96)	<0.001
β-Blockers	396 (88)	66 (83)	330 (89)	0.178
Angiotensin inhibitors	32 (7)	6 (7)	26 (7)	0.811
ACE inhibitors	281 (62)	47 (59)	234 (63)	0.525
Clopidogrel	399 (88)	59 (74)	340 (91)	<0.001
Nitrates	31 (7)	3 (4)	28 (7)	0.32
Calcium antagonists	16 (3)	1 (1)	15 (4)	0.326
Diuretics	87 (19)	27 (34)	60 (16)	<0.001
NYHA classification, n (%)				
Class I	321 (71)	46 (58)	275 (74)	0.005
Class II	86 (19)	19 (24)	67 (18)	0.269
Class III	5 (1)	3 (4)	2 (0.5)	0.04
Class IV	0	0	0	

Left ventricular (LV) dysfunction was determined by a 4-month ejection fraction (EF) $\leq 40\%$. White blood cell (WBC) count and N-terminal pro-brain natriuretic peptide (Nt-proBNP) were determined at admission. Creatine phosphokinase (CPK), cardiac troponin T (cTnT) and high-sensitivity C-reactive protein (CRP) are peak values. Ischemic time = delay between chest pain onset and reperfusion. MI type = anterior vs. inferior. New-York Heart Association (NYHA) classification was determined at the same time than left ventricular dysfunction recording.

Supplementary table 2. Incremental prognostic value of 5 genes to a clinical model.

Added gene(s)	AIC	Wald chi square test p-value	LRT p-value	NRI	95% CI	NRI p-value	IDI	95% CI	IDI p-value
None	398	1.5E-04							
LTBP4 + TGFBR1 + TNXB	383	1.4E-05	8.3E-05	0.45	0.22-0.69	2.0E-04	0.05	0.02-0.09	1.3E-03
LMNB1 + LTBP4 + TGFBR1 + TNXB	385	2.3E-05	2.2E-04	0.45	0.21-0.69	2.3E-04	0.05	0.02-0.09	1.2E-03
LTBP4 + MMP9 + TGFBR1 + TNXB	385	2.6E-05	2.3E-04	0.43	0.19-0.67	4.7E-04	0.05	0.02-0.09	1.2E-03
LMNB1 + LTBP4 + MMP9 + TGFBR1 + TNXB	386	4.3E-05	5.4E-04	0.43	0.19-0.67	3.9E-04	0.05	0.02-0.09	1.1E-03
LTBP4 + TGFBR1	387	2.2E-05	4.4E-04	0.48	0.24-0.72	7.0E-05	0.04	0.01-0.06	3.8E-03
TGFBR1 + TNXB	387	3.0E-05	4.6E-04	0.48	0.24-0.72	8.8E-05	0.04	0.01-0.07	6.6E-03
LTBP4 + MMP9 + TGFBR1	388	4.1E-05	1.2E-03	0.46	0.22-0.70	1.5E-04	0.04	0.01-0.06	3.3E-03
MMP9 + TGFBR1 + TNXB	389	4.5E-05	1.3E-03	0.41	0.17-0.65	7.8E-04	0.04	0.01-0.07	6.2E-03
LMNB1 + LTBP4 + TGFBR1	389	3.8E-05	1.3E-03	0.44	0.20-0.68	3.0E-04	0.04	0.01-0.06	3.4E-03
LMNB1 + TGFBR1 + TNXB	389	5.4E-05	1.5E-03	0.44	0.20-0.68	3.0E-04	0.04	0.01-0.07	6.6E-03
LMNB1 + LTBP4 + TNXB	389	5.4E-05	1.8E-03	0.36	0.12-0.60	3.5E-03	0.04	0.01-0.07	8.6E-03
LTBP4 + MMP9 + TNXB	390	4.8E-05	2.3E-03	0.42	0.18-0.66	6.6E-04	0.04	0.01-0.06	8.9E-03
MMP9 + TNXB	390	4.5E-05	2.3E-03	0.22	-0.02-0.46	7.0E-02	0.03	0.01-0.06	1.9E-02
LMNB1 + LTBP4 + MMP9 + TGFBR1	390	7.1E-05	2.9E-03	0.48	0.24-0.71	8.5E-05	0.04	0.01-0.06	3.0E-03
LTBP4 + TNXB	391	5.2E-05	2.8E-03	0.35	0.11-0.59	4.6E-03	0.03	0.00-0.06	2.2E-02
LMNB1 + LTBP4 + MMP9 + TNXB	391	7.1E-05	3.4E-03	0.36	0.12-0.60	3.3E-03	0.04	0.01-0.07	7.0E-03
LMNB1 + MMP9 + TGFBR1 + TNXB	391	7.7E-05	3.4E-03	0.36	0.12-0.60	3.4E-03	0.04	0.01-0.07	6.2E-03
LMNB1 + TNXB	391	6.9E-05	3.2E-03	0.28	0.04-0.52	2.4E-02	0.03	0.00-0.05	2.2E-02
TGFBR1	391	5.1E-05	2.6E-03	0.38	0.14-0.62	2.0E-03	0.02	0.00-0.04	2.0E-02
LMNB1 + MMP9 + TNXB	391	7.2E-05	4.7E-03	0.25	0.01-0.49	3.9E-02	0.03	0.01-0.06	1.5E-02
TNXB	392	6.8E-05	4.0E-03	0.18	-0.06-0.42	1.3E-01	0.02	0.00-0.04	6.8E-02
MMP9 + TGFBR1	393	8.4E-05	1.0E-02	0.32	0.08-0.56	8.6E-03	0.02	0.00-0.04	1.9E-02
LMNB1 + TGFBR1	393	9.1E-05	1.1E-02	0.38	0.14-0.62	2.0E-03	0.02	0.00-0.04	2.0E-02
LMNB1 + LTBP4	395	1.0E-04	2.0E-02	0.42	0.18-0.66	6.0E-04	0.02	0.00-0.04	5.5E-02
LMNB1 + MMP9 + TGFBR1	395	1.5E-04	2.7E-02	0.36	0.12-0.60	3.0E-03	0.02	0.00-0.04	1.9E-02
LMNB1	396	1.3E-04	3.6E-02	0.28	0.03-0.52	2.5E-02	0.01	0.00-0.02	1.3E-01

LMNB1 + LTBP4 + MMP9	396	1.5E-04	4.1E-02	0.38	0.14-0.61	2.1E-03	0.02	0.00-0.04	4.8E-02
LTBP4 + MMP9	397	1.2E-04	5.4E-02	0.16	-0.08-0.40	1.9E-01	0.01	0.00-0.03	7.1E-02
MMP9	397	1.1E-04	5.7E-02	0.29	0.05-0.53	1.8E-02	0.01	0.00-0.02	1.2E-01
LMNB1 + MMP9	397	1.5E-04	6.6E-02	0.37	0.13-0.61	2.2E-03	0.01	0.00-0.02	9.0E-02
LTBP4	397	1.2E-04	7.2E-02	0.19	-0.05-0.43	1.3E-01	0.01	0.00-0.02	2.0E-01

The clinical model includes all variables displayed in Figure 3A. The Akaike Information Criteria (AIC) was calculated for each model; the lower the AIC the better the model fit. The Wald chi-square test addresses the model fit. The likelihood ratio test (LRT) compares the clinical model only to the clinical model with each combination of genes. The net reclassification index (NRI) and the integrated discrimination improvement (IDI) assess the reclassification value of each combination of genes to the clinical model only.

Supplementary table 3. PCR primers.

Gene	NCBI accession number	Primer Forward	Primer Reverse	Hybridization Temperature (°C)	PCR efficiency (%)
LTBP4	NM_001042544.1 (+2 variants)	GCTGCCTCCCCGCTGTGC	GGTGCGTGGGTGCGAATCC	58	100
LMNB1	NM_001198557.1 (+1 variant)	AAGCCGCATGAGAATTGAGAG	TTGATCCCTTATTTCCGCCATC	60	96.7
MMP9	NM_004994.2	AACTACGACACCGACGAC	CAGGCGGAGTAGGATTGG	62	107
TNXB	NM_019105.6 (+1 variant)	GTGGACCATCAGGGAGTGAG	CTGGGGAGCGAAAGTTTCTT	56	96
TGFBR1	NM_001306210.1 (+2 variants)	CTTATTATGATCTTGTACCTTCTG	GGCATACCAACATTCTCT	58	98.7
SF3A1	NM_005877.5	GATTGGCCCCAGCAAGCC	TGCGGAGACAACTGTAGTACG	60	96.6

LTBP4 has 3 variants, LMNB1 has 2 variants, TNXB has 2 variants and TGFBR1 has 3 variants. Primers were designed to encompass all transcripts. Accession numbers indicated are those of the longest transcripts.

Etude N°2 : Différences hommes-femmes au niveau de la valeur prédictive post-IDM des biomarqueurs cardiaques

Les biomarqueurs du stress et de l'ischémie myocardique NT-proBNP, cTns et CK ont montré une capacité limitée à prédire le RVG post-IDM [2]. Malgré les différences existant au niveau de ces biomarqueurs entre les femmes et les hommes [3, 10, 11, 85, 189], leur association avec le RVG n'a pas été étudiée chez les femmes et les hommes distinctement. Dans notre cohorte LUCKY, nous avons comparé l'association de ces biomarqueurs avec la dysfonction ventriculaire entre les deux sexes.

Pour ce faire, nous avons inclus 608 patients avec IDM de la cohorte LUCKY. Le NT-proBNP a été mesuré dans le sérum prélevé au moment de la revascularisation. Les valeurs maximales plasmatiques de cTnT et de CK ainsi que les concentrations de la hs-TnT, mesurées au moment de la revascularisation, ont été considérées pour cette étude. Les patients ont été répartis en fonction de leur FE mesurée à 4 mois par échocardiographie en 2 groupes : FE_r (FE≤40%) et FE_p (FE>40%).

Les femmes représentaient 23% de la cohorte et étaient plus âgées que les hommes (70 ans versus 57 ans, $p<0,001$). La comparaison de l'historique médical entre les deux sexes n'a pas montré de différences significatives. Néanmoins, les femmes tendent à avoir plus d'hypertension, de diabète et d'hypercholestérolémie. De plus, la proportion des patients ayant un antécédent d'IDM était plus élevée parmi les hommes (11% versus 5%, $p = 0,034$). 33% de femmes présentaient une IC à 4 mois (NYHA ≥ 2) contre seulement 16% d'hommes ($p<0,001$).

Les niveaux de cTnT et de CK étaient comparables entre les femmes et les hommes alors que le NT-proBNP était plus élevé chez les femmes. Quand cette comparaison a été réalisée séparément dans chaque groupe de FE, la différence au niveau du NT-proBNP n'a persisté que dans le groupe avec FE_p.

La capacité des biomarqueurs à prédire la FV a été étudiée par régression logistique à l'aide d'un modèle multivarié incluant les variables cliniques et démographiques connues

pour être associées avec l'IDM et le RVG (âge, sexe, IMC, diabète, hypertension, hypercholestérolémie, tabac, antécédent d'IDM, temps ischémique, type d'IDM et nombre de leucocytes). NT-proBNP et CK étaient des prédicteurs significatifs de la FV dans la cohorte entière (hommes et femmes ensemble). L'association de ces deux biomarqueurs a été observée uniquement chez les hommes alors que chez les femmes, seule la cTnT était significative. La hs-TnT, mesurée au moment de la revascularisation, n'était pas associée avec la dysfonction ventriculaire aussi bien chez tous les patients que chez les femmes et les hommes séparément. Nous avons également observé que le nombre de leucocytes était un prédicteur indépendant de la dysfonction ventriculaire uniquement chez les hommes, alors que le diabète était associé avec la dysfonction ventriculaire spécifiquement chez les femmes. L'interaction entre le sexe, les biomarqueurs cardiaques et la FV n'était pas significative. Néanmoins, l'association des leucocytes et du diabète avec la dysfonction ventriculaire était significativement influencée par le sexe ($p = 0,003$ et $5,7 \times 10^{-5}$ respectivement).

L'AIC a été utilisée pour évaluer la valeur additive des trois biomarqueurs au modèle clinique. L'AIC a été calculé pour le modèle clinique seul et après l'addition des trois biomarqueurs un par un ou simultanément. Dans toute la cohorte ainsi que dans le groupe des hommes, l'addition des trois biomarqueurs permettait la meilleure amélioration de prédiction. Chez les femmes, la meilleure prédiction a été observée par l'addition de la cTnT seule.

L'association des biomarqueurs cardiaques avec le risque de mortalité post-IDM a également été étudiée. Tout d'abord, les courbes Kaplan-Meier ont été établies afin de comparer la survie entre les hommes et les femmes pendant les 6 mois suivant un IDM. Cette analyse a montré une mortalité plus élevée parmi les femmes ($p = 0,01$). Un modèle des risques proportionnels de Cox a été utilisé afin d'analyser l'influence du sexe sur le risque de mortalité. Le sexe féminin était associé à une mortalité plus élevée (HR [IVC 95%] 0,34 [0,14–0,79], $p=0,012$), bien que cette association fut perdue après ajustement avec les mêmes variables que la régression logistique. L'ajustement avec l'âge seul a suffi pour masquer l'association entre le sexe et la mortalité. De façon similaire, l'association des trois biomarqueurs avec la mortalité, significative lors des analyses univariées, a été perdue après ajustement, et ce indépendamment du sexe.

En conclusion, cette étude a montré, dans notre cohorte nationale d'IDM, que les biomarqueurs cardiaques NT-proBNP, cTnT et CK ne sont pas équitablement associés avec la FV à 4 mois après un IDM chez les femmes et les hommes.

Sex-differences in biomarkers of outcome after acute myocardial infarction

Torkia Lalem MSc and Yvan Devaux PhD

Cardiovascular Research Unit, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg

Address correspondence to Yvan Devaux, Cardiovascular Research Unit, Luxembourg Health Institute, L1526 Luxembourg. Tel: +352 26970300. Fax: +352 26970396.

Email: yan.devaux@lih.lu

Short title: Sex-specific markers after acute myocardial infarction

Abstract

Background- Left ventricular (LV) remodeling after acute myocardial infarction (AMI) is an indicator of poor prognosis and heart failure. Cardiac stress markers are associated with LV remodeling, yet whether this association is influenced by sex has been poorly addressed. The present study aimed to evaluate the association between cardiac biomarkers and outcome after AMI in a sex-specific manner.

Methods- Six hundred and eight AMI patients from a national registry were included in this study. Reperfusion levels of N terminal-pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP), and peak levels of creatine kinase (CK) and cardiac troponin T (cTnT) were measured. The primary end-point was LV dysfunction as assessed by an ejection fraction (EF) $\leq 40\%$ at median 4 months. The secondary end-point was all-cause mortality at 6 months.

Results- CK and cTnT levels were comparable between women and men, and levels of NT-proBNP were higher in women than men (481.1pg/ml vs. 160.2pg/ml, $p < 0.001$). NT-proBNP, CK and leukocytes were significantly associated with LV dysfunction in men, even after adjustment with clinical and demographic variables. cTnT and diabetes were the only independent predictors of LV dysfunction in women. All-cause mortality at 6 months was higher in women than men ($p = 0.01$), partly because women were older at the time of AMI. None of the 3 biomarkers were independent predictors of mortality, in both sexes.

Conclusion- The association between cardiac biomarkers and LV dysfunction after AMI differs between women and men. These data strengthen the need for sex-specific biomarkers or for a use of cardiac biomarkers in a sex-specific manner.

Keywords- myocardial infarction; left ventricular function; sex; cardiac biomarkers

Introduction

Contrarily to major beliefs, cardiovascular disease (CVD) kills more women than men [1]. A majority of deaths from CVD is attributable to coronary heart disease among which acute myocardial infarction (AMI) plays a predominant role. The old concept of AMI as a typical man's disease has been challenged by the observation that the prevalence of AMI is only slightly higher in men than women [2]. Past studies showed several sex-differences in AMI risk factors and pathophysiology [3, 4]. In terms of outcome after AMI, data from different countries showed higher mortality rates in females than men [5, 6], which might be explained by comorbidities and older age of women. Left ventricular (LV) remodeling occurring after AMI is an indicator of poor prognosis, is associated with the development of heart failure (HF), and eventually leads to death [7]. Sex differences in LV remodeling have been observed in end-stage HF patients with ischemic etiology. LV remodeling results in a higher heart-body index and greater myocyte hypertrophy in men than female [8].

Women who present with acute coronary syndrome are more likely than men to be misdiagnosed [9], which could be explained by sex-specificities in biomarkers used to diagnose AMI. Cardiac troponin (cTn), the cornerstone biomarker of AMI diagnosis, and creatine kinase (CK), are secreted at lower levels in women compared with men [10]. While cTn and CK are generally moderately associated with outcome after AMI, natriuretic peptides including N terminal-pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP) show some potential as indicators of LV remodeling and HF development [11]. Lower levels of cTn and CK, and higher levels of BNP, in women compared to men were observed in acute coronary artery syndrome patients enrolled in the Treat Angina with Aggrastat and Determine Cost of Therapy with an Invasive or Conservative Strategy (TACTICS)-TIMI 18 study [12]. Furthermore, in the Get With The Guideline-Heart Failure Registry, women with HF had higher levels of BNP than men [13]. Despite the now well-known sex differences in levels of cTn, CK and BNP, the value of these

biomarkers to predict LV dysfunction after AMI has not been addressed in a sex-specific manner.

In the present study, we aimed to test whether cTn, CK and NT-proBNP are equally associated with LV dysfunction and mortality after AMI in women and men.

Materials and Methods

Patients

Six hundred and eight patients from a national AMI registry of 962 patients conducted at the Institut National de Chirurgie Cardiaque et de Cardiologie Interventionnelle and the Department of Cardiology of the Centre Hospitalier de Luxembourg between February 2006 and December 2012 were enrolled in this study. The protocol has been approved by the ethics committee and the national committee for data protection of Luxembourg and complies with Helsinki declaration. All patients signed a written informed consent.

All patients had an AMI and were treated with percutaneous coronary intervention. Of the 962 patients of the registry, 608 had an ischemic time (i.e. delay between chest pain onset and reperfusion) less than 12h and were included in the analysis. Baseline characteristics of the patients collected at baseline included demographic characteristics, biomarkers, medical history, and drug treatments before the onset of AMI (**Table 1**). ST-elevation myocardial infarction (STEMI) and non ST-elevation myocardial infarction (NSTEMI) were defined as previously [14].

Patients were followed up at median 4 months after AMI. The primary endpoint of the study was LV dysfunction at 4 months and the secondary endpoint was all cause mortality at 6 months. Echocardiographic examinations were performed at follow-up, and the ejection fraction (EF) was determined using the biplane Simpson's method. Patients were dichotomized in reduced EF (rEF, EF \leq 40%) and preserved EF (pEF, EF $>$ 40%) groups. HF was defined by clinical evidence according to New York Heart Association (NYHA) classification.

Biomarkers measurement

Venous blood samples were drawn at presentation and twice daily thereafter to determine plasma peak values of the cardiac markers CK and cTnT. cTnT was measured using

a fourth generation assay from Roche performed on the Cobas e601 system with a detection limit of 0.01 μ g/L and a concentration of 0.03 μ g/L reproducibly measured with a CV below 10%. CK activity was measured with a Roche IFCC-recommended method on a Cobas c501 instrument. Serum levels of NT-proBNP were measured at the time of reperfusion using the Elecsys 2010 analyzer that uses an electrochemiluminescence immunoassay (Roche Diagnostics). 1pg/ml was the detection limit of the assay. Plasma levels of high-sensitivity cardiac troponin T (hs-cTnT) were assessed at reperfusion in 315 patients (among which 23% were women) using the Roche high sensitivity assay performed on the Cobas e601 system with a detection limit of 0.003 μ g/L, a 99th-percentile cutoff point of 0.014 μ g/L, and a CV of <10% at 0.013 %g/L.

Statistical analysis

Two groups of data following a normal distribution were compared with the t-test and the Mann-Whitney test was used for not normally-distributed data. Two groups of categorical variables were compared using Fisher's exact test. The SigmaPlot v12.0 software was used for these analyses.

Primary end-point, LV dysfunction. The association between biomarkers and LV dysfunction was assessed using logistic regression. LV dysfunction (1 value in logistic regression) was determined by a 4-month EF \leq 40% (rEF) while patients with a 4-month EF >40% (pEF) were classified as having a preserved LV function (0 value in logistic regression). Missing data were imputed using 100-fold multiple imputation. Continuous variables were log₂-transformed and scaled to mean = 0 and standard deviation = 1. Both univariate and multivariable analyses were conducted. Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI) were calculated. To determine the incremental predictive value of biomarkers, we calculated the Akaike information criterion (AIC). Contrarily to the area under the curve, the AIC is

adapted to multivariable analyses by avoiding model overfitting due to the multiplication of explanatory variables. A lower AIC indicates a better model fit and an improvement of the predictive value. The likelihood ratio test was used to compare the AIC between models. These analyses were performed on the R version 3.3.1 statistical platform using the packages Hmisc, PredictABEL, lmtest and rms.

Secondary end-point, survival. Sex-differences in 6-month all-cause mortality were assessed using Kaplan-Meier survival curves and the logRank test. Cox proportional hazards were used to model the effect of sex, age and morbidities on 6-month all-cause mortality and to evaluate the ability of cardiac biomarkers to predict this endpoint. The SigmaPlot v12.0 software and the R version 3.3.1 statistical platform with the packages survival and survminer were used for these analyses. A p value < 0.05 was considered significant.

Results

Baseline characteristics of the patients

Of the Luxembourg AMI registry accounting 962 patients, we enrolled in this study 608 patients with an ischemic time less than 12 hours and for which follow-up data were available. Baseline characteristics of these patients are shown in **Table 1**. 138 (23%) patients were women. Women were older than men (median 70 vs 57 year-old, $p<0.001$). Comparison of the comorbidities between women and men did not reveal significant differences in the frequency of diabetes, hypertension, hypercholesterolemia and smoking habit. Nevertheless, men had more frequently a previous AMI than women (11% vs 5%, $p=0.034$). STEMI frequency was comparable between women and men (82% vs 79%, $p=0.473$). Prior to AMI, women were more often on diuretics than men (7% vs 2%, $p=0.009$). No other differences in terms of pre-admission medication was observed. At median 4-month follow-up, women had more often HF as attested by a NYHA classification ≥ 2 than men (33% vs 16%, $p<0.001$).

Sex differences in biomarker levels according to LV function

Peak levels of CK and cTnT and reperfusion levels of NT-proBNP were determined in 608 AMI patients. Women had comparable levels of CK and cTnT to men but had higher levels of NT-proBNP ($p<0.001$) (**Figure 1**). To highlight potential sex-specific relationships between biomarker levels and LV function, we compared their levels between women and men in the pEF and rEF groups separately. CK and cTnT levels were comparable between women and men in the pEF and rEF groups. NT-proBNP levels were higher in women than men, only in the pEF group (3-fold, $p<0.001$) (**Figure 1**).

Sex differences in the prediction of LV dysfunction after AMI

Logistic regression was used to evaluate the association between the levels of CK, cTnT and NT-proBNP, and LV dysfunction at median 4 months as assessed by an $EF \leq 40\%$. This

association was assessed in all patients and in women and men separately. In addition to biomarkers, the following clinical and demographic variables known or presumed to be associated with LV function were included in the analysis: age, BMI, sex, ischemic time, previous MI, diabetes, hypertension, hypercholesterolemia, MI type (STEMI vs. NSTEMI) and leucocytes count. In univariate analysis, the 3 biomarkers CK, cTnT and NT-proBNP were significant predictors of LV dysfunction in all patients independently of sex, as well as in men and women separately (**Figure 2**). In addition, age, diabetes, and leucocytes count were associated with LV dysfunction in all patients. The association between age, leucocytes counts and LV dysfunction lost significance in the women group, in which diabetes showed a strong association (OR [95% CI] 5.11 [2.09-12.53] (**Figure 2**).

After adjustment with clinical and demographic variables in multivariable analysis, NT-proBNP and cTnT remained significant predictors of LV dysfunction in all patients (**Figure 3A**). In women, NT-proBNP and CK lost significance and only cTnT remained significantly associated with LV dysfunction (OR [95% CI] 3.75 [1.25-11.24]) (**Figure 3B**). In men, NT-proBNP (OR [95% CI] 1.92[1.44-2.57]) and CK (OR [95% CI] 1.70 [1.01-2.87]) remained significantly associated with LV dysfunction (**Figure 3C**). Interestingly, diabetes remained significant only in women, whereas leucocytes count remained significant only in men (**Figure 3**). We also assessed the association between LV dysfunction and hs-cTnT, measured at reperfusion in 315 AMI patients. Univariate analysis showed a significant association in all patients, in men and women (**Supplemental Table S1**). This association lost significance in multivariable analyses including the aforementioned clinical and demographic variables (**Supplemental Figure S1**). These results show sex differences in the association between cardiac injury markers and LV dysfunction after AMI.

Since the clinical usefulness of post-AMI biomarkers relies on their ability to improve prognostication, we evaluated the incremental predictive value of NT-proBNP, cTnT and CK

to a clinical model including the demographic and clinical parameters included in multivariable analyses. We calculated the AIC of the clinical model, with and without biomarkers, and we compared models fit with the likelihood ratio test. As shown in **Table 2**, in all patients, each of the 3 biomarkers provided an incremental predictive value and the best improvement was obtained with a combination of the 3 (lowest AIC). The clinical model with the 3 biomarkers performed better than the clinical model with only NT-proBNP (AIC 564.2 vs 579.4, $p=6.8E-05$). In women, only cTnT provided a significant incremental predictive value. In men, the 3 biomarkers were significant and the best effect was obtained after addition of all of them. Indeed, addition of the 3 biomarkers to the clinical model resulted in a lower AIC as compared to a clinical model with NT-proBNP, which is the best single predictor in men (AIC 440.0 vs 447.5, $p=0.003$). Adding the interaction between each biomarker and sex in the models did not produce a significant effect, for any of the biomarkers (**Table 3**). Diabetes and leucocytes count showed sex-biased association with LV dysfunction which persisted after adjustment with cofounders. Interaction between sex and diabetes was significant ($p\text{ value} = 5.7 \times 10^{-5}$), showing that diabetes is associated with the risk of LV dysfunction only in women. Conversely, leucocytes are associated with the risk of LV dysfunction only in men, as attested by a significant interaction with sex ($p\text{ value} = 0.003$). These results highlight sex differences in the association between biomarkers and LV dysfunction and support the potential of peak values of cTnT to improve the prediction of LV dysfunction in women while NT-proBNP might be more useful in men.

Sex differences in the prediction of all-cause mortality after AMI

Six-month mortality rate was 3.6%. This rate was higher in women than men (7.2% vs 2.5%, $p=0.016$). Kaplan-Meier curves confirmed that women had a lower survival than men ($p=0.01$) (**Figure 4A**).

Using Cox proportional hazards, we observed that sex was a significant predictor of mortality (hazard ratio (HR) [95% CI] 0.34 [0.14 – 0.79], $p=0.012$). However, this significance was lost after adjustment for demographic and clinical variables (HR) [95% CI] 0.53 [0.21 – 1.29], $p=0.16$). Adjustment for age only was sufficient to lose the significance of the association between sex and mortality (HR) [95% CI] 0.58 [0.22 – 1.35], $p=0.19$).

The ability of the 3 biomarkers to predict 6-month mortality was then addressed using Cox proportional hazards. In univariate analysis (**Figure 4B**), all 3 biomarkers predicted mortality in all patients and men. In women, only CK and cTnT were significantly associated with mortality. These associations lost significance after adjustment with the same set of clinical and demographic variables as for the logistic regression analysis, independently of sex.

Discussion

Several observations regarding the relationships between sex, cardiac biomarkers and outcome after AMI have emerged from the present study. First, while the peak levels of myocyte necrosis biomarkers, cTnT and CK, were comparable between women and men after an AMI, the levels of the cardiac stress marker NT-proBNP measured at the time of reperfusion were higher in women. Second, the ability of these biomarkers to predict LV function at 4 months after AMI appeared to be influenced by sex. Indeed, while NT-proBNP showed an association with LV function only in men, cTnT was the only biomarker predicting LV dysfunction in women. Lastly, these biomarkers did not show strong associations with 6-month mortality, independently of sex.

Women with MI are known to be older and present multiple cardiovascular risk factors, hypertension and diabetes mellitus being the most prevalent [4, 15]. In our study, despite that women were older than men, we observed only un-significant trends toward higher prevalence of hypertension, diabetes and hypercholesterolemia among women. This lack of significance might be assigned to the relatively lower number of women in the cohort. Interestingly, diabetes predicted LV dysfunction specifically in women. It has previously been shown that women with diabetes mellitus and coronary heart disease have a worse prognosis than their men counterpart, with higher risk of mortality and heart failure [16-18]. Furthermore, in a study including a small group of patients with metabolic syndrome, it has been shown that metabolic syndrome altered the cardiac morphology and function more in women than men [19]. Even though no difference was observed in the leukocytes between men and women (**Table 1**), the association of this variable with LV function was observed specifically in men. Leukocytes count has been previously shown to be associated with HF specifically in men from the general population [20].

In our population of AMI patients, comparison of biomarker levels between men and women showed higher levels of NT-proBNP in women, consistently with past reports, some of them also including healthy volunteers [21, 22]. Possible explanations are the lower hemoglobin levels in women which might be related to myocardial ischemia [21], and the stimulatory effect of estrogens on natriuretic peptides [22]. Furthermore, the association of NT-proBNP with age and obesity was found to be more pronounced among women in a Dutch general population study [23]. Abdominal obesity affected more importantly NT-proBNP levels in women. In addition, this effect was more pronounced in post-menopausal women, which could result in a higher cardiovascular risk. Women with HF also have higher levels of BNP than their men counterparts [13]. The clinical use of natriuretic peptides for prognostication after AMI remains an open debate, and whether a biomarker-guided therapy might be more beneficial in women or men in this context is unknown. Several studies addressed the ability of the natriuretic peptides to predict LV remodeling after MI [11, 24-27]. Nevertheless, most of these studies included less than 100 patients and none of them were conducted in a sex-specific manner. We found in our cohort that NT-proBNP, measured at reperfusion, was an independent predictor of LV dysfunction after AMI. Furthermore, we report for the first time that NT-proBNP may be more appropriate to predict LV dysfunction after AMI in men than in women. Interestingly, NT-proBNP provided an incremental predictive value only in men. This finding is important considering the potential use of NT-proBNP for prognostication after AMI.

Troponins and CK were reported to be expressed at lower levels in women with coronary disease compared to men [10] [28]. In our cohort, we did not observe significant sex-disparities in peak levels of cTnT and CK. Previous studies revealed associations between CK and cTn and LV function after AMI [29-31]. Here again, none of these studies addressed sex-differences in the predictive value of these markers. We observed that CK was associated with LV function only in men while cTnT was associated with LV function only in women. In a

large population study, the value of cTnI to predict cardiovascular death was stronger in women than men [32]. This predictive value could be attributed to an ability of cTnI to predict AMI rather than HF. As LV remodeling is one of the main outcomes of AMI, the stronger predictive value of cTnI in women could partly reflect LV remodeling. Furthermore, TACTICS-TIMI 18 study showed that women with positive troponins were more likely than men to have recurrent MI [12].

In our cohort, reperfusion levels of hs-cTnT were not associated with LV dysfunction. Recently, the prognostic value of hs-cTnT was addressed in a Swedish AMI cohort including 20,600 patients [33], although its ability to predict LV dysfunction was not reported. In this cohort, hs-cTnT improved the prediction of major cardiovascular events (MACE) independently of the severity of LV dysfunction. Patients with high levels of hs-cTnT were at higher risk of MACE, especially cardiovascular mortality and HF. However, this association was not addressed in a sex-specific fashion. We observed in our cohort a higher 6-month all-cause mortality rate among women; although this difference was lost after adjustment with age and comorbidities. The influence of sex on the prognosis of AMI patients is not entirely clear. Our results are consistent with previous studies showing that, after adjustment with confounding factors, sex is no longer a significant predictor of mortality [5, 6]. We also observed that adjustment with age was sufficient to induce a loss of significance, suggesting that older age in women was the main responsible factor for higher mortality in women. In another study, a sub-group of women and men with MI matched for age and comorbidities showed a comparable 5-year mortality, albeit the higher 1-year mortality rate in women persisted [15]. Contrarily, female-sex was found to be a protective factor against long-term mortality (20 years), after adjustment with baseline characteristics [34]. These apparently conflicting findings could be explained by the use of different populations with regard to age, type of MI, time of censorship and adjustment with confounding factors.

Our study is limited by a low number of women, especially in the reduced EF group. Thus, the sex-disparities in the association between cardiac markers and prognosis after AMI reported here need to be interpreted with caution. In addition, the predictive value of cardiac markers was assessed only at one time point, reperfusion values for NT-proBNP and hs-cTnT, and peak values for cTnT and CK. Baseline values of cTnI were found to be mildly associated with LV function, and patients for whom cTnI was detectable at 1 month and 3 months were at high risk of LV remodeling [35]. NT-proBNP performed best to predict LV remodeling when measured between 73-120 hours after AMI [36]. Hence, further properly-sized studies need to address the sex-specific ability of serial measurements of cardiac markers to predict outcome after AMI. In addition, using CK instead of its cardiac specific fraction MB might weaken the results obtained for this marker. Another limitation of our study is the high proportion of STEMI patients (80%) which makes our study mostly on STEMI. As the frequency of NSTEMI compared to STEMI is higher in women [37], it would be interesting to validate the obtained results in cohorts with higher proportion of NSTEMI patients; especially among women. Finally, functional explanations of the sex-specific associations between cardiac markers and LV function need to be provided.

Conclusion

We addressed the relationship between sex and the ability of cardiac biomarkers to predict LV function after AMI. The gold-standard predictor of outcome after AMI, NT-proBNP, was not associated with LV function in women, suggesting a clinical use in men only. On the other hand, our results support further testing of cTnT in women. Although our findings need to be validated in larger cohorts, they stress the need for a sex-specific use of cardiac markers to predict LV function after AMI.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr Daniel Wagner, head of cardiology at Luxembourg Hospital (LU) and Lausanne Hospital (CH) who initiated the patient cohort used in this study. We thank Loredana Jacobs for sample collection, and Christelle Nicolas and Bernadette Leners for expert technical assistance.

Funding

This work was supported by the Ministry of Higher Education and Research of Luxembourg and the Society for Research on Cardiovascular Diseases.

Disclosure

The authors declare no conflict of interest.

Supplementary materials

Table S1. Univariate association of hs-cTnT with LV dysfunction.

Figure S1. Multivariable analysis of the association of hs-cTnT with LV dysfunction.

References

1. Townsend, N., L. Wilson, P. Bhatnagar, K. Wickramasinghe, M. Rayner, and M. Nichols. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J* 2016; 37: 3232-3245.
2. Benjamin, E.J., M.J. Blaha, S.E. Chiuve, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2017; 135: e146-e603.
3. Lansky, A.J., V.G. Ng, A. Maehara, et al. Gender and the extent of coronary atherosclerosis, plaque composition, and clinical outcomes in acute coronary syndromes. *JACC Cardiovasc Imaging* 2012; 5: S62-72.
4. Lam, C.S., M. McEntegart, B. Claggett, et al. Sex differences in clinical characteristics and outcomes after myocardial infarction: insights from the Valsartan in Acute Myocardial Infarction Trial (VALIANT). *Eur J Heart Fail* 2015; 17: 301-12.
5. Valero-Masa, M.J., J. Velasquez-Rodriguez, F. Diez-Delhoyo, et al. Sex differences in acute myocardial infarction: Is it only the age? *Int J Cardiol* 2017; 231: 36-41.
6. Berg, J., L. Bjorck, S. Nielsen, G. Lappas, and A. Rosengren. Sex differences in survival after myocardial infarction in Sweden, 1987-2010. *Heart* 2017; 103: 1625-1630.
7. Galli, A. and F. Lombardi. Postinfarct Left Ventricular Remodelling: A Prevailing Cause of Heart Failure. *Cardiol Res Pract* 2016; 2016: 2579832.
8. Crabbe, D.L., K. Dipla, S. Ambati, et al. Gender differences in post-infarction hypertrophy in end-stage failing hearts. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 300-6.
9. Pope, J.H., T.P. Aufderheide, R. Ruthazer, et al. Missed diagnoses of acute cardiac ischemia in the emergency department. *N Engl J Med* 2000; 342: 1163-70.
10. Daniels, L.B. and A.S. Maisel. Cardiovascular biomarkers and sex: the case for women. *Nat Rev Cardiol* 2015; 12: 588-96.
11. Fertin, M., E. Dubois, A. Belliard, P. Amouyel, F. Pinet, and C. Bauters. Usefulness of circulating biomarkers for the prediction of left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2012; 110: 277-83.
12. Wiviott, S.D., C.P. Cannon, D.A. Morrow, et al. Differential expression of cardiac biomarkers by gender in patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction: a TACTICS-TIMI 18 (Treat Angina with Aggrastat and determine Cost of Therapy with an Invasive or Conservative Strategy-Thrombolysis In Myocardial Infarction 18) substudy. *Circulation* 2004; 109: 580-6.
13. Hsieh, E.M., M.V. Grau-Sepulveda, A.F. Hernandez, et al. Relationship between sex, ejection fraction, and B-type natriuretic peptide levels in patients hospitalized with heart failure and associations with in-hospital outcomes: findings from the Get With The Guideline-Heart Failure Registry. *Am Heart J* 2013; 166: 1063-1071 e3.
14. Boileau, A., T. Lalem, M. Vausort, L. Zhang, and Y. Devaux. A 3-gene panel improves the prediction of left ventricular dysfunction after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2018; 254: 28-35.
15. Ubrich, R., P. Barthel, B. Haller, et al. Sex differences in long-term mortality among acute myocardial infarction patients: Results from the ISAR-RISK and ART studies. *PLoS One* 2017; 12: e0186783.
16. Lundberg, V., B. Stegmayr, K. Asplund, M. Eliasson, and F. Huhtasaari. Diabetes as a risk factor for myocardial infarction: population and gender perspectives. *J Intern Med* 1997; 241: 485-92.
17. Gustafsson, I., B. Brendorp, M. Seibaek, et al. Influence of diabetes and diabetes-gender interaction on the risk of death in patients hospitalized with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 771-7.

18. Juutilainen, A., S. Kortelainen, S. Lehto, T. Ronnema, K. Pyorala, and M. Laakso. Gender difference in the impact of type 2 diabetes on coronary heart disease risk. *Diabetes Care* 2004; 27: 2898-904.
19. Nicolini, E., G. Martegani, A.M. Maresca, et al. Left ventricular remodeling in patients with metabolic syndrome: influence of gender. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013; 23: 771-5.
20. Pfister, R., S.J. Sharp, R. Luben, N.J. Wareham, and K.T. Khaw. Differential white blood cell count and incident heart failure in men and women in the EPIC-Norfolk study. *Eur Heart J* 2012; 33: 523-30.
21. Hamada, M., Y. Shigematsu, M. Takezaki, S. Ikeda, and A. Ogimoto. Plasma levels of atrial and brain natriuretic peptides in apparently healthy subjects: Effects of sex, age, and hemoglobin concentration. *Int J Cardiol* 2017; 228: 599-604.
22. Lam, C.S., S. Cheng, K. Choong, et al. Influence of sex and hormone status on circulating natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol* 2011; 58: 618-26.
23. Suthahar, N., W.C. Meijers, J.E. Ho, et al. Sex-specific associations of obesity and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels in the general population. *Eur J Heart Fail* 2018.
24. Kelly, D., S.Q. Khan, M. Thompson, 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: 2116-24.
25. Haeck, J.D., N.J. Verouden, W.J. Kuijt, 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: 1065-9.
26. Hendriks, T., M.H.T. Hartman, P.J.J. Vlaar, et al. Predictors of left ventricular remodeling after ST-elevation myocardial infarction. *Int J Cardiovasc Imaging* 2017; 33: 1415-1423.
27. Reinstadler, S.J., H.J. Feistritzer, M. Reindl, et al. Combined biomarker testing for the prediction of left ventricular remodeling in ST-elevation myocardial infarction. *Open Heart* 2016; 3: e000485.
28. Apple, F.S., R. Ler, and M.M. Murakami. Determination of 19 cardiac troponin I and T assay 99th percentile values from a common presumably healthy population. *Clin Chem* 2012; 58: 1574-81.
29. Dohi, T., A. Maehara, S.J. Brener, et al. Utility of peak creatine kinase-MB measurements in predicting myocardial infarct size, left ventricular dysfunction, and outcome after first anterior wall acute myocardial infarction (from the INFUSE-AMI trial). *Am J Cardiol* 2015; 115: 563-70.
30. Hartman, M.H.T., R.N. Eppinga, P.J.J. Vlaar, et al. The contemporary value of peak creatine kinase-MB after ST-segment elevation myocardial infarction above other clinical and angiographic characteristics in predicting infarct size, left ventricular ejection fraction, and mortality. *Clin Cardiol* 2017; 40: 322-328.
31. Hall, T.S., J. Hallen, M.W. Krucoff, et al. Cardiac troponin I for prediction of clinical outcomes and cardiac function through 3-month follow-up after primary percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation myocardial infarction. *Am Heart J* 2015; 169: 257-265.e1.
32. Lyngbakken, M.N., H. Rosjo, O.L. Holmen, et al. Gender, High-Sensitivity Troponin I, and the Risk of Cardiovascular Events (from the Nord-Trondelag Health Study). *Am J Cardiol* 2016; 118: 816-821.

33. Eggers, K.M., T. Jernberg, and B. Lindahl. High-sensitivity cardiac troponin T, left ventricular function, and outcome in non-ST elevation acute coronary syndrome. *Am Heart J* 2018; 197: 70-76.
34. Nauta, S.T., J.W. Deckers, R.T. van Domburg, and K.M. Akkerhuis. Sex-related trends in mortality in hospitalized men and women after myocardial infarction between 1985 and 2008: equal benefit for women and men. *Circulation* 2012; 126: 2184-9.
35. Fertin, M., B. Hennache, M. Hamon, et al. Usefulness of serial assessment of B-type natriuretic peptide, troponin I, and C-reactive protein to predict left ventricular remodeling after acute myocardial infarction (from the REVE-2 study). *Am J Cardiol* 2010; 106: 1410-6.
36. Talwar, S., I.B. Squire, P.F. Downie, et al. Profile of plasma N-terminal proBNP following acute myocardial infarction; correlation with left ventricular systolic dysfunction. *Eur Heart J* 2000; 21: 1514-21.
37. Graham, G. Acute Coronary Syndromes in Women: Recent Treatment Trends and Outcomes. *Clin Med Insights Cardiol* 2016; 10: 1-10.

Tables

Table 1. Baseline characteristics

	All (N=608)	Women (N=138, 23%)	Men (N=470, 77%)	P value (Women vs Men)
Age, median (range), y	60 (30-91)	70 (33-91)	57 (30-88)	<0.001
Premenopausal women (age ≤ 50y), n (%)	17 (2.8)	17 (12.3)	-	-
Body mass index, median (range)	27 (18-51)	26 (18-47)	27 (18-51)	0.003
White blood cells, median (range), ×10⁹/L	10.75 (1.11-7250)	10.27 (4.96-7250)	10.92 (1.11-6350)	0.357
Biomarkers, peak values, median (range)				
CK, U/L	1497.6 (34-13038)	1353 (57-9233)	1639 (34-13038)	0.246
cTnT, µg/L	3.9 (0.01-31.64)	3.73 (0.01-26.93)	3.96 (0.03-31.64)	0.939
NT-proBNP at reperfusion, median (range), pg/mL	205.2 (5-35000)	481.1 (45.26-15679)	160.2 (5-35000)	<0.001
Ischemic time, median (range), hour	3.12 (0.6-12)	3.12 (0.6-12)	3.36 (0.8-12)	0.46
4-month EF, median (range), %	50 (15-89)	50 (20-86)	50 (15-89)	0.903
Medical history, n (%)				
Previous MI	59 (10)	7 (5)	52 (11)	0.034
Diabetes mellitus	126 (21)	32 (23)	94 (20)	0.406
Hypertension	279 (46)	69 (50)	210 (45)	0.286
Hypercholesterolemia	255 (42)	61 (44)	194 (41)	0.557
Smoking	273 (45)	54 (39)	219 (47)	0.068
MI type (STEMI), n (%)	483 (79)	113 (82)	370 (79)	0.473
4-month NYHA (≥II) classification, n (%)	120 (20)	45 (33)	75 (16)	<0.001
rEF, n (%)	120 (19)	28 (20)	92 (19)	0.92
Pre-admission medication, n (%)				
Statins	113 (19)	25 (18)	88 (18)	1
Aspirin	120 (20)	27 (20)	93 (20)	1
β-Blockers	124 (20)	35 (25)	89 (19)	0.117

Angiotensin inhibitors	70 (12)	16 (12)	54 (11)	1
ACE inhibitors	70 (12)	19 (14)	51 (11)	0.363
Clopidogrel	40 (7)	9 (7)	31 (7)	1
Nitrates	25 (4)	7 (5)	18 (4)	0.474
Calcium antagonists	17 (3)	3 (2)	14 (3)	0.774
Diuretics	18 (3)	9 (7)	9 (2)	0.009

CK, creatine kinase; cTnT, cardiac troponin T; NT-proBNP, N-terminal pro-brain natriuretic peptide; EF, ejection fraction; MI, myocardial infarction; STEMI, ST-elevation myocardial infarction; NYHA, New York Heart Association; rEF, reduced EF; CK and cTnT concentrations are peak levels, NT-proBNP concentration and white blood cell count were determined at the time of reperfusion.

Table 2. Incremental value of biomarkers to predict LV dysfunction

Model	All patients		Women		Men	
	AIC	Likelihood ratio test (p value vs clinical)	AIC	Likelihood ratio test (p value vs clinical)	AIC	Likelihood ratio test (p value vs clinical)
Clinical	600.6		140.1		467.1	
Clinical + NT-proBNP	579.4	1.4x10⁻⁶	140.1	0.164	447.5	3.4 x10⁻⁶
Clinical + CK	590.1	3.8x10⁻⁴	138.8	0.071	459.3	0.002
Clinical + cTnT	583.8	1.5 x10⁻⁵	129.6	4.3 x10⁻⁴	459.5	0.002
Clinical + NT-proBNP + CK + cTnT	564.2	3.2 x10⁻⁹	132.3	0.003	440.0	3.1 x10⁻⁷

AIC, Akaike information criterion, CK, creatine kinase; cTnT, cardiac troponin T; NT-proBNP, N-terminal pro brain type natriuretic peptide. The clinical model includes age, sex, BMI, previous MI, diabetes, hypertension, hypercholesterolemia, smoking, MI type (STEMI vs NSTEMI), ischemic time, leucocytes, NT-proBNP, CK and cTnT.

Table 3. Interaction test between biomarkers and sex

Biomarker	Likelihood ratio test (clinical + variable vs. clinical + variable * sex)
NT-proBNP	0.701
CK	0.654
cTnT	0.073
Diabetes	5.7×10^{-5}
Leukocytes count	0.003

CK, creatine kinase; cTnT, cardiac troponin T; NT-proBNP, N-terminal pro-brain natriuretic peptide

Figure legends

Figure 1. Biomarker levels according to sex and LV function. Peak levels of cTnT and CK, and levels of NT-proBNP at reperfusion were determined in 608 AMI patients. Patients were classified according to 4-month EF as having rEF (EF \leq 40%) or pEF (EF $>$ 40%). Boxplots show the comparisons of CK (A), cTnT (B) and NT-proBNP (C) levels between men and women independently of their EF, or between men and women within the rEF and pEF groups separately. CK, creatine kinase; cTnT, cardiac troponin T; NT-proBNP, N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide; pEF: preserved ejection fraction; rEF, reduced ejection fraction.

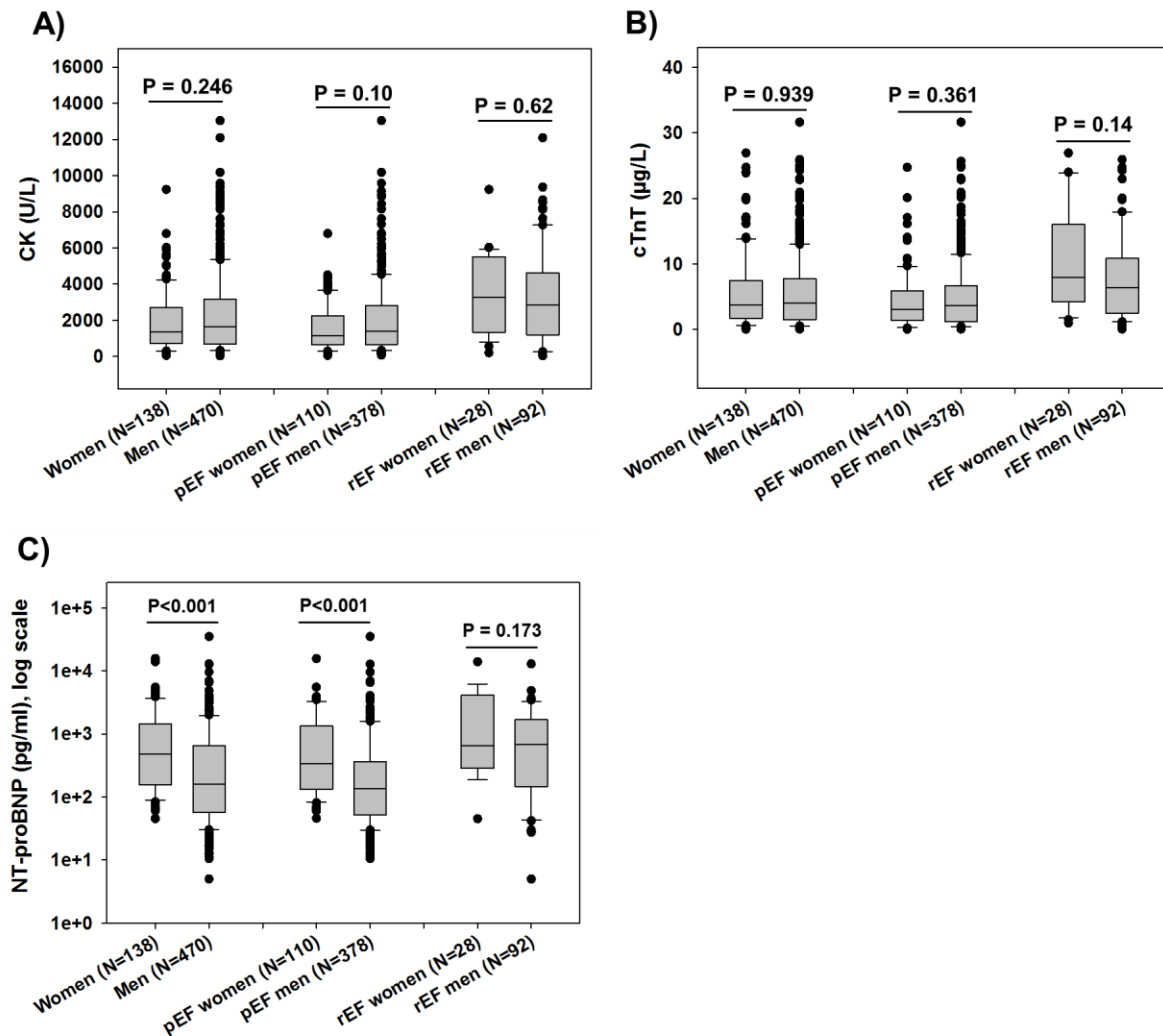
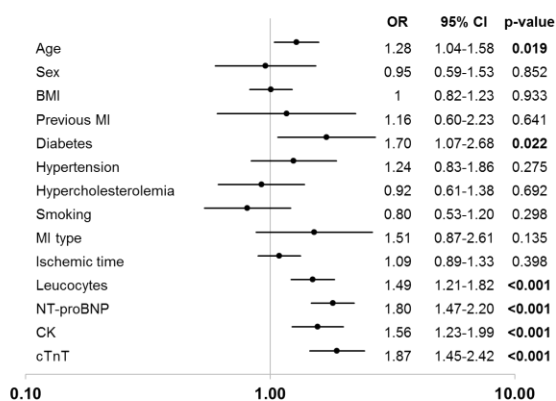
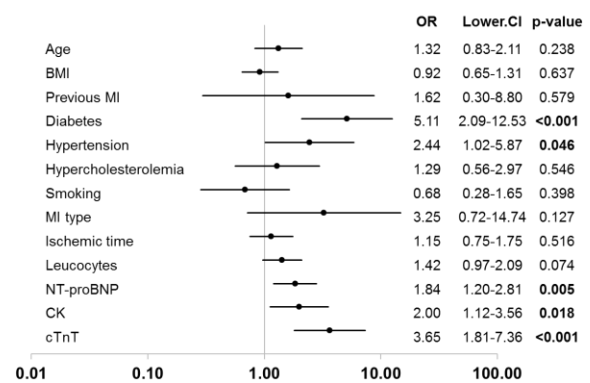


Figure 2. Univariate predictors of LV dysfunction. The association between demographic and clinical parameters of patients, and levels of cTnT, CK and NT-proBNP, with LV dysfunction at 4 months ($EF \leq 40\%$) was assessed with univariate logistic regression in all patients (A), and in women (B) and men (C) separately. Forest plots display odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI). X axis is in log scale. BMI, body mass index; CK, creatine kinase; cTnT, cardiac troponin T; MI, myocardial infarction; NT-proBNP, N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide. Age (year), BMI (kg/m^2), ischemic time (day fraction), NT-proBNP (pg/mL), cTnT ($\mu\text{g}/\text{L}$), CK (U/L). 1 value in the logistic regression was assigned to rEF, male sex and the presence of comorbidity (previous MI, diabetes, hypertension, hypercholesterolemia, smoking and STEMI).

A. All patients



B. Women



C. Men

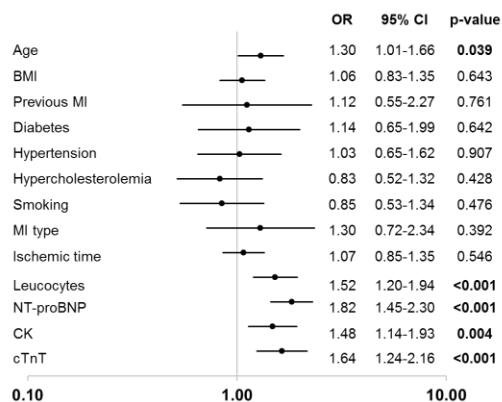
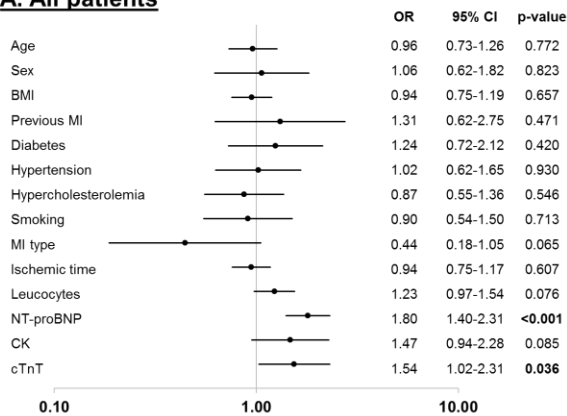
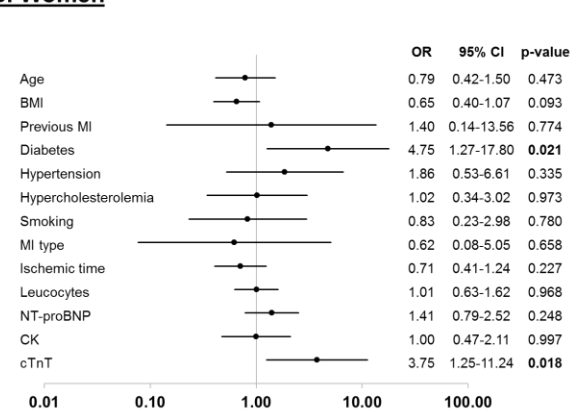


Figure 3. Multivariable predictors of LV dysfunction. Logistic regression was used to evaluate the association between cTnT, CK and NT-proBNP and the demographic and clinical parameters of patients with LV dysfunction at 4 months (EF≤40%), in all patients (A), and in women (B) and men separately (C). Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI) are shown. X axis is in log scale. BMI, body mass index; CK, creatine kinase; cTnT, cardiac troponin T; MI, myocardial infarction; NT-proBNP, N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide. Age (year), BMI (kg/m²), ischemic time (day fraction), NT-proBNP (pg/mL), cTnT (μg/L), CK (U/L). 1 value in the logistic regression was assigned to rEF, male sex and the presence of comorbidity (previous MI, diabetes, hypertension, hypercholesterolemia, smoking and STEMI).

A. All patients



B. Women



C. Men

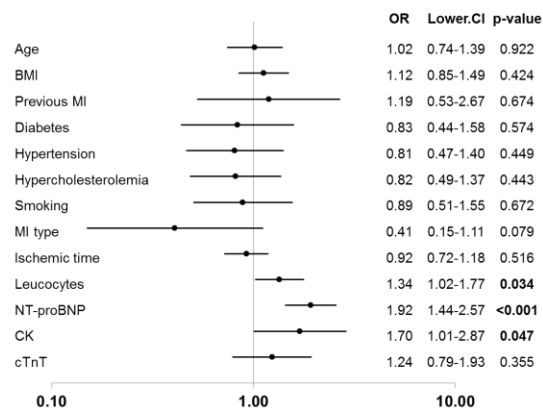
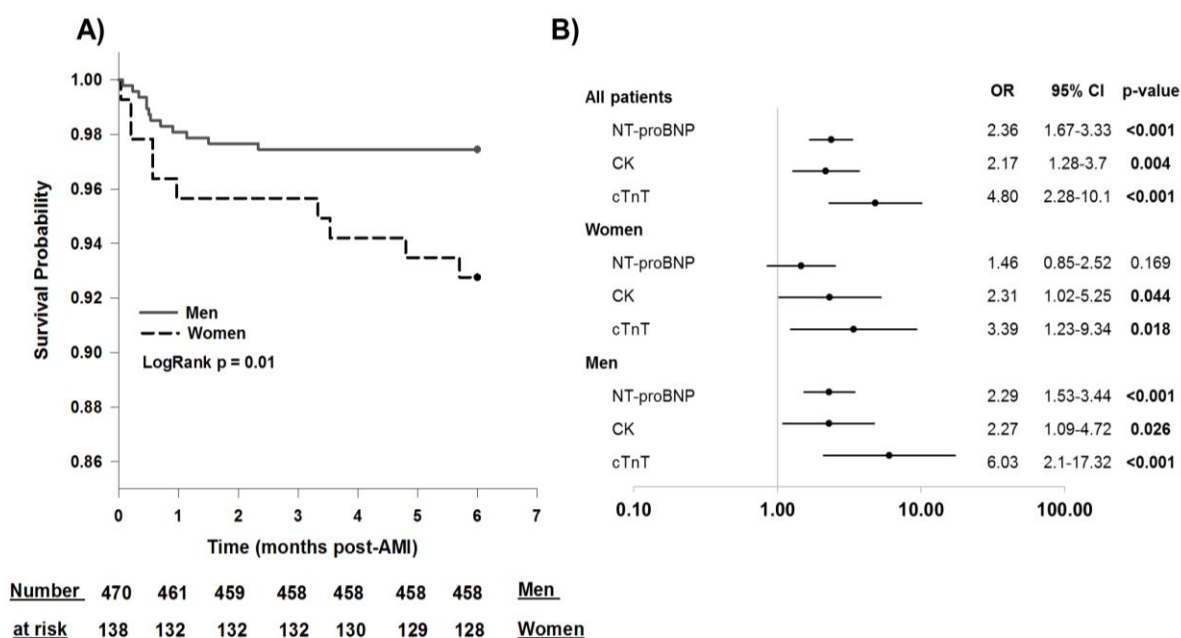


Figure 4. Survival analyses. (A) All-cause mortality during the 6 months following AMI was compared between women (n=138) and men (n=470) using Kaplan-Meier survival curves with logRank test. (B) The ability of NT-proBNP, CK and cTnT to predict 6-month mortality was evaluated using univariate cox proportional hazards, in all patients and distinctly in men and women. Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI) are shown. X axis is in log scale. AMI, acute myocardial infarction; CK, creatine kinase; cTnT, cardiac troponin T; NT-proBNP, N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide. NT-proBNP (pg/mL), cTnT ($\mu\text{g/L}$), CK (U/L).



Etude N°3 : Identification du gène CDKN1C comme un biomarqueur de la fonction ventriculaire après un IDM spécifiquement chez les femmes

De multiples études à travers le monde ont montré de nombreuses différences entre les femmes et les hommes au niveau de la pathophysiologie, du diagnostic et de l'évolution de l'IDM [40, 60, 79]. Malgré ces disparités, les hommes et les femmes sont cependant pris en charge et traités globalement de la même façon. Des études principalement *in vivo* [134] mais également sur des biopsies cardiaques humaines ont montré que le processus du RVG n'est pas le même chez les hommes et les femmes après un IDM [9]. Mettre en évidence des biomarqueurs capables de prédire le RVG de manière spécifique à chaque sexe, représenterait un pas vers une médecine plus personnalisée respectant les différences hommes-femmes.

Dans une étude préalable pratiquée au laboratoire, notre équipe a mis en évidence l'association entre le lncARN KCNQ1OT1 et la FV après un IDM [254]. Ce lncARN appartient à un cluster de gènes soumis à l'empreinte génomique [265]. Nous avons émis l'hypothèse que non seulement KCNQ1OT1 mais également les autres gènes du cluster seraient associés avec le RVG. Nous nous sommes particulièrement intéressés à CDKN1C (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1C) qui code pour un inhibiteur du cycle cellulaire. CDKN1C est impliqué dans le développement de nombreux cancers spécifiques aux femmes [266-268]. De plus, des mutations au niveau de ce gène sont associées avec le risque d'athérosclérose et d'IDM [269] et la protéine produite joue un rôle dans le processus d'athérogenèse [270, 271]. Des expériences *in vitro* ont montré que CDKN1C était régulé par les estrogènes grâce à un mécanisme impliquant KCNQ1OT1 [272]. Ces données suggèrent que CDKN1C pourrait être associé avec le RVG post-IDM, spécifiquement chez les femmes.

Afin de vérifier cette possibilité, l'expression de CDKN1C a été mesurée par qPCR dans le sang total de 447 patients de la cohorte LUCKY. En fonction de la FE, évaluée à 4 mois par échocardiographie, les patients ont été classés en 3 groupes : FE_r (FE<40%), FE intermédiaire (FE_{inter}, FE = 40-49%), FE_p (FE>50%). Cette classification en 3 groupes selon les recommandations de la Société Européenne de Cardiologie [138] a été préférée à la classification en 2 groupes utilisée dans les études précédentes.

L'association de CDKN1C avec la dysfonction ventriculaire a également été testée dans une cohorte indépendante incluant 294 patients de l'étude allemande LIFE-Heart. Le sang de ces patients a été récupéré quelques heures après la revascularisation (moyenne 20 ± 8 h). Le suivi des patients a eu lieu 3 mois plus tard par échocardiographie. Les patients ont été classés en fonction de leur FE en deux groupes : FEr ($FE\leq 50\%$) et FEp ($FE>50\%$). L'expression de CDKN1C dans cette cohorte a été évaluée par puces à ARN (puce à ARN), contrairement à la cohorte LUCKY où cette expression a été mesurée par qPCR.

L'âge médian de la cohorte LUCKY était de 61 ans, dont 10% étaient des patients avec une FEr, 31% avaient une FEinter et 59% avaient une FEp. Les femmes représentaient 25% des patients et étaient plus âgées que les hommes (70 ans contre 58, $p<0,001$). De plus, il y avait deux fois plus d'hommes que de femmes avec un antécédent d'IDM (13% versus 6%, $p=0,03$).

Dans la cohorte LUCKY, la comparaison de l'expression de CDKN1C entre les trois groupes de FE a montré un niveau inférieur dans le groupe de FEr par rapport à celui avec une FEp ($p=0,01$). Quand cette comparaison a été effectuée séparément chez les femmes et les hommes, cette diminution dans le groupe FEr persistait uniquement chez les femmes ($p=0,01$ versus FEinter, $p<0,001$ versus FEp).

La régression ordinale a été utilisée pour évaluer l'association de CDKN1C avec la FV déterminée par la FE à 4 mois. Les mêmes paramètres cliniques et démographiques que les deux études précédentes ont été inclus dans ces analyses. Dans la cohorte entière (hommes et femmes), une association significative a été observée avec l'antécédent d'IDM, et les biomarqueurs cardiaques CK et NT-proBNP alors que CDKN1C était proche de la significativité ($p=0,054$). Chez les hommes, CK et NT-proBNP étaient les seuls prédicteurs de la FV alors qu'aucune association n'a été observée avec CDKN1C. Chez les femmes, CDKN1C était négativement associé avec la FV (OR [95% IVC] 0,44 [0,23-0,82]) et le prédicteur le plus puissant de la dysfonction ventriculaire dans ce groupe ($p=0,009$). L'antécédent d'IDM et l'hypertension étaient également significativement associés avec la FV chez les femmes.

La valeur prédictive ajoutée de CDKN1C a ensuite été analysée. L'AIC a été calculé pour le modèle clinique seul et après addition de CDKN1C. Une diminution significative ($p = 0,006$) a été observée pour l'AIC chez les femmes mais pas chez les hommes, ce qui confirme que CDKN1C avait une valeur ajoutée spécifiquement chez les femmes. La diminution de l'AIC chez tous les patients était proche de la significativité ($p = 0,053$). Il est intéressant de préciser que le test d'interaction entre CDKN1C et le sexe s'est révélé significatif (Likelihood ratio test $p = 0,005$).

La validation interne par bootstrap a été conduite afin de déterminer lequel parmi les biomarqueurs cardiaques (CK, NT-proBNP ou cTnT) ou CDKN1C était capable de générer le modèle prédictif le plus performant. Dans les 150 itérations réalisées, l'addition de CK et de CDKN1C a généré le modèle le plus prédictif chez tous les patients. Chez les hommes, NT-proBNP et CK étaient suffisants pour générer le modèle le plus prédictif alors que chez les femmes, les modèles combinant CDKN1C avec CK ou cTnT se sont révélés être les plus prédictifs.

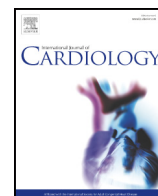
Ces résultats ont été indépendamment validés dans les puces à ARN effectuées à partir de l'ARN issu du sang total de 294 patients de la cohorte 2 de l'étude LIFE-Heart. Les caractéristiques de cette cohorte sont comparables à celles de la cohorte LUCKY avec un âge médian de 60 ans et 28% de femmes. L'association de CDKN1C avec la FV a été analysée dans un modèle multivarié par régression logistique. CDKN1C était associé avec la FV chez tous les patients, chez les femmes mais pas les hommes, confirmant les résultats obtenus dans la cohorte LUCKY.

En conclusion, l'association spécifiquement féminine de CDKN1C avec la FV a été mise en évidence dans 2 cohortes indépendantes, grâce à l'utilisation de plusieurs méthodes statistiques complémentaires. Les résultats obtenus suggèrent que CDKN1C pourrait constituer un futur biomarqueur de la FV post-IDM chez la femme, à condition qu'il soit validé dans d'autres cohortes incluant un grand nombre de patients.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Cardiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijcard

Cyclin dependent kinase inhibitor 1 C is a female-specific marker of left ventricular function after acute myocardial infarction☆

Torkia Lalem^a, Lu Zhang^a, Markus Scholz^{b,e}, Ralph Burkhardt^{d,e}, Victoria Sacchetti^a, Andrej Teren^{c,e}, Joachim Thiery^{d,e}, Yvan Devaux^{a,*}, On behalf of the Cardioline™ network (www.cardiolinc.org)

^a Cardiovascular Research Unit, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg

^b Institute for Medical Informatics, Statistics and Epidemiology, University of Leipzig, Germany

^c Department of Cardiology/Internal Medicine, Heart Center, University of Leipzig, Germany

^d Institute of Laboratory Medicine, Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, University Hospital Leipzig, Germany

^e LIFE – Leipzig Research Center for Civilization Diseases, University of Leipzig, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 April 2018

Received in revised form 3 July 2018

Accepted 6 July 2018

Available online xxx

Keywords:

Myocardial infarction
Left ventricular function
Gender
Biomarkers
Gene expression

ABSTRACT

Background: A significant proportion of patients develop left ventricular (LV) remodeling leading to heart failure after acute myocardial infarction (AMI). Being able to identify these patients would represent a step forward towards personalized medicine. The present study aimed to determine the ability of cyclin dependent kinase inhibitor 1C (CDKN1C) to risk stratify AMI patients, in a sex-specific manner.

Methods: CDKN1C expression was measured in blood samples obtained at admission in a test cohort of 447 AMI patients and a validation cohort of 294 patients. The study end-point was LV function assessed by the ejection fraction (EF) at follow-up.

Results: In the test cohort, CDKN1C was lower in patients with a reduced EF (<40%) compared to patients with preserved EF (≥50%). This observation was specific to women. CDKN1C was a significant univariate predictor of LV function in women only. In multivariable analysis including demographic and clinical parameters, CDKN1C predicted LV function in women (odds ratio [95% confidence interval] 0.44 [0.23–0.82]) but not in men (0.90 [0.70–1.16]). Addition of CDKN1C to a multivariable clinical model reduced the Akaike information criterion, attesting for an incremental predictive value, in women ($p = 0.006$) but not in men ($p = 0.41$). Bootstrap internal validation confirmed the added value of CDKN1C in women. The female-specific predictive value of CDKN1C was validated in the independent cohort.

Conclusion: CDKN1C is a novel female-specific biomarker of LV function after AMI.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cardiovascular disease is the first cause of death in men and women worldwide, among which acute myocardial infarction (AMI) plays a major role [1,2]. Despite known sex disparities towards the risk of AMI and of developing an adverse outcome after AMI [3–5], diagnosis, treatment and management of AMI are still lacking sex specificity.

Abbreviations: AMI, acute myocardial infarction; CDKN1C, cyclin dependent kinase inhibitor 1C; CPK, creatine phosphokinase; cTn, cardiac troponins; EF, ejection fraction; HF, heart failure; KCNQ1OT1, KQT-like subfamily, member 1 opposite strand/antisense transcript 1; LV, left ventricular; Nt-proBNP, N-terminal pro brain natriuretic peptide; STEMI, ST-segment elevation myocardial infarction; NSTEMI, non-ST-segment elevation myocardial infarction.

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

* Corresponding author at: Cardiovascular Research Unit, Luxembourg Institute of Health, L1445, Luxembourg.

E-mail address: yvan.devaux@lih.lu (Y. Devaux).

Left ventricular (LV) remodeling leading to heart failure (HF) occurs in 28% of patients with AMI [6]. Infarct size, history of MI, age, female sex, LV ejection fraction (EF), diabetes and renal failure are mostly associated with HF after AMI [7,8]. HF can be potentially prevented through changing life style habits, control of risk factors and pharmacological treatment [9]. Inhibition of the renin-angiotensin and β -adrenergic systems is the standard treatment to reduce the risk of LV remodeling after MI. Simultaneous inhibition of angiotensin and the natriuretic peptides degradation emerged as a novel mechanism to prevent HF [10]. Being able to identify patients at risk of HF after AMI would allow tailoring healthcare, in a sex-specific manner, to reduce the socio-economic burden of HF and to improve the quality of life of AMI patients. However, to date, risk stratification after AMI remains a challenge which would benefit from novel biomarkers. Since women and men are not equal towards the risk of developing HF after AMI [4], these novel biomarkers should allow a sex-specific risk stratification.

In our search for novel prognostic biomarkers after AMI, we showed that transcriptomic profiles of blood cells represent a reservoir of novel

<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.07.042>

0167-5273/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article as: T. Lalem, et al., Cyclin dependent kinase inhibitor 1 C is a female-specific marker of left ventricular function after acute myocardial infarction, *Int J Cardiol* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.07.042>

biomarkers [11]. In a past study, we identified the long noncoding RNA KQT-like subfamily, member 1 opposite strand/antisense transcript 1 (KCNQ1OT1) whose expression levels in blood cells predicted LV function after AMI [12]. KCNQ1OT1 belongs to an imprinted cluster of 9 genes located on the human chromosome 11p15.5 [13]. While KCNQ1OT1 is exclusively expressed from the paternal allele, the other genes are preferentially expressed from the maternal allele. KCNQ1OT1 plays a prominent role in the imprinting of the cluster by recruiting repressive histone and DNA modifications [13]. The most extensively studied genes of the cluster are KCNQ1 and CDKN1C. Defects in KCNQ1, which encodes for a potassium channel, is responsible for the congenital QT syndrome, a cardiac disorder that can result in potentially lethal arrhythmias [14]. CDKN1C encodes for the inhibitor of cell proliferation p57^{KIP2} [15]. CDKN1C was found to be involved in the development of the atherosclerotic plaque through modulation of vascular smooth muscle cells proliferation [16,17]. Interestingly, polymorphisms in functional regions of CDKN1C are associated with the risk of AMI in patients with atherosclerotic vessels [18]. Furthermore, CDKN1C is associated with female-specific malignancies [19–22] and is downregulated by estrogens through an epigenetic mechanism involving KCNQ1OT1 [23]. As KCNQ1OT1 was found to be associated with LV function after an AMI [12], we hypothesized that CDKN1C would as well be associated with LV function, specifically in women.

2. Methods

2.1. Test cohort

We enrolled 447 patients from the Luxembourg AMI registry in the present study. Patients were recruited at the Institut National de Chirurgie Cardiaque et de Cardiologie Interventionnelle and the Department of Cardiology of the Centre Hospitalier de Luxembourg between February 2006 and December 2012. All patients had an AMI and were treated with percutaneous coronary intervention. Demographic and clinical data of the patients were collected at admission. 351 patients had a STEMI and 96 had a NSTEMI. STEMI and NSTEMI were defined as previously [24]. Arterial blood samples were recovered at the time of reperfusion in PAXgene™ blood RNA tubes (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium). In order to assess the LV function at 4-month follow-up, the LV ejection fraction (EF) was determined by echocardiography. The protocol has been approved by the ethics committee and the national committee for data protection of Luxembourg and complies with Helsinki declaration. All patients signed a written informed consent.

2.2. Measurement of CDKN1C expression in the test cohort

Expression levels of CDKN1C in blood samples of the test cohort were assessed using quantitative PCR as described in details elsewhere [12] and as summarized in the Online Supplement.

2.3. Independent validation cohort

Two hundred and ninety four AMI patients from the German Leipzig LIFE- Heart study were enrolled in the validation cohort. The LIFE-Heart study was designed to analyze genetic and non-genetic risk factors of atherosclerosis and related vascular and metabolic phenotypes [25]. All patients were admitted for an AMI as the first manifestation of the coronary heart disease. 75% of the patients were classified as STEMI. Peripheral venous blood samples were collected in PAXgene™ blood RNA tubes (BD Biosciences) at median balloon-to-blood time 0.87 days (IQR 0.65–1.24) after angiographic reperfusion. Gene expression of CDKN1C was analyzed in available microarray data from Illumina HT-12 v4 Expression BeadChips (Illumina, San Diego, CA, USA) [26] and quality control was performed as described elsewhere [27]. Illumina-ID 1718565 was used for that purpose. The follow-up echocardiography was performed at median of 99 days after the AMI. The recruitment phase was conducted at a single tertiary care centre between July 2008 and October 2012. All patients signed a written informed consent and the study was approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the University of Leipzig, Germany (Reg. No 276–2005) and is registered at ClinicalTrials.gov (NCT00497887).

2.4. Statistical analysis

t-Test or Mann-Whitney test were used to compare two groups of continuous variables following normal or non-normal distribution, respectively. Three-group comparisons were performed using one-way ANOVA for normally distributed data or Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks for non-normally distributed data. Fisher's exact test was used for qualitative data. All tests were two-tailed and a *p* value <0.05 was considered significant. The SigmaPlot v12.0 software was used for these analyses.

The association between CDKN1C and LV function was assessed using logistic regression. First, missing data were replaced using 100-fold multiple imputation. Right

skewed continuous variables were log₂-transformed, and then all continuous variables were scaled to mean = 0 and standard deviation = 1. Both univariate and multivariable analyses were conducted. Ordinal logistic regression was used in the test cohort in which patients were divided into 3 groups of EF (rEF: reduced EF; mrEF: mid-range EF; pEF: preserved EF), and logistic regression was used in the validation cohort in which patients were divided into 2 groups of EF (rEF and pEF). Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI) were calculated. The Akaike information criterion (AIC) was used to evaluate models fit. The Wald chi-square test was used to assess the overall significance of each model and the likelihood ratio test was used to compare two models. Bootstrap internal validation was used to identify markers providing the best improvement of prediction. For each of 150 bootstrap samples, the best model was selected based on the AIC. All prediction analyses were performed on the R version 3.3.1 statistical platform using the packages Hmisc, PredictABEL, lme4, rms and bootStepAIC.

3. Results

3.1. Characteristics of the test cohort

Supplementary Table 1 displays the clinical and demographic characteristics of the test cohort of 447 AMI patients. Median age was 61 and 75% of patients were men. According to the latest guidelines of the European Society of Cardiology for the classification of HF, the test cohort comprised 59% of patients with a preserved EF at 4-month (pEF, EF ≥ 50%), 31% with a mid-range EF (mrEF, EF = 40–49%), and 10% with a reduced EF (rEF, EF < 40%). Patients with rEF were older than patients with mrEF or pEF. The proportion of men was similar in the EF groups. When patients were divided according to their gender (Table 1), we observed that women were older than men (70 vs. 58 years-old, respectively, *p* < 0.001), although age was not associated with the EF group in women, as it was the case in men for whom the elderly were at higher risk of rEF.

3.2. Expression of CDKN1C according to sex and EF group

Expression levels of CDKN1C were measured by quantitative PCR in blood samples obtained at reperfusion in the 447 AMI patients of the test cohort. As shown in Fig. 1A for all patients, CDKN1C expression was lower in rEF patients compared to pEF patients. Patients with mrEF had comparable levels of CDKN1C to patients with rEF and pEF. CDKN1C levels were comparable between men and women (Fig. 1B). Interestingly, while CDKN1C expression was similar between the 3 EF groups in men, women with rEF had reduced CDKN1C expression compared to the mrEF and pEF groups (Fig. 1C).

3.3. Association of CDKN1C with LV function after AMI

Both univariate and multivariable analyses were conducted to assess the association between CDKN1C and LV function measured 4 months after AMI. The 3-group classification (rEF, mrEF, pEF) was used as endpoint in these analyses. We first observed that CDKN1C was a significant univariate predictor of LV function in all patients (OR [95% CI] 0.82 [0.68–0.98]) (Supplementary Fig. 1A). When this association was assessed separately in men and women, we found that it failed to reach significance in men (OR [95% CI], 0.91 [0.73–1.12]) while it was stronger in women (OR [95% CI] 0.56 [0.37–0.83]) (Supplementary Fig. 2 B, C).

The following parameters were included in multivariable analyses: age, body mass index (BMI), sex, diabetes, hypertension, hypercholesterolemia, prior MI, smoking, type of MI (STEMI vs NSTEMI), white blood cells count, ischemic time (i.e. delay between chest pain onset and reperfusion), Nt-proBNP, CPK and cTnT levels. In all patients, prior AMI, CPK and Nt-proBNP were significantly associated with LV function (Fig. 2A). The association between CDKN1C and LV function was of borderline significance (*p* = 0.054). In men, CPK and Nt-proBNP, not CDKN1C, were significantly associated with LV function (Fig. 2B). In women, CDKN1C showed the strongest association with LV function (OR [95% CI] 0.44 [0.23–0.82] (Fig. 2C). Importantly, adding the interaction between CDKN1C and sex in the multivariable model was

Table 1
Demographic and clinical features of MI male and female patients of the test cohort.

	Men (N = 339, 75%)	pEF (N = 197, 58%)	mrEF (N = 113, 33%)	rEF (N = 28, 9%)	p Value (pEF vs mrEF vs rEF)	Women (N = 109, 25%)	pEF (N = 69, 63%)	mrEF (N = 28, 26%)	rEF (N = 12, 11%)	p Value (pEF vs mrEF vs rEF)
Age, median (range), y	58 (30–88)	56 (30–86)	58 (30–88)	66 (47–86)	0.002	70 (35–91)	69 (35–91)	62 (37–89)	73 (37–83)	0.795
Body mass index, median (range)	27 (18–51)	28 (19–47)	27 (18–51)	28 (21–35)	0.124	26 (19–47)	25 (19–47)	26 (20–43)	28 (19–34)	0.93
Blood cell counts at admission, median (range)										
White blood cells, ×10 ⁹ /L	10.76 (1.1–29)	10.5 (1.1–29)	11.32 (5.8–29)	11.6 (4.8–21.7)	0.087	10.4 (3.1–94.7)	9.2 (3.1–22.8)	11.3 (4.9–19.48)	14.1 (8.12–19.91)	0.004
Neutrophils, %	74 (23.9–93.7)	72.4 (23.9–89.2)	75.1 (53.8–93.7)	79.7 (56.8–93.1)	<0.001	75 (45.6–93.5)	75 (56.7–93.5)	74.4 (50.9–91)	91.6 (45.6–91.8)	0.463
Lymphocytes, %	16 (3.1–29.5)	17.9 (5.4–69.5)	15.05 (3.1–34.9)	12.9 (3.7–27)	<0.001	15 (3.6–42)	16 (3.6–37.6)	14.8 (5.2–34.4)	11.2 (6.1–42)	0.255
Monocytes, %	6.3 (1.1–22)	6.45 (2.1–16.2)	6.25 (2.2–22)	5.89 (1.1–13.1)	0.673	5.6 (0.8–12.7)	5.5 (1.1–11.5)	5.7 (3.4–12.7)	5.7 (0.8–7.4)	0.458
Platelets, ×10 ⁹ /L	230 (117–724)	228 (12–724)	239.5 (117–377)	195 (157–404)	0.35	245 (76–502)	246 (76–481)	234.5 (156–502)	274 (147–399)	0.809
Biomarkers median (range)										
CK, U/L	1631 (34–13,038)	1248 (76–9574)	2254.5 (34–13,038)	3796 (105–9363)	<0.001	1368 (82–6799)	1111.5 (82–4078)	3122.5 (201–6799)	3129 (981–5627)	<0.001
cTnT, µg/L	3.74 (0.02–25.66)	2.76 (0.02–25.6)	5.36 (0.03–24.7)	7.81 (0.19–24.3)	<0.001	4.09 (0.01–26.9)	2.91 (0.01–24.7)	5.84 (0.83–26.9)	6.4 (1.04–24)	<0.001
High-sensitivity CRP, mg/L	8.5 (0.3–333.4)	5 (0.3–251.2)	15.6 (0.69–333.4)	17.2 (2.26–301)	<0.001	9.1 (0.91–292)	7.7 (0.91–292)	9.8 (2.87–128)	28 (2.7–71)	0.03
Nt-proBNP, pg/mL	156 (5–35,000)	113.9 (10.55–12,746)	220.5 (5–35,000)	745.4 (41.8–12,894)	<0.001	526 (35.7–15,679)	502.2 (60.3–15,679)	289 (45.2–5014)	774.7 (35.7–13,977)	0.157
4-month EF, median (range), %	50 (15–89)	55 (50–89)	45 (40–49)	34.5 (15–38)	<0.001	50 (20–81)	55 (50–81)	45 (40–49)	32.5 (20–39)	<0.001
Medical history, n (%)										
Previous MI	43 (13)	21 (11)	16 (14)	6 (21)	0.24	6 (6)	2 (3)	3 (11)	1 (8)	0.164
Diabetes mellitus	70 (21)	39 (20)	22 (19)	9 (32)	0.31	27 (25)	11 (16)	10 (36)	6 (50)	0.011
Hypertension	159 (47)	98 (50)	45 (40)	16 (57)	0.13	56 (51)	32 (46)	15 (54)	9 (75)	0.41
Hypercholesterolemia	141 (42)	88 (45)	40 (35)	13 (46)	0.24	56 (51)	37 (54)	11 (39)	8 (67)	0.25
Smoking	159 (47)	73 (37)	60 (53)	7 (25)	0.027	45 (41)	27 (39)	14 (50)	4 (33)	0.56

Left ventricular function was determined by the 4-month ejection fraction (EF). pEF indicates preserved EF (EF ≥ 50%), mrEF indicates mid-range EF (40% ≤ EF ≤ 49%), rEF indicates reduced EF (EF < 40%). White blood cell count and N-terminal pro-brain natriuretic peptide (Nt-proBNP) were determined at reperfusion. Creatine phosphokinase (CPK), cardiac troponin T (cTnT) and high-sensitivity C-reactive protein (CRP) are peak values. P values < 0.05 are indicated in bold.

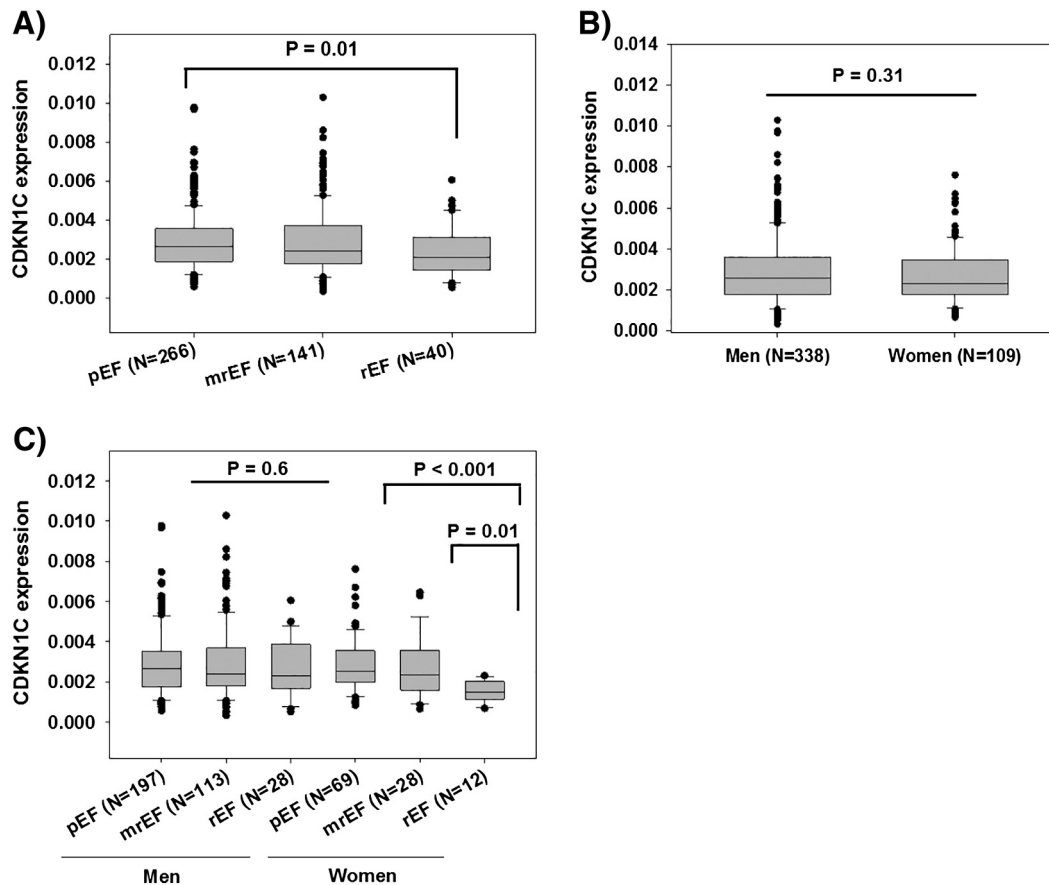


Fig. 1. Expression of CDKN1C in AMI patients. CDKN1C was measured by quantitative PCR in blood samples recovered at reperfusion in 447 AMI patients. (A) Boxplots show the expression of CDKN1C in all patients according to their 4-month EF. Patients with EF \geq 50% were considered as having a pEF, $40\% \leq$ EF < 49% was considered as mrEF, and EF < 40% was considered as rEF. (B) Expression levels of CDKN1C in men and women. (C) Expression levels of CDKN1C in the three EF groups separately in men and women. mrEF: mid-range ejection fraction; pEF: preserved ejection fraction; rEF: reduced ejection fraction.

significant ($p = 0.005$, likelihood ratio test), thus confirming that the predictive value of CDKN1C is dependent on sex.

To determine whether CDKN1C could increase the prediction of LV function by a clinical model including all the variables listed above, we calculated the AIC of the clinical model alone and after addition of CDKN1C. A lower AIC reflects a better model fit and therefore an improvement of prediction. As shown in Supplementary Table 2, adding CDKN1C resulted in a significant reduction of AIC in women ($p = 0.006$), but not in all patients ($p = 0.053$) and men ($p = 0.41$). Thus, CDKN1C improves the prediction of LV function in women only.

Then we used bootstrap internal validation to determine which biomarker(s) among Nt-proBNP, CPK, cTnT and CDKN1C were necessary to reach the best improvement of prediction by a clinical model including age, BMI, sex, diabetes, hypertension, hypercholesterolemia, prior MI, smoking, type of MI (STEMI vs NSTEMI), leucocytes level, and ischemic time. In all patients, 53 models (35% of 150 bootstrap iterations) containing CPK and CDKN1C were selected to generate the best improvement of prediction (Supplementary Fig. 2A). In men, 63 models (42% of 150 bootstrap iterations) containing Nt-proBNP and CPK provided the best improvement of prediction (Supplementary Fig. 2B). In women, 63 models (42% of 150 bootstrap iterations) providing the best improvement of prediction contained CDKN1C with either CPK or cTnT (Supplementary Fig. 2C). Most importantly, in women, CDKN1C was selected 126 times (84%) over the 150 bootstrap iterations as generating the best model improvement, while Nt-proBNP was selected only 56 times (37%) (Supplementary Fig. 2C). These results show that, while Nt-proBNP and CPK are useful predictors of LV function in men, CDKN1C is the best predictor in women.

3.4. Independent validation

The association between CDKN1C and LV function was independently assessed in patients from the German LIFE-Leipzig Heart study. 294 AMI patients having blood samples at admission and follow-up echocardiographic data within 6 months (median 99 days, IQR 85–141 days) were enrolled. Characteristics of patients are shown in Tables 3–5 in the Online Supplement. Median age of these patients was 60 years, 72% were men and 40% had LV dysfunction assessed by an EF \leq 50%. An EF \leq 50% was considered as a criterion for LV dysfunction in this cohort in order to compensate the low number of rEF patients (EF < 40%, $n = 29$), especially in women ($n = 5$). Univariate and multivariable analyses were conducted with logistic regression to address the association between CDKN1C and LV dysfunction, in all patients and in men and women separately (Table 2). CDKN1C was a significant univariate predictor in all patients but not in men. In women, the association had a borderline significance ($p = 0.068$). In multivariable analyses including age, sex, white blood cells count and Nt-proBNP, the association between CDKN1C and LV dysfunction was significant in all patients as well as in women, but not in men (Table 2). These data independently validate the association between CDKN1C and LV function after AMI, especially in women.

4. Discussion

We report a sex-specific association between the CDKN1C gene and LV function after AMI. The blood expression pattern of this gene may

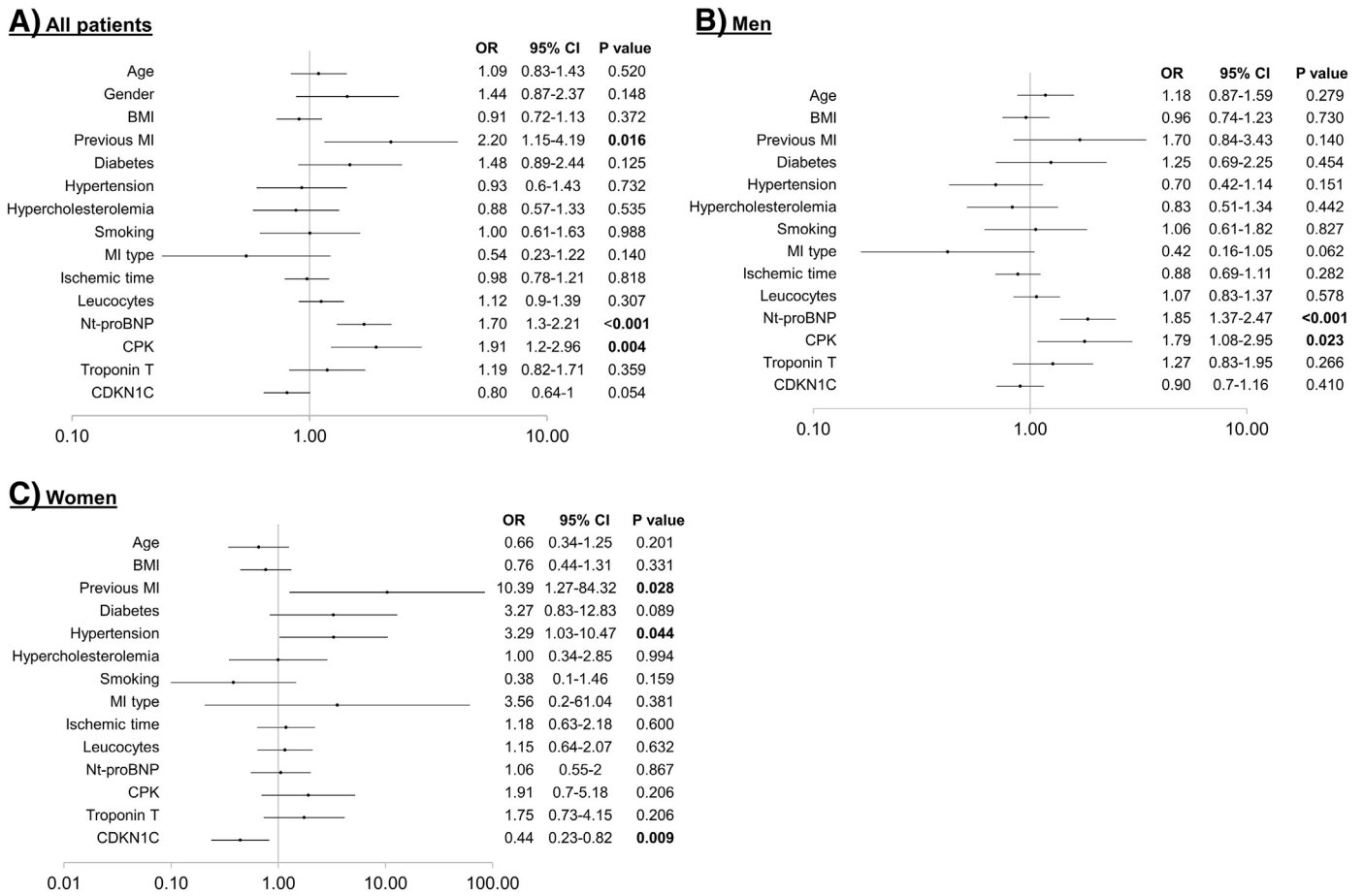


Fig. 2. Multivariable analyses. Ordinal regression was used to evaluate the association of CDKN1C and the demographic and clinical parameters of patients with LV dysfunction at 4 months, in all patients (A), and in men (B) and women separately (C). Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI) are shown. X axis is in log scale. BMI: body mass index; CI: confidence intervals; CPK: creatine phosphokinase; MI: myocardial infarction; Nt-proBNP: N-terminal pro-brain natriuretic peptide; OR: odds ratios.

help to risk stratify AMI patients for a more personalized healthcare approach.

Risk stratification at an early stage after AMI is necessary to start aggressive treatments as soon as possible to prevent HF development. Neurohumoral blockade through inhibition of the renin-angiotensin system and beta-blockers represent the standard treatment approach to prevent HF development after AMI [9]. However, predicting outcome shortly after AMI is challenging, notably due to fluctuating levels of current biomarkers such as Nt-proBNP [28]. Blood samples of the test cohort were collected at the time of reperfusion (i.e. within 12 h of chest pain onset) and at median balloon-to-blood time 0.87 days in the validation cohort. Hence, CDKN1C, combined with clinical and demographic parameters of patients, provides an early (<1 day) prediction of outcome which would allow adapting healthcare depending on risk category.

Table 2
Independent validation.

Group	Univariate analysis		Multivariable analysis	
	OR (95% CI)	p Value	OR (95% CI)	p Value
All patients (N = 294)	0.50 (0.27–0.92)	0.027	0.46 (0.23–0.97)	0.040
Men (N = 212)	0.58 (0.28–1.19)	0.140	0.67 (0.29–1.58)	0.360
Women (N = 82)	0.31 (0.090–1.09)	0.068	0.18 (0.038–0.90)	0.037

Odds ratio are for the association of CDKN1C with LV dysfunction as assessed by an EF ≤ 50% at follow-up of 99 days in median. The univariate analysis assessed the prediction value of CDKN1C alone. Variables included in multivariable analysis were age, sex, leucocytes level, and Nt-proBNP. CI: confidence interval; OR: odds ratio. P values < 0.05 are indicated in bold.

Few biomarkers have been shown to be women-specific. Plasma levels of proneurotensin are higher in women than men and are associated with the risk of diabetes, cardiovascular disease, breast cancer, and all-cause mortality in women, but not in men [29]. In women with HFpEF, thymosin beta 4 is upregulated and predicts mortality independently of Nt-proBNP and other risk factors [30]. To our knowledge, no sex-specific biomarker may serve as outcome predictor after AMI. We observed a lower expression of CDKN1C in blood samples from AMI women with rEF at 4-month follow-up as compared to women with mrEF and pEF. This difference was absent in men. Accordingly, CDKN1C displayed a significant association with LV function only in female patients. Therefore, CDKN1C may be useful to aid in risk stratification of women suffering an AMI.

The end-point used in the test cohort was LV function at 4 months as classified into 3 groups of EF according to European Society of Cardiology guidelines for the management of HF patients [31]. Although this classification is not dedicated to the post-AMI setting but to acute and chronic HF, it was selected for the present study to refine the analyses of the prediction value of CDKN1C. In past studies [12, 32, 33], LV function after AMI was determined using a dichotomized EF with a cut-off value of 40%. In the validation cohort, we opted for this dichotomized classification and a cut-off EF of 50% was chosen to compensate the low number of women in the low to moderate EF groups. This strategy has been adopted previously [33].

For prediction analyses, we calculated the AIC instead of the more widely used area under the curve to take into account the multiplication of variables entered into prediction models. This approach, used in past studies [34, 35], allows to avoid model overfitting. In addition, bootstrap

internal validation was conducted to confirm the association between CDKN1C and LV function. This approach was chosen for its suitability to small sample size [36], as it was the case for women in the rEF group of the test cohort.

In bootstrap internal validation analyses, we observed that significant markers of LV function differed between men and women. In men, Nt-proBNP and CPK appeared to be the best predictors while in women, CDKN1C, along with cTnT or CPK, showed the highest predictive value. In women, Nt-proBNP had a poor if no incremental predictive value, consistent with an insignificant OR in multivariable analyses (OR 95% CI 1.06 [0.55–2]). Accordingly to previous studies [37–39], levels of Nt-proBNP were higher in women compared to men (Supplementary Table 1, $p < 0.001$). This difference was observed only in the pEF group. Furthermore, NT-proBNP was correlated with EF in men ($r = -0.26$, $p = 1.7 \times 10^{-6}$) but not in women, which is consistent with the weakness of this biomarker to predict LV function in women. The absence of predictive value of Nt-proBNP in women in this cohort, while significant in men (OR 95% CI 1.85 [1.37–2.47]), firstly speaks against a general (i.e. equally in men and women) use of this biomarker for risk stratification after AMI and secondly illustrates the need for novel women-specific biomarkers. As biomarkers reflect the underlying pathogenesis of the LV remodeling process which is significantly affected by sex [40, 41], using sex-specific biomarkers would allow a more accurate risk-stratification of the patients. From our data, it can be suggested that CDKN1C might be one of these novel biomarkers.

From a clinical perspective, being able to accurately identify high risk patients after AMI in a sex-specific manner would certainly represent a step forward towards personalized medicine and would allow reducing the economic burden of HF which is still expected to raise continuously over the next decade [42].

From a technological perspective, utilization of CDKN1C in clinical practice will require the development of in vitro diagnostic kits based on the measurement of gene expression in blood samples. This is feasible, as shown for the Corus® CAD test which measures gene expression levels in blood samples to evaluate the likelihood of obstructive coronary artery disease in symptomatic non-diabetic patients [43]. Further developments are required to achieve robust, accurate, fast and cost-effective in vitro diagnostic kits. However, before engaging into in vitro diagnostics development, the predictive value of CDKN1C will have to be thoroughly validated in independent and adequately-sized patient cohorts.

From a mechanistic perspective, sudden death of cardiomyocytes after AMI triggers an inflammatory response which is essential for healing [44]. If dysregulated, this inflammatory response contributes to the development of LV dysfunction and HF. The lower expression of CDKN1C – a cell cycle inhibitor [15] – in blood cells from patients with rEF observed in the present study is consistent with blood cell proliferation and activation of inflammation, which may be excessive and may induce LV remodeling leading to a rEF. Lower levels of CDKN1C in rEF patients are also consistent with the higher levels of KCNQ10T1 levels observed in our previous study [12], since KCNQ10T1 silences CDKN1C [45]. It could be argued that CDKN1C expression in blood samples may be a mere indication of the extent of inflammation and would not provide any additional predictive information than blood cells count. The absence of predictive value of leukocytes in multivariable analyses and the unmodified association between CDKN1C and outcome in females after adjustment with leukocytes count (multivariate OR 0.31 [0.13–0.74]) compared to the unadjusted OR of 0.44 [0.23–0.82] (Fig. 2C) argue against this possibility. The exact contribution of CDKN1C in the impairment of LV function after AMI remains to be fully characterized.

The main strength of our study relies on the confirmation of the sex-specific predictive value of CDKN1C in two independent cohorts. Most of presumed novel biomarkers did not reach clinical application due to lack of proper validation. Nevertheless, further large-scale testing of the predictive value of CDKN1C is needed. As far as limitations are

concerned, the low number of women, especially women with impaired EF, certainly affected the statistical power of our study. The use of bootstrap internal validation and validation in an independent cohort allowed, to some extent, to compensate this hurdle. Furthermore, changing the EF cut-off for patient classification in the validation cohort is another drawback of the study. The selection of CDKN1C as a candidate sex-specific marker for this study was based on previous findings of an association with the clustered gene KCNQ10T1 and LV function after AMI [12], as well as its known association with gynecological cancers [19–22] and AMI risk [18]. The other maternally-expressed genes of the cluster (e.g. KCNQ1, SLC22A18 or PHLDA2) represent additional potential sex-specific markers that deserve to be investigated. It is conceivable that other genes than CDKN1C may possess a predictive value as well. It will be interesting in future studies to evaluate the incremental value of panels of genes and not only single genes. Finally, serial blood samples would be desirable to determine the evolution of the expression levels of CDKN1C in the few hours and days following AMI.

5. Conclusion

We identified CDKN1C as a female-specific biomarker of LV function after AMI. Further validation in independent patient cohorts is warranted before engaging into the development of an in vitro diagnostic test for risk stratification after AMI.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.07.042>.

Sources of funding

This work was supported by the Ministry of Higher Education and Research and the Society for Research on Cardiovascular Diseases of Luxembourg. LIFE-Heart study is funded by the Leipzig Research Center for Civilization Diseases (LIFE). LIFE is an organizational unit affiliated to the Medical Faculty of the University of Leipzig. LIFE is funded by means of the European Union, by the European Regional Development Fund, the European Social Fund, and by means of the Free State of Saxony within the framework of the excellence initiative. This work was supported by a grant from the German Research Council (DFG, SFB-1052/B07 to R.B.).

Competing interests

The authors have declared that no competing interest exists.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Daniel Wagner, head of cardiology at Luxembourg Hospital (LU) and Lausanne Hospital (CH) who initiated the patient cohort used in this study. The contribution of our research nurse Loredana Jacobs is acknowledged. We also would like to thank Annegret Unger and Kay Olischer for retrieval of follow-up data of LIFE-Heart.

References

- [1] E.J. Benjamin, M.J. Blaha, S.E. Chiuve, M. Cushman, S.R. Das, R. Deo, et al., Heart disease and stroke Statistics-2017 update: a report from the American Heart Association, *Circulation* 135 (10) (2017) e146–e603.
- [2] N. Townsend, L. Wilson, P. Bhatnagar, K. Wickramasinghe, M. Rayner, M. Nichols, Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016, *Eur. Heart J.* 37 (42) (2016) 3232–3245.
- [3] H. Jneid, G.C. Fonarow, C.P. Cannon, A.F. Hernandez, I.F. Palacios, A.O. Maree, et al., Sex differences in medical care and early death after acute myocardial infarction, *Circulation* 118 (25) (2008) 2803–2810.
- [4] N.J. Pagidipati, E.D. Peterson, Acute coronary syndromes in women and men, *Nat. Rev. Cardiol.* 13 (8) (2016) 471–480.
- [5] V. Vaccarino, H.M. Krumholz, J. Yarzebski, J.M. Gore, R.J. Goldberg, Sex differences in 2-year mortality after hospital discharge for myocardial infarction, *Ann. Intern. Med.* 134 (3) (2001) 173–181.

- [6] B. Ziaiean, G.C. Fonarow, Epidemiology and aetiology of heart failure, *Nat. Rev. Cardiol.* 13 (6) (2016) 368–378.
- [7] G.W. Stone, S.R. Dixon, C.L. Grines, D.A. Cox, J.G. Webb, B.R. Brodie, et al., Predictors of infarct size after primary coronary angioplasty in acute myocardial infarction from pooled analysis from four contemporary trials, *Am. J. Cardiol.* 100 (9) (2007) 1370–1375.
- [8] T.J. Cahill, R.K. Kharbanda, Heart failure after myocardial infarction in the era of primary percutaneous coronary intervention: mechanisms, incidence and identification of patients at risk, *World J. Cardiol.* 9 (5) (2017) 407–415.
- [9] B. Ibanez, S. James, S. Agewall, M.J. Antunes, C. Bucciarelli-Ducci, H. Bueno, et al., 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC), *Eur. Heart J.* 39 (2) (2018) 119–177.
- [10] J.J.V. McMurray, M. Packer, A.S. Desai, J. Gong, M.P. Lefkowitz, A.R. Rizkala, et al., Angiotensin–neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure, *N. Engl. J. Med.* 371 (11) (2014) 993–1004.
- [11] Y. Devaux, Transcriptome of blood cells as a reservoir of cardiovascular biomarkers, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Cell Res.* 1864 (1) (2017) 209–216.
- [12] M. Vausort, D.R. Wagner, Y. Devaux, Long noncoding RNAs in patients with acute myocardial infarction, *Circ. Res.* 115 (7) (2014) 668–677.
- [13] K. Higashimoto, H. Soejima, T. Saito, K. Okumura, T. Mukai, Imprinting disruption of the CDKN1C/KCNQ1OT1 domain: the molecular mechanisms causing Beckwith-Wiedemann syndrome and cancer, *Cytogenet. Genome Res.* 113 (1–4) (2006) 306–312.
- [14] L. Korostowski, N. Sedlak, N. Engel, 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 (9) (2012), e1002956.
- [15] S. Matsuoka, M.C. Edwards, C. Bai, S. Parker, P. Zhang, A. Baldini, et al., p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene, *Genes Dev.* 9 (6) (1995) 650–662.
- [16] Y. Takagi, Adenovirus-mediated overexpression of a cyclin-dependent kinase inhibitor, p57Kip2, suppressed vascular smooth muscle cell proliferation, *Hokkaido Igaky Zasshi* 77 (3) (2002) 221–230.
- [17] N. Nakano, K. Urasawa, Y. Takagi, T. Saito, S. Kaneta, S. Ishikawa, et al., Downregulation of cyclin-dependent kinase inhibitor; p57(kip2), is involved in the cell cycle progression of vascular smooth muscle cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338 (3) (2005) 1661–1667.
- [18] I. Rodriguez, E. Coto, J.R. Reguero, P. Gonzalez, V. Andres, I. Lozano, et al., Role of the CDKN1A/p21, CDKN1C/p57, and CDKN2A/p16 genes in the risk of atherosclerosis and myocardial infarction, *Cell Cycle* 6 (5) (2007) 620–625.
- [19] H. Landolsi, N. Missaoui, S. Brahem, S. Hmissa, M. Gribaa, M.T. Yacoubi, The usefulness of p57(KIP2) immunohistochemical staining and genotyping test in the diagnosis of the hydatidiform mole, *Pathol. Res. Pract.* 207 (8) (2011) 498–504.
- [20] S. Sasaki, Y. Sasaki, T. Kunimura, A. Sekizawa, Y. Kojima, K. Iino, Clinical usefulness of Immunohistochemical staining of p57 kip2 for the differential diagnosis of complete mole, *Biomed. Res. Int.* 2015 (2015), 905648.
- [21] M.H. Khouja, M. Baekelandt, J.M. Nesland, R. Holm, The clinical importance of Ki-67, p16, p14, and p57 expression in patients with advanced ovarian carcinoma, *Int. J. Gynecol. Pathol.* 26 (4) (2007) 418–425.
- [22] X.Y. Xu, W.Q. Wang, L. Zhang, Y.M. Li, M. Tang, N. Jiang, et al., Clinical implications of p57 KIP2 expression in breast cancer, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 13 (10) (2012) 5033–5036.
- [23] B.A. Rodriguez, Y.I. Weng, T.M. Liu, T. Zuo, P.Y. Hsu, C.H. Lin, et al., Estrogen-mediated epigenetic repression of the imprinted gene cyclin-dependent kinase inhibitor 1C in breast cancer cells, *Carcinogenesis* 32 (6) (2011) 812–821.
- [24] A. Boileau, T. Lalem, M. Vausort, L. Zhang, Y. Devaux, A 3-gene panel improves the prediction of left ventricular dysfunction after acute myocardial infarction, *Int. J. Cardiol.* 254 (2018) 28–35.
- [25] F. Beutner, D. Teupser, S. Gielen, L.M. Holdt, M. Scholz, E. Boudriot, et al., Rationale and design of the Leipzig (LIFE) heart study: phenotyping and cardiovascular characteristics of patients with coronary artery disease, *PLoS One* 6 (12) (2011), e29070.
- [26] R. Burkhardt, H. Kirsten, F. Beutner, L.M. Holdt, A. Gross, A. Teren, et al., Integration of genome-wide SNP data and gene-expression profiles reveals six novel loci and regulatory mechanisms for amino acids and acylcarnitines in whole blood, *PLoS Genet.* 11 (9) (2015), e1005510.
- [27] H. Kirsten, H. Al-Hasani, L. Holdt, A. Gross, F. Beutner, K. Krohn, et al., Dissecting the genetics of the human transcriptome identifies novel trait-related trans-eQTLs and corroborates the regulatory relevance of non-protein coding locidagger, *Hum. Mol. Genet.* 24 (16) (2015) 4746–4763.
- [28] S. Talwar, I.B. Squire, P.F. Downie, A.M. McCullough, M.C. Campton, J.E. Davies, et al., Profile of plasma N-terminal proBNP following acute myocardial infarction; correlation with left ventricular systolic dysfunction, *Eur. Heart J.* 21 (18) (2000) 1514–1521.
- [29] O. Melander, A.S. Maisel, P. Almgren, J. Manjer, M. Belting, B. Hedblad, et al., Plasma pro-neurotensin and incidence of diabetes, cardiovascular disease, breast cancer, and mortality, *JAMA* 308 (14) (2012) 1469–1475.
- [30] C.L. Drum, W.K.Y. Tan, S.P. Chan, L.S. Pakkiri, J.P.C. Chong, O.W. Liew, et al., Thymosin beta-4 is elevated in women with heart failure with preserved ejection fraction, *J. Am. Heart Assoc.* 6 (6) (2017).
- [31] P. Ponikowski, A.A. Voors, S.D. Anker, H. Bueno, J.G.F. Cleland, A.J.S. Coats, et al., 2016 ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure, *Eur. J. Heart Fail.* 18 (8) (2016) 891–975.
- [32] Y. Devaux, M. Vausort, G.P. McCann, J. Zangrando, D. Kelly, N. Razvi, et al., MicroRNA-150: a novel marker of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction, *Circ. Cardiovasc. Genet.* 6 (3) (2013) 290–298.
- [33] M. Vausort, A. Salgado-Somoza, L. Zhang, P. Leszek, M. Scholz, A. Teren, et al., Myocardial infarction-associated circular RNA predicting left ventricular dysfunction, *J. Am. Coll. Cardiol.* 68 (11) (2016) 1247–1248.
- [34] Y. Devaux, A. Salgado-Somoza, J. Dankiewicz, A. Boileau, P. Stamat, A. Schritz, et al., Incremental value of circulating miR-122-5p to predict outcome after out of hospital cardiac arrest, *Theranostics* 7 (10) (2017) 2555–2564.
- [35] Y. Devaux, M. Vausort, G.P. McCann, D. Kelly, O. Collignon, L.L. Ng, et al., A panel of 4 microRNAs facilitates the prediction of left ventricular contractility after acute myocardial infarction, *PLoS One* 8 (8) (2013), e70644.
- [36] E.W. Steyerberg, S.E. Bleeker, H.A. Moll, D.E. Grobbee, K.G. Moons, Internal and external validation of predictive models: a simulation study of bias and precision in small samples, *J. Clin. Epidemiol.* 56 (5) (2003) 441–447.
- [37] T.J. Wang, M.G. Larson, D. Levy, E.P. Leip, E.J. Benjamin, P.W. Wilson, et al., Impact of age and sex on plasma natriuretic peptide levels in healthy adults, *Am. J. Cardiol.* 90 (3) (2002) 254–258.
- [38] R.S. Vasan, E.J. Benjamin, M.G. Larson, E.P. Leip, T.J. Wang, P.W. Wilson, et al., Plasma natriuretic peptides for community screening for left ventricular hypertrophy and systolic dysfunction: the Framingham heart study, *JAMA* 288 (10) (2002) 1252–1259.
- [39] M.M. Redfield, R.J. Rodeheffer, S.J. Jacobsen, D.W. Mahoney, K.R. Bailey, J.C. Burnett Jr., Plasma brain natriuretic peptide concentration: impact of age and gender, *J. Am. Coll. Cardiol.* 40 (5) (2002) 976–982.
- [40] M.A. Cavasin, Z.Y. Tao, A.L. Yu, X.P. Yang, Testosterone enhances early cardiac remodeling after myocardial infarction, causing rupture and degrading cardiac function, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290 (5) (2006) H2043–H2050.
- [41] D.L. Crabbe, K. Dipla, S. Ambati, A. Zafeiridis, J.P. Gaughan, S.R. Houser, et al., Gender differences in post-infarction hypertrophy in end-stage failing hearts, *J. Am. Coll. Cardiol.* 41 (2) (2003) 300–306.
- [42] P.A. Heidenreich, J.G. Trogdon, O.A. Khavjou, J. Butler, K. Dracup, M.D. Ezekowitz, et al., Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association, *Circulation* 123 (8) (2011) 933–944.
- [43] J. Vargas, J.A.C. Lima, W.E. Kraus, P.S. Douglas, S. Rosenberg, Use of the Corus® CAD gene expression test for assessment of obstructive coronary artery disease likelihood in symptomatic non-diabetic patients, *PLoS Curr.* 5 (2013).
- [44] N.G. Frangogiannis, The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodeling, *Nat. Rev. Cardiol.* 11 (5) (2014) 255–265.
- [45] D. Mancini-Dinardo, S.J. Steele, J.M. LeVorse, R.S. Ingram, S.M. Tilghman, Elongation of the Kcnq1ot1 transcript is required for genomic imprinting of neighboring genes, *Genes Dev.* 20 (10) (2006) 1268–1282.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary table 1. Demographic and clinical features of all MI patients of the test cohort

	All (N=447)	Men (N=339, 75%)	Women (N=109, 25%)	P value (Men vs women)	pEF (N=266, 59%)	mrEF (N=141, 31%)	rEF (N=40, 10%)	P value (pEF vs mrEF vs rEF)
Age, median (range), y	61 (30-91)	58 (30-88)	70 (35-91)	<0.001	59 (30-91)	60 (30-89)	69 (37-86)	0.005
Sex, male, n (%)	338 (75)				197 (74)	113 (80)	28 (70)	0.259
Body mass index, median (range)	27 (18-51)	27 (18-51)	26 (19-47)	0.036	27 (19-47)	27 (18-51)	28 (19-35)	0.243
Blood cell counts at admission, median (range)								
White blood cells, ×10 ⁹ /L	10.7 (1.1-29)	10.76 (1.1-29)	10.4 (3.1-94.7)	0.126	10.29 (1.1-29)	11.33 (4.9-29)	11.8 (4.8-21.7)	<0.001
Neutrophils, %	74 (23.9-93.7)	74 (23.9-93.7)	75 (45.6-93.5)	0.086	73.2 (23.9-93.5)	75.1 (50.9-93.7)	79.7 (45.6-93.1)	<0.001
Lymphocytes, %	16 (3.1-69.5)	16 (3.1-29.5)	15 (3.6-42)	0.429	17.8 (3.6-69.5)	15.05 (3.1-34.9)	12.9 (3.7-42)	<0.001
Monocytes, %	6 (0.8-22)	6.3 (1.1-22)	5.6 (0.8-12.7)	0.002	6.2 (1.1-16.22)	6.05 (2.2-22)	5.8 (0.8-13.12)	0.313
Platelets, ×10 ⁹ /L	234 (76-724)	230 (117-724)	245 (76-502)	0.043	234 (76-724)	239 (117-502)	231 (147-407)	0.68
Biomarkers, median (range)								
CK, U/L	1497 (34-13038)	1631 (34-13038)	1368 (82-6799)	0.303	1206.5 (76-9574)	2402 (34-13038)	3339 (105-9363)	<0.001
cTnT, µg/L	3.8 (0.01-26.9)	3.74 (0.02-25.66)	4.09 (0.01-26.9)	0.555	2.7 (0.01-25.6)	5.59 (0.03-26.9)	6.53 (0.19-24.3)	<0.001
High-sensitivity CRP, mg/L	8.8 (0.3-333.4)	8.5 (0.3-333.4)	9.1 (0.91-292)	0.52	5.2 (0.3-292)	12.6 (.69-333)	18 (2.26-301)	<0.001
Nt-proBNP, pg/mL	209 (5-35000)	156 (5-35000)	526 (35.7-15679)	<0.001	161.9 (10.55-15679)	22.44 (5-35000)	745.4 (35.7-13977)	<0.001
4-month EF, median (range), %	50 (15-89)	50 (15-89)	50 (20-81)	0.732	55 (50-89)	45 (40-49)	34.5 (15-39)	<0.001
Medical history, n (%)								
Previous MI	49 (11)	43 (13)	6 (6)	0.035	23 (9)	19 (13)	7 (18)	0.108
Diabetes mellitus	97 (22)	70 (21)	27 (25)	0.422	50 (19)	32 (23)	15 (38)	0.031
Hypertension	215 (48)	159 (47)	56 (51)	0.442	130 (49)	60 (43)	25 (63)	0.07
Hypercholesterolemia	197 (44)	141 (42)	56 (51)	0.095	125 (47)	51 (36)	21 (53)	0.058
Smoking	205 (46)	159 (47)	45 (41)	0.32	120 (45)	74 (53)	11 (28)	0.017

Left ventricular function was determined by the 4-month ejection fraction (EF. pEF indicates preserved EF (EF≥50%), mrEF indicates mid-range EF (40%≤EF<49%), rEF indicates reduced EF (EF<40%). White blood cell count and N-terminal pro-brain natriuretic peptide (Nt-proBNP) were determined at reperfusion. Creatine phosphokinase (CPK), cardiac troponin T (cTnT) and high-sensitivity C-reactive protein (CRP) are peak values.

Supplementary table 2. Incremental predictive value of CDKN1C in the test cohort

Group	Combination	AIC	Wald Chi-square test (p value)	Likelihood ratio test vs. clinical (p value)
All patients	Clinical	748	7.07E-09	
	Clinical + CDKN1C	746	6.20E-09	0.053
Men	Clinical	570	2.96E-06	
	Clinical + CDKN1C	571	5.01E-06	0.41
Women	Clinical	174	7.95E-03	
	Clinical + CDKN1C	169	4.56E-03	0.006

The Akaike information criterion (AIC) is based on the estimation of the quality and the fit of each model. A lower AIC reflects a better model, thereby, an improvement of prediction. The AIC has been calculated for the clinical model (age, BMI, previous MI, diabetes, hypertension, hypercholesterolemia, smoking, MI type (STEMI vs NSTEMI), ischemic time, leucocytes, N-terminal pro-brain natriuretic peptide, creatine phosphokinase and cardiac troponin T) alone and after the addition of CDKN1C. The overall significance of each model was assessed using the Wald Chi-square test and the two models were compared using the likelihood ratio test. Analyses were performed in all patients, and in men and women separately.

Supplementary table 3: Demographic and clinical features of all MI patients from the validation cohort.

	All (N=294)	EF≤50% (N=118, 40%)	EF>50% (N=176, 60%)	P value (EF≤50% vs EF>50%)
Age, median (range), y	60 (26-84)	63 (26-84)	58.5 (37-82)	0.061
Sex, male, n (%)	212 (72%)	87 (74%)	125 (71%)	0.69
Body mass index, median (range)	27.8 (20-50.6)	27.2 (20-50.6)	27.9 (21.5-46.8)	0.23
Blood cell counts at admission, median (range)				
White blood cells, ×10⁹/L	10 (4.7-22.9)	10.8 (4.7-22.9)	9.6 (4.72-19.7)	1.2x10 ⁻⁴
Neutrophils, %	72.7 (48.3-92.9)	74.2 (56.6-88.4)	71.3 (48.3-92.9)	7.3x10 ⁻⁴
Lymphocytes, %	17.2 (4-37)	16 (4.5-36)	18.3 (4-37)	6.1x10 ⁻⁴
Monocytes, %	8.7 (2.5-16)	8.85 (3-16)	8.7 (2.5-15.1)	0.47
Platelets, ×10⁹/L	226 (3-542)	224 (56-542)	230 (3-453)	0.94
Biomarkers, median (range)				
CPK, U/L	640 (37.7-16900)	1010 (47.2-16900)	522 (37.7-7350)	2.7x10 ⁻⁴
cTnT, µg/L	1.95 (0.0075-17.8)	3.26 (0.0075-17.8)	1.43 (0.00968-8.78)	1.6x10 ⁻⁴
hsCRP, mg/L	22.5 (0.63-422)	41 (0.97-422)	16.2 (0.63-226)	5.3x10 ⁻⁷
Nt-proBNP, pg/mL	1710 (36.8-33700)	2620 (121-33700)	1300 (36.8-12900)	9.2x10 ⁻⁸
EF, median (range)	55 (18-71)	45 (18-50)	60 (51-71)	5.0x10 ⁻⁴⁸
Medical history, n (%)				
Previous MI	8 (2.7%)	6 (5.1%)	2 (1.1%)	0.064
Diabetes mellitus	63 (21%)	36 (31%)	27 (15%)	2.3x10 ⁻³
Hypertension	153 (52%)	64 (54%)	89 (51%)	0.55
Hypercholesterolemia	40 (14%)	19 (16%)	21 (12%)	0.39
Smoking	202 (69%)	76 (64%)	126 (72%)	0.20

Left ventricular function was determined by the ejection fraction (EF). Nt-proBNP: N-terminal pro-brain natriuretic peptide; CPK: creatine phosphokinase;

cTnT: cardiac troponin T; hsCRP: high-sensitivity C-reactive protein.

Supplementary table 4: Demographic and clinical features of male MI patients from the validation cohort

	All (N=212)	EF≤50% (N=87, 41%)	EF>50% (N=125, 59%)	P value (EF≤50% vs EF>50%)
Age, median (range), y	57 (26-84)	57 (26-84)	57 (37-82)	0.46
Body mass index, median (range)	27.8 (20-48)	27.4 (20-48)	28.2 (22.1-46.8)	0.21
Blood cell counts at admission, median (range)				
White blood cells, ×10⁹/L	10 (4.7-22.5)	10.5 (4.7-22.5)	9.6 (4.72-19.7)	2.3x10 ⁻³
Neutrophils, %	72.4 (48.3-90.4)	73.8 (56.6-88.4)	70.6 (48.3-90.4)	5.9x10 ⁻³
Lymphocytes, %	17.2 (4.3-37)	16.2 (4.5-36)	18.1 (4.3-37)	6.2x10 ⁻³
Monocytes, %	9.1 (2.5-16)	9.2 (3-16)	9 (2.5-15.1)	0.32
Platelets, ×10⁹/L	221 (3-538)	220 (56-538)	225 (3-444)	0.43
Biomarkers, median (range)				
CPK, U/L	640 (37.7-16900)	1130 (92.7-16900)	465 (37.7-7350)	4.9x10 ⁻⁴
cTnT, µg/L	2.39 (0.0205-17.8)	3.4 (0.0205-17.8)	1.21 (0.0226-8.78)	2.4x10 ⁻⁵
hsCRP, mg/L	23.6 (0.63-422)	40.9 (1.03-422)	17.1 (0.63-226)	3.7x10 ⁻⁶
Nt-proBNP, pg/mL	1380 (36.8-33700)	2190 (121-33700)	1130 (36.8-12000)	1.0x10 ⁻⁵
EF median (range)	54 (18-70)	45 (18-50)	60 (51-70)	2.8x10 ⁻³⁵
Medical history, n (%)				
Previous MI	7 (3.3%)	5 (5.7%)	2 (1.6%)	0.13
Diabetes mellitus	39 (18%)	21 (24%)	18 (14%)	0.10
Hypertension	107 (50%)	47 (54%)	60 (48%)	0.41
Hypercholesterolemia	29 (14%)	15 (17%)	14 (11%)	0.23
Smoking	163 (77%)	67 (77%)	96 (77%)	1.00

Left ventricular function was determined by the ejection fraction (EF). Nt-proBNP: N-terminal pro-brain natriuretic peptide; CPK: creatine phosphokinase;

cTnT: cardiac troponin T; hsCRP: high-sensitivity C-reactive protein.

Supplementary table 5: Demographic and clinical features of female MI patients from the validation cohort

	All (N=82)	EF≤50% (N=31, 38%)	EF>50% (N=51, 62%)	P value (EF≤50% vs EF>50%)
Age, median (range), y	67 (40-84)	71 (42-84)	63 (40-81)	6.4x10 ⁻³
Body mass index, median (range)	27.3 (20.4-50.6)	27.1 (20.4-50.6)	27.6 (21.5-43.6)	0.65
Blood cell counts at admission, median (range)				
White blood cells, ×10⁹/L	10.1 (5.9-22.9)	11.4 (5.9-22.9)	9.6 (6.02-18.6)	0.016
Neutrophils, %	73.2 (56.2-92.9)	76.2 (63-87.9)	72.9 (56.2-92.9)	0.033
Lymphocytes, %	17.2 (4-33.6)	13.8 (6-25.6)	18.9 (4-33.6)	0.036
Monocytes, %	8.2 (3.1-12.6)	7.8 (4.7-10.4)	8.3 (3.1-12.6)	0.80
Platelets, ×10⁹/L	256 (86-542)	282 (177-542)	243 (86-453)	0.20
Biomarkers, median (range)				
CPK, U/L	614 (47.2-4030)	965 (47.2-4030)	562 (52-3230)	0.22
cTnT, µg/L	1.56 (0.0075-6.08)	0.488 (0.0075-5.13)	1.65 (0.00968-6.08)	0.44
hsCRP, mg/L	19.7 (0.97-203)	44.8 (0.97-203)	14.6 (1.65-174)	0.038
Nt-proBNP, pg/mL	2390 (41.3-22700)	4850 (292-22700)	1770 (41.3-12900)	2.2x10 ⁻⁴
EF, median (range)	55.5 (20-71)	45 (20-50)	60 (52-71)	3.5x10 ⁻¹⁴
Medical history, n (%)				
Previous MI	1 (1.2%)	1 (3.2%)	0 (0%)	0.38
Diabetes mellitus	24 (29%)	15 (48%)	9 (18%)	5.3x10 ⁻³
Hypertension	46 (56%)	17 (55%)	29 (57%)	1.00
Hypercholesterolemia	11 (13%)	4 (13%)	7 (14%)	1.00
Smoking	39 (48%)	9 (29%)	30 (59%)	0.012

Left ventricular function was determined by the ejection fraction (EF). Nt-proBNP: N-terminal pro-brain natriuretic peptide; CPK: creatine phosphokinase;

cTnT: cardiac troponin T; hsCRP: high-sensitivity C-reactive protein

Supplementary Methods

Measurement of CDKN1C expression in the test cohort

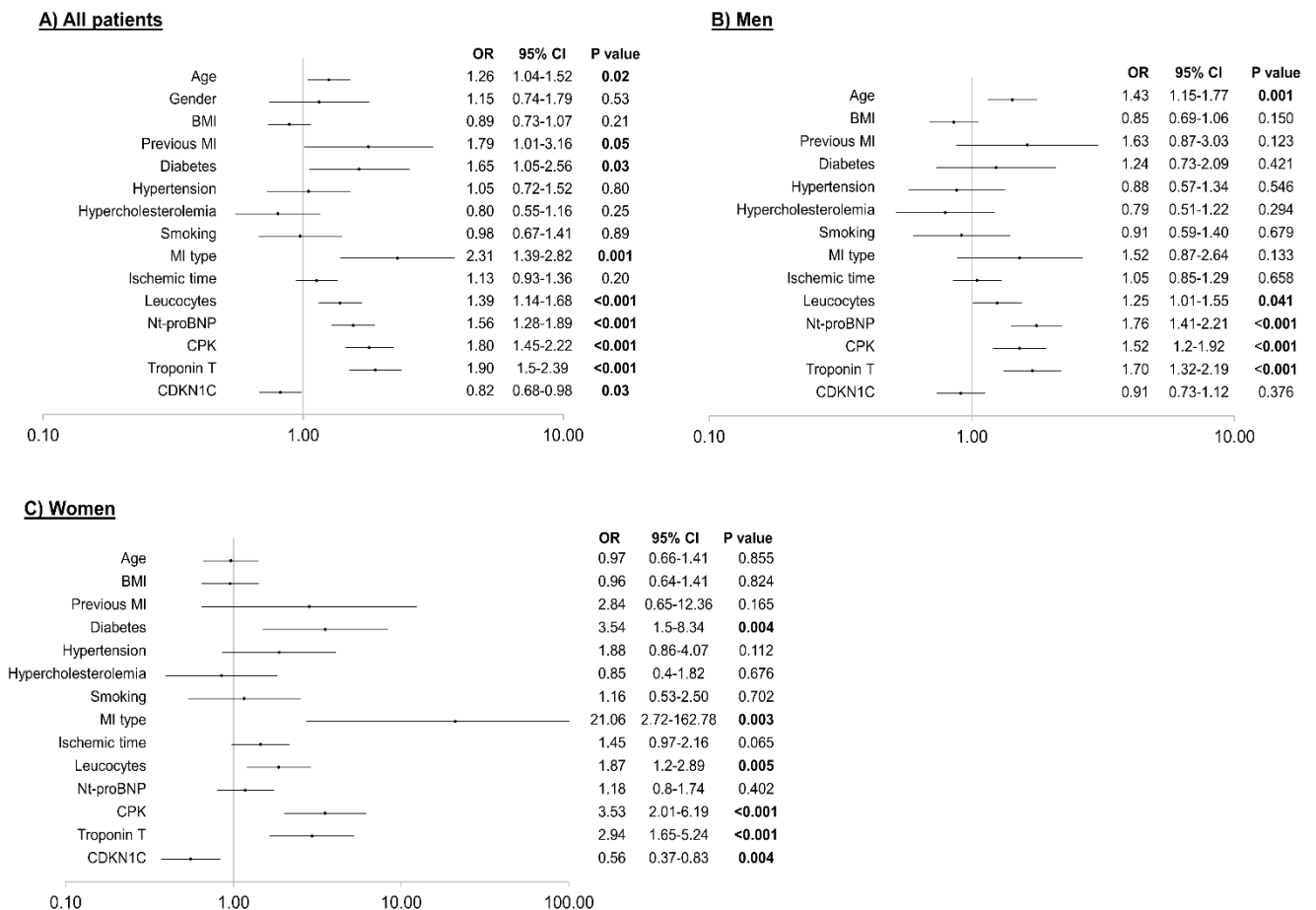
Total RNA extraction. Total RNA was extracted from PAXgene™ blood RNA tubes using the PAXgene™ blood RNA kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) according to the manufacturer's instructions. All RNA samples underwent a purification and concentration step using the RNeasy® MinElute™ kit (Qiagen). In order to avoid contamination with genomic DNA, the extraction process included a DNase I treatment. RNA concentration was determined using the spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop® Technologies, Wilmington, USA), and RNA integrity was checked with the 2100 Bioanalyzer® apparatus (Agilent Technologies, Massy, France) using the RNA 6000 Nano chips.

Reverse transcription. 1µg of RNA was reverse transcribed to complementary DNA using the Superscript II reverse transcription kit (Life technologies, Belgium). To check a potential contamination with genomic DNA, a control containing RNA and lacking the reverse transcriptase was performed.

Quantitative PCR. The primers amplifying CDKN1C were designed using the Beacon Designer software (Premier Biosoft, USA) and their specificity was checked through melting curve analysis and sequencing of the PCR product. The quantitative PCR was run in a CFX96 thermocycler with the IQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad, Nazareth, Belgium). CDKN1C expression was normalized using the splicing factor 3a subunit 1 (SF3A1) as a housekeeping gene with the $\Delta\Delta C_t$ method using the CFX manager 2.1 software which takes into account primers efficiency.

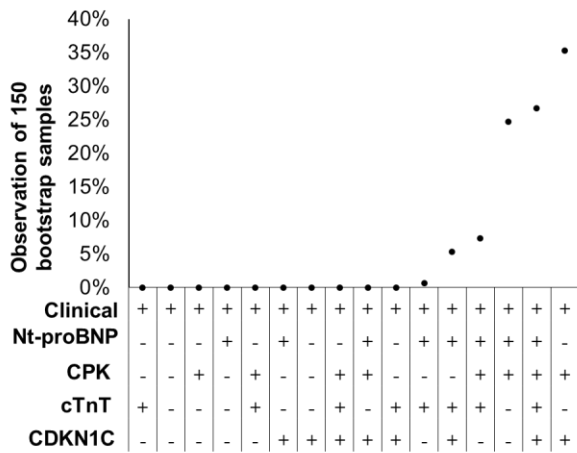
Supplementary Figures

Supplementary figure 1. Univariate analyses. The association between demographic and clinical parameters of patients, and expression levels of CDKN1C, with LV dysfunction at 4 months was assessed with univariate ordinal regression in all patients (A), and in men (B) and women (C) separately. Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI) are shown. X axis is in log scale. BMI: body mass index; CI: confidence intervals; CPK: creatine phosphokinase; MI: myocardial infarction; Nt-proBNP: N-terminal pro-brain natriuretic peptide; OR: odds ratios.

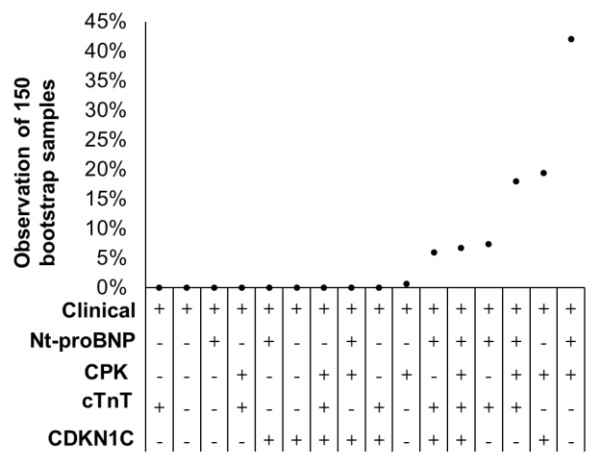


Supplementary figure 2. Bootstrap internal validation showing the percentage of times, over 150 bootstrap samples, that a cardiac biomarker or CDKN1C has been selected as providing the best improvement of the prediction of the clinical model, based on decreased Akaike information criterion (AIC). The variables included in the clinical model were age, BMI, previous MI, diabetes, hypertension, hypercholesterolemia, smoking, MI type (STEMI vs NSTEMI), ischemic time, and leucocytes. The bootstrap was conducted in all patients (A), and in men (B) and women (C) separately. CPK: creatine phosphokinase; cTnT: cardiac Troponin T; Nt-proBNP: N-terminal pro-brain natriuretic peptide.

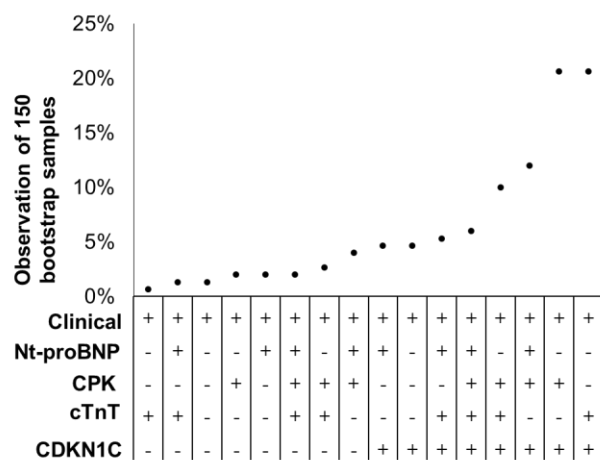
A) All patients



B) Men



C) Women



Discussion

Etude N°1 : Identification d'une combinaison de trois gènes capables d'améliorer la prédiction de la fonction ventriculaire après un IDM

L'objectif de cette étude était de valider la capacité de cinq gènes, exprimés par les cellules sanguines, à prédire la FV après un IDM. Nous avons identifié une combinaison de 3 gènes (TNXB, TGFBR1 et LTBP4) améliorant la valeur prédictive des marqueurs actuels. L'association de ces gènes avec la FV a été observée dans des études préalables montrant le potentiel des cellules sanguines comme réservoir de biomarqueurs transcriptomiques [232-236, 264]. La limite principale de ces études était le nombre réduit de patients. Nous avons validé cette association dans un grand nombre de patients.

Les cellules sanguines représentent une source non-invasive et facilement accessible de biomarqueurs transcriptomiques. De plus, le développement des systèmes de prélèvement de sang permettant la stabilisation des ARNs tels que les tubes PAXgene® a rendu pratique l'utilisation des échantillons sanguins pour des études transcriptomiques, même quand ces derniers ne peuvent pas être traités dans l'immédiat. Et plus important encore, les cellules sanguines seraient capables de refléter ce qui se passe dans le cœur. Dans un modèle d'hypertension, les cellules sanguines subissaient les mêmes modifications transcriptomiques que les cardiomyocytes [230]. De plus, Wingrove et ses collègues ont montré que l'expression génique des PBMC corrélait avec la sévérité de la coronaropathie [231]. Après un IDM, les cellules immunitaires s'infiltrèrent dans le site ischémique et contribuent activement au processus de cicatrisation. La réception des signaux du stress par les cellules sanguines aboutirait probablement à des modifications transcriptomiques requises pour optimiser la contribution de ces dernières à la cicatrisation. Toute dérégulation conduisant à un RVG délétère telle qu'une inflammation exagérée ou un dépôt excessif de MEC, pourrait être très précocement révélée par les cellules sanguines. Dans cette étude, nous avons observé une modulation des gènes, principalement impliqués dans la fibrose. Cette modulation était en faveur d'un dépôt excessif de MEC chez les patients ayant développé une dysfonction ventriculaire.

LTBP4 code pour la protéine LTBP4 (latent TGFβ protein 4) qui a comme fonction principale de séquestrer TGFβ sous sa forme inactive au niveau de la MEC [273]. La

protéolyse de LTBP4 engendre la libération de TGF β et l'induction des voies de signalisation notamment celles associées à la fibrose [273]. Un taux d'expression réduit de LTBP4 chez les patients avec une dysfonction ventriculaire pourrait suggérer une activation exagérée de TGF β et par conséquent une fibrose excessive. D'un autre côté, une surexpression dans le gène codant pour le récepteur du TGF β (TGFBR1) a été observée chez ces patients, renforçant ainsi le rôle pro-fibrotique du TGF β dans le RVG. TNXB code pour la ténascine XB, un membre de la famille des ténascines qui sont des protéines de la MEC [274]. Une déficience au niveau de cette protéine semble être cardio-protectrice en inhibant la rigidité vasculaire [275]. De plus, l'inhibition de cette protéine dans un modèle de cardiomyopathie a amélioré la FV [276]. Malgré que ce gène ne soit pas différentiellement exprimé entre les deux groupes de FE, il était positivement associé avec la dysfonction ventriculaire ce qui serait en concordance avec la fonction de cette protéine. Une surexpression de ce gène serait responsable d'un dépôt excessif de MEC induisant une fibrose ventriculaire.

Nous avons utilisé dans cette étude des méthodes statistiques permettant l'isolation des combinaisons de biomarqueurs avec la meilleure valeur prédictive. Dans cette étude, nous avons utilisé l'AIC à la place de l'AUC, comme l'AIC est mieux adapté aux analyses multivariées en pénalisant le modèle suivant le nombre de variables explicatives. De plus, nous avons utilisé le bootstrap comme méthode de validation interne. Cette méthode permet de déterminer la combinaison incluant le nombre le plus faible de gènes avec la meilleure valeur prédictive. Cette technique est basée sur la comparaison des AIC. L'addition des trois gènes LTBP4, TNXB et TGFBR1 au modèle clinique était suffisante et nécessaire pour obtenir la meilleure prédiction.

Le biomarqueur idéal permettant l'identification des patients à risque de développer un RVG n'a pas encore été découvert. Les peptides natriurétiques BNP et NT-proBNP, qui représentent les biomarqueurs pronostics préférentiels après un IDM, ont montré de nombreuses failles. Ces derniers sont affectés par plusieurs facteurs tels que l'âge, le sexe, l'obésité et la fonction rénale [186-189, 277] altérant la précision de leur capacité pronostique. D'un autre côté, le temps de dosage permettant la meilleure prédiction du RVG reste encore à déterminer pour ces biomarqueurs, étant donné les fluctuations importantes des taux circulants de BNP après un IDM [185].

La découverte de biomarqueurs permettant d'identifier les patients à risque du RVG suffisamment précocement permettrait de réduire l'incidence de l'IC, qui représente une des premières causes de mortalité et d'hospitalisation, notamment parmi les personnes âgées [278]. Les patients à risque recevraient une prise en charge plus personnalisée, en leur offrant un suivi plus intensif, en s'assurant de leur adhérence aux thérapies, au programme de réadaptation cardiaque, ainsi que l'adoption d'un mode de vie adapté.

Dans notre laboratoire, nous étudions le potentiel des entités d'ARN aussi bien codantes que non-codantes pour prédire le risque de MCV. L'amélioration de la prédiction de ces pathologies nécessite une meilleure compréhension des leurs mécanismes. L'émergence des techniques de transcriptomique à haut débit plus robustes et plus fiables telles que le séquençage de nouvelle génération et la puce à ARN a permis une meilleure compréhension des MCV au niveau moléculaire et la découverte de biomarqueurs transcriptomiques qui pourraient représenter de futurs biomarqueurs CV [279]. En supplément des biomarqueurs de nature protéique, les biomarqueurs transcriptomiques ajoutent un niveau d'information complémentaire permettant une meilleure caractérisation des MCV [279].

La validation des 3 gènes prédictifs dans d'autres cohortes pourrait mener au développement d'un kit diagnostique. Il est à reconnaître qu'un nombre très limité de biomarqueurs transcriptomiques a évolué vers la clinique [280]. Deux tests utilisés en clinique ont montré l'utilité des biomarqueurs transcriptomiques dans la prise en charge des MCV. Le test Corus® CAD a déjà été adopté pour le diagnostic de la coronaropathie et la détermination des différents stades de cette maladie [281, 282]. Ce test est basé sur la mesure de 23 gènes dans le sang total des patients soupçonnés d'avoir une coronaropathie [281, 282]. Un autre test baptisé AlloMap® est utilisé pour la détection des patients à risque de rejet après transplantation cardiaque [283, 284]. Ce test, basé sur la mesure de 11 gènes exprimés par les cellules sanguines, a permis de réduire la procédure invasive de biopsies endomyocardiques.

Le facteur majeur empêchant l'aboutissement des biomarqueurs transcriptomiques en clinique est le manque de validation indépendante de ces biomarqueurs [280]. La mesure de

ces biomarqueurs par qPCR est conditionnée par des étapes d'extraction d'ARN et de transcription inverse nécessitant des réactifs et des machines qui pourraient induire des biais et des variabilités inter-laboratoires. D'autres limitations de la qPCR sont la conception des amorces ainsi que l'étape de normalisation [247]. Pour une utilisation optimale des biomarqueurs transcriptomiques, il est important de standardiser les étapes de prélèvement des échantillons, de préparation d'ARN et de mesure de l'expression génique. Il serait idéal d'utiliser des techniques de quantification absolue indépendante des étapes de préparation d'ARN et de normalisation.

Etude N°2 : Différences hommes-femmes au niveau de la valeur prédictive post-IDM des biomarqueurs cardiaques

Nous avons étudié l'effet du sexe sur la capacité des biomarqueurs cardiaques NT-proBNP, CK et cTnT à prédire la dysfonction ventriculaire et la mortalité post-IDM.

Les résultats obtenus doivent être interprétés avec précaution pour plusieurs raisons : 1) le faible nombre de femmes, notamment dans le groupe avec une FEr (N=28), 2) l'association des biomarqueurs n'a été étudiée que pour un seul temps de prélèvement sanguin (revascularisation pour NT-proBNP et valeurs maximales pour cTnT et CK) ce qui n'exclurait pas l'obtention de résultats différents à d'autres temps, 3) nous n'avons pas utilisé la fraction cardio-spécifique de la CK (CK-MB) pour cette analyse.

Conformément aux études préalables, les niveaux de NT-proBNP étaient plus élevés chez les femmes par rapport aux hommes [3, 10, 189]. Cette différence serait expliquée par l'effet stimulateur des estrogènes sur les peptides natriurétiques ainsi que le faible taux d'hémoglobine chez les femmes [3, 189]. De nombreuses études ont montré la capacité du BNP et NT-proBNP à prédire le RVG après un IDM [2]. Cependant, la majorité de ces études incluait moins de 100 patients et aucune n'a analysé cette capacité prédictive distinctement chez les femmes et les hommes. Nous avons trouvé dans notre cohorte que les taux de NT-proBNP, mesurés au moment de l'angioplastie coronaire, étaient capables de prédire la dysfonction ventriculaire chez les hommes mais pas les femmes. Le test d'interaction entre le NT-proBNP et le sexe ne s'est pas révélé significatif, ce qui suggère que la capacité prédictive du NT-proBNP n'est pas spécifique des hommes mais serait plus forte dans ce groupe. Néanmoins, les leucocytes comptés au moment de la revascularisation étaient un prédicteur indépendant de la dysfonction ventriculaire spécifiquement chez les hommes. Cette observation a été confirmée par un test d'interaction avec le sexe significatif. Les leucocytes étaient associés avec le risque d'IC chez les hommes mais pas les femmes dans une étude de population générale [285].

La capacité pronostique du NT-proBNP et de son peptide actif BNP a été comparée entre les femmes et les hommes souffrant d'IC et a montré des résultats controversés. Dans

l'étude *Get With The Guidelines-Heart Failure* incluant presque 100 000 patients [10], le BNP était capable de prédire la mortalité hospitalière similairement chez les femmes et les hommes. Dans une autre cohorte japonaise incluant 800 patients, la capacité du BNP à prédire la mortalité CV ou le risque de survenue d'un évènement CV a été spécifique des hommes [286]. Similairement, le NT-proBNP était capable de prédire la mortalité ainsi que le risque d'hospitalisation spécifiquement chez les hommes, et ce dans une cohorte coréenne de 14000 patients [287].

Les taux de cTns et de CK sont connus pour être plus faibles chez les femmes [11, 85]. Dans notre étude, les valeurs maximales de ces biomarqueurs étaient comparables entre les deux sexes. De plus, dans le modèle multivarié, CK était associée avec la dysfonction ventriculaire chez les hommes alors que cTnT présentait une association significative chez les femmes. L'association de CK et cTn avec le RVG a été l'objectif de plusieurs études sauf que la différence entre les deux sexes n'a pas été analysée [197, 198, 288]. Néanmoins, d'autres études ont montré une association spécifique de cTns chez les femmes. Dans une étude de population générale incluant 4400 individus, la capacité de hs-TnI à prédire la mortalité CV était plus importante chez les femmes [289]. Cette valeur pronostique de la cTnI serait attribuée à sa capacité à prédire le risque d'IDM, plus que l'IC [290]. Comme le RVG est une des conséquences majeures de l'IDM, la cTnI pourrait partiellement refléter le risque du RVG. En outre, dans l'étude *TACTICS-TIMI 18* (Treat Angina with Aggrastat and determine Cost of Therapy with an Invasive or Conservative Strategy–Thrombolysis In Myocardial Infarction 18) incluant des patients avec IDM [84], la cTn était capable de prédire le risque de récurrence d'IDM chez les femmes mais pas les hommes. Ces études pourraient suggérer que l'association de cTn avec l'IDM est plus importante chez les femmes et corroborent l'utilité de ce biomarqueur pour prédire la FV spécifiquement chez les femmes.

L'association de la cTnT avec la dysfonction ventriculaire dans notre étude a uniquement été observée pour la cTnT mesurée par l'ancienne technique (= non ultra-sensible). Aucune association n'a été observée avec la hs-TnT après ajustement avec les facteurs de risque, aussi bien chez tous les patients que chez les femmes. Etant donné que la hs-TnT n'a été mesurée que chez la moitié des patients (N = 315), cette absence d'association pourrait être justifiée par une altération de la puissance statistique notamment chez les

femmes (N = 75). Néanmoins, le diabète était associé avec la dysfonction ventriculaire spécifiquement chez les femmes. Des études préalables ont montré que les femmes souffrant de diabète et de maladies coronariennes avaient plus de risque de mortalité et d'IC par rapport aux hommes [291-293]. Cette observation suggère que les femmes diabétiques avec IDM nécessitent une prise en charge plus rapprochée.

Nous avons également analysé la capacité de ces biomarqueurs cardiaques à prédire le risque de mortalité après un IDM distinctement chez les femmes et les hommes. Tout d'abord, nous avons trouvé dans l'analyse univariée que le sexe était significativement associé avec la mortalité après un IDM. L'ajustement avec l'âge seul suffisait pour supprimer cette association, ce qui est en accord avec les études préalablement réalisées [92, 93]. Aucune association n'a été observée entre les trois biomarqueurs et la mortalité post-IDM dans l'analyse multivariée aussi bien chez les femmes que les hommes. Dans l'étude *TACTICS-TIMI 18*, les trois marqueurs étaient capables de prédire le risque de mortalité post-IDM chez les deux sexes [84]. L'absence d'association dans notre cohorte pourrait être justifiée par le nombre plus faible de patients (608 versus 1800 dans l'étude *TACTICS-TIMI 18*).

Nous reconnaissons que notre étude a inclus un nombre réduit de patients, notamment parmi les femmes, ce qui implique la nécessité de valider ces résultats dans un groupe plus grand de patients. Néanmoins, elle renforce l'idée que les biomarqueurs cardiaques devraient être utilisés de façon différente chez les hommes et les femmes. Malgré les nombreuses études publiées sur la capacité de ces biomarqueurs à prédire le RVG, aucune n'a évalué la différence entre les femmes et les hommes. Notre étude suggère alors que le NT-proBNP serait probablement moins associé avec la dysfonction ventriculaire chez les femmes et que la cTn serait un meilleur prédicteur chez ce groupe.

Etude N°3 : Identification du gène CDKN1C comme un biomarqueur de la fonction ventriculaire après un IDM spécifiquement chez les femmes

Cette étude a montré l'association du gène CDKN1C mesuré au moment de la revascularisation avec la FV évaluée lors du suivi (4 mois). Cette association était spécifique des femmes. A notre connaissance, CDKN1C représente le premier biomarqueur féminin de la FV après un IDM. Néanmoins, quelques biomarqueurs féminins des MCV ont été mis en évidence, dont le plus connu est la proneurotensine qui était capable de prédire la mortalité CV spécifiquement chez les femmes [257, 259].

Après un IDM, des différences ont été observées entre les deux sexes au niveau des processus associés avec le RVG tels que l'inflammation, la dégradation et le dépôt de la MEC ainsi que l'hypertrophie des cardiomyocytes [9, 125, 126, 134, 135], aboutissant à des différences au niveau de la morphologie et de la fonction cardiaque. Etant donné que les biomarqueurs reflètent les mécanismes sous-jacents du RVG, une meilleure prédiction nécessite la prise en considération de ces différences et la découverte de biomarqueurs dotés de capacité prédictive comparable entre les deux sexes, ou idéalement, des biomarqueurs spécifiques à chaque sexe. Les différences observées au niveau du RVG entre les femmes et les hommes seraient originaires d'une modulation différente de l'expression génique [154], suggérant ainsi l'utilité des biomarqueurs transcriptomiques comme biomarqueurs spécifiques à chaque sexe.

La dichotomisation des patients en fonction de leur FE n'a pas été la même dans la cohorte LUCKY et celle de validation. Dans la cohorte LUCKY, nous avons adopté la dernière classification mise en place par la Société Européenne de Cardiologie [138], qui divise les patients en trois groupes. Nous reconnaissons que cette classification est dédiée aux patients avec une IC aigüe ou chronique non pas à ceux souffrant d'un RVG ou d'une dysfonction ventriculaire. Nous avons adopté cette classification afin de raffiner l'analyse de l'association de CDKN1C avec la FV. Quant à la cohorte de validation, les patients ont été répartis en seulement deux groupes. La répartition de cette cohorte en 3 groupes aurait généré un nombre très faible de patients dans le groupe de FEr (EF<40%), notamment parmi les femmes (N = 5), ce qui aurait significativement altéré la puissance statistique de l'analyse.

Conformément à ce qui a été observé dans l'étude précédente, le NT-proBNP n'était pas capable de prédire la dysfonction ventriculaire chez les femmes, imposant le besoin de découvrir un biomarqueur capable de prédire la FV équitablement chez les femmes et les hommes ou des biomarqueurs spécifiques à chaque sexe. D'après cette étude, CDKN1C pourrait constituer un tel marqueur pour les femmes.

Nous reconnaissons l'absence d'étude mécanistique élucidant l'implication de CDKN1C dans le processus du RVG. Comme la modulation de CDKN1C dans le sang a été observée en phase aigüe après un IDM, nous postulons que CDKN1C aurait un rôle dans la réponse inflammatoire succédant l'IDM. CDKN1C, en tant que gène codant pour un inhibiteur du cycle cellulaire, aurait probablement un rôle dans la prolifération des cellules inflammatoires. Les femmes ayant une expression réduite de CDKN1C auraient une prolifération plus importante des cellules immunitaires aboutissant à une réponse inflammatoire exagérée et donc à un RVG délétère. L'ajustement de l'expression de CDKN1C avec le nombre de leucocytes n'a pas modifié l'association de ce gène avec la FV, ce qui n'est pas en accord avec cette hypothèse. Néanmoins, CDKN1C pourrait moduler la prolifération d'un seul sous-type de cellules immunitaires. La mesure de l'expression de CDKN1C dans les différents sous-types de cellules immunitaires a montré que ce gène était principalement exprimé par les monocytes (résultats non publiés). L'ajustement de l'expression de CDKN1C par le nombre de monocytes pourrait probablement masquer l'association spécifique chez les femmes, suggérant que ce gène contribuerait au processus du RVG chez les femmes à travers l'induction de l'immunité innée et ce en favorisant la prolifération des monocytes.

Le nombre faible de femmes, notamment dans le groupe avec FEr, représente une limitation majeure de notre étude. L'utilisation de la méthode de validation interne bootstrap ainsi que la validation indépendante ont permis de compenser, au moins en partie et de manière tout à fait mathématique, cette limitation. De plus, la sélection de CDKN1C basée sur l'étude préalable montrant l'association du lncARN KCNQ1OT1 avec le RVG [254] ainsi que l'association de CDKN1C avec le risque d'IDM [269] et sa modulation par les estrogènes [272], constitue en elle-même un biais pour cette étude. L'association des autres gènes du

cluster avec la FV et leur capacité à stratifier les patients d'une manière spécifique à chaque sexe méritent d'être également étudiées.

Conclusions & Perspectives

L'identification des patients à risque du RVG après un IDM permettrait une prise en charge plus personnalisée ainsi qu'une meilleure adaptation du suivi et des thérapies. Néanmoins, le (ou les) biomarqueur idéal capable de prédire le risque du RVG après un IDM n'a pas encore été découvert. Les avancées des technologies transcriptomiques ont permis une meilleure compréhension des MCV au niveau moléculaire ainsi que la caractérisation de signatures d'expression génique pouvant être utilisées comme biomarqueurs CV. Malgré le nombre très faible de biomarqueurs transcriptomiques ayant atteint la clinique, le potentiel de cette famille de biomarqueurs ne peut pas être négligé.

Le développement des kits de diagnostic basés sur l'expression génique nécessiterait tout d'abord une validation des biomarqueurs transcriptomiques dans des cohortes indépendantes incluant un nombre conséquent de patients. Cette validation n'est garantie que par la standardisation des protocoles de prélèvement d'échantillons, des techniques de préparation d'ARN et de mesure de l'expression génique. De plus, il est important de prendre en considération les variables capables de modifier l'expression génique indépendamment de la pathologie en question telles que l'âge, le sexe, le tabagisme, les médicaments et les agents polluants [280]. D'un autre côté, l'empreinte transcriptomique change en fonction du temps, ce qui fait que la capacité prédictive ou diagnostique d'un biomarqueur transcriptomique est impactée par le moment de sa mesure. Les cellules sanguines représentent une source pratique et non-invasive de biomarqueurs transcriptomiques et sont applicables au développement de kits de diagnostic moléculaire utilisables en clinique.

Pour la majorité des biomarqueurs du RVG post-IDM, la comparaison de la valeur prédictive entre les femmes et les hommes n'a pas été effectuée. Cela pourrait être expliqué par la faible incidence d'IDM chez les femmes par rapport aux hommes (ratio femmes : hommes 1 :3) ce qui engendre une sous-représentation des femmes dans les études. Néanmoins, les maladies coronariennes tuent autant de femmes que d'hommes [1], ce qui confirme le besoin de biomarqueurs qui fonctionnent équitablement chez les deux sexes, ou idéalement, des biomarqueurs spécifiques à chaque sexe.

La caractérisation de l'effet du sexe sur les MCV permettrait une meilleure compréhension de ces pathologies ainsi qu'une prise en charge plus efficace et personnalisée

des deux sexes. Le sexe doit être pris en considération lors du développement de nouveaux médicaments, dans la définition de nouvelles directives et la découverte de nouveaux biomarqueurs. Plusieurs organisations et journaux scientifiques reconnaissent l'importance et la nécessité d'étudier l'effet du sexe et requièrent l'inclusion de cette variable dans la conception des études. Depuis 2014, le NIH (*National Institutes of Health*) a développé une politique requérant le respect de la parité dans les études précliniques incluant aussi bien des animaux que des cellules [294]. L'inclusion du sexe dans les travaux de recherche et d'innovation représente un des objectifs du programme de recherche européen Horizon 2020 [295].

Ce travail de thèse s'est alors penché sur l'étude des biomarqueurs capables de prédire la dysfonction ventriculaire après un IDM. Il a renforcé le concept que les biomarqueurs cardiaques, notamment NT-proBNP et cTns, doivent être utilisés différemment chez les femmes et les hommes. Nous avons également mis en évidence un nouveau biomarqueur potentiellement capable de prédire la dysfonction ventriculaire spécifiquement chez les femmes.

Dans la première étude, nous avons mis en évidence une combinaison de trois gènes (LTBP4, TGFBR1 et TXNB1) capables d'améliorer la valeur prédictive d'un modèle clinique incluant les facteurs de risque et marqueurs traditionnels.

Avant de pouvoir considérer l'utilisation de ces biomarqueurs en clinique, il faut procéder à leur validation dans d'autres cohortes de patients indépendantes. Bien que les fonctions de ces gènes permettent d'émettre des hypothèses quant à leurs rôles potentiels dans le processus du RVG délétère, il serait intéressant de mener des expériences in vitro et in vivo permettant de clarifier leur contribution à ce processus. La sélection des cinq gènes était basée sur des critères bien précis. Dans le futur, nous souhaiterions valider d'autres gènes qui s'étaient avérés associés avec le FV lors d'études préliminaires.

Dans la seconde étude, nous avons montré que les biomarqueurs cardiaques NT-proBNP, cTnT et CK ne prédisaient pas le risque de dysfonction ventriculaire de manière équitable chez les deux sexes. NT-proBNP était associé avec la dysfonction ventriculaire plus

chez les hommes alors que la cTnT était le seul biomarqueur cardiaque associé avec la FV chez les femmes.

Ici encore, si ces observations sont validées dans d'autres cohortes de patients, il serait envisageable de sensibiliser les cliniciens sur la capacité des marqueurs cardiaques à prédire la dysfonction ventriculaire post IDM chez les hommes et les femmes séparément. Il sera impératif de tester plusieurs temps de mesure de ces biomarqueurs, étant donné que leur capacité prédictive est considérablement affectée par le temps. Dans cette étude, l'association de la cTnT, mesurée par la technique hypersensible, avec le RVG n'a pas été observée, ce qui pourrait être expliqué par le relativement faible nombre de patients pour lesquels la hs-TnT a été mesurée. Il serait intéressant de comparer la capacité prédictive de la hs-TnT dans une cohorte incluant un plus grand nombre de patients.

La dernière étude a permis la mise en évidence d'un nouveau biomarqueur appelé CDKN1C qui est associé à la dysfonction ventriculaire post-IDM, spécifiquement chez les femmes.

Bien que l'association entre CDKN1C et la dysfonction ventriculaire post IDM ait été validée dans deux cohortes indépendantes, le nombre faible de femmes dans les deux cohortes impose d'autres validations incluant un nombre plus conséquent de patients, et donc de femmes. Des expériences complémentaires sont requises afin d'évaluer la contribution de ce gène dans le RVG délétère, ce qui permettrait peut-être de comprendre la différence d'association avec le RVG entre les deux sexes. Nous avons émis l'hypothèse que CDKN1C régulerait la prolifération des cellules immunitaires, en réponse à l'IDM, différemment chez les hommes et les femmes. Des expériences vérifiant cette hypothèse ont été initiées dans le laboratoire. D'un autre côté, CDKN1C a été sélectionné parmi les autres gènes de son cluster en se basant sur son association avec l'IDM et sa modulation par les estrogènes. Il serait intéressant de mesurer les autres gènes du cluster et d'analyser leur association avec la

FV.

Bibliographie

1. *Cardiovascular disease in Europe 2016: an epidemiological update.* Eur Heart J, 2016. **37**(42): p. 3182-3183.
2. Fertin, M., et al., *Usefulness of circulating biomarkers for the prediction of left ventricular remodeling after myocardial infarction.* Am J Cardiol, 2012. **110**(2): p. 277-83.
3. Lam, C.S., et al., *Influence of sex and hormone status on circulating natriuretic peptides.* J Am Coll Cardiol, 2011. **58**(6): p. 618-26.
4. Suthahar, N., et al., *Sex-specific associations of obesity and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels in the general population.* Eur J Heart Fail, 2018.
5. Lam, C.S., et al., *Sex differences in clinical characteristics and outcomes after myocardial infarction: insights from the Valsartan in Acute Myocardial Infarction Trial (VALIANT).* Eur J Heart Fail, 2015. **17**(3): p. 301-12.
6. Humphries, K.H., et al., *Sex differences in cardiovascular disease - Impact on care and outcomes.* Front Neuroendocrinol, 2017. **46**: p. 46-70.
7. Johnson, B.D., et al., *Persistent chest pain predicts cardiovascular events in women without obstructive coronary artery disease: results from the NIH-NHLBI-sponsored Women's Ischaemia Syndrome Evaluation (WISE) study.* Eur Heart J, 2006. **27**(12): p. 1408-15.
8. Reis, S.E., et al., *Coronary microvascular dysfunction is highly prevalent in women with chest pain in the absence of coronary artery disease: results from the NHLBI WISE study.* Am Heart J, 2001. **141**(5): p. 735-41.
9. Crabbe, D.L., et al., *Gender differences in post-infarction hypertrophy in end-stage failing hearts.* J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(2): p. 300-6.
10. Hsich, E.M., et al., *Relationship between sex, ejection fraction, and B-type natriuretic peptide levels in patients hospitalized with heart failure and associations with in-hospital outcomes: findings from the Get With The Guideline-Heart Failure Registry.* Am Heart J, 2013. **166**(6): p. 1063-1071 e3.
11. Daniels, L.B. and A.S. Maisel, *Cardiovascular biomarkers and sex: the case for women.* Nat Rev Cardiol, 2015. **12**(10): p. 588-96.
12. Netter, F.H., *Atlas of human anatomy.* Sixth edition. ed.
13. Kramer, C.M., et al., *Multimodality imaging of myocardial injury and remodeling.* J Nucl Med, 2010. **51 Suppl 1**: p. 107s-121s.
14. Dean, J., et al., *Coronary microvascular dysfunction: sex-specific risk, diagnosis, and therapy.* Nat Rev Cardiol, 2015. **12**(7): p. 406-14.
15. Beale, A.L., et al., *Sex Differences in Cardiovascular Pathophysiology: Why Women Are Overrepresented in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction.* Circulation, 2018. **138**(2): p. 198-205.
16. Huxley, V.H., *Sex and the cardiovascular system: the intriguing tale of how women and men regulate cardiovascular function differently.* Adv Physiol Educ, 2007. **31**(1): p. 17-22.
17. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/world-heart-day-2017/en/, C.d.-W.H.O., *Cardiovascular diseases.*
18. Timmis, A., et al., *European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017.* Eur Heart J, 2018. **39**(7): p. 508-579.

19. Yusuf, S., et al., *Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study*. Lancet, 2004. **364**(9438): p. 937-52.
20. Mahmood, S.S., et al., *The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective*. Lancet, 2014. **383**(9921): p. 999-1008.
21. Hu, G., et al., *The gender-specific impact of diabetes and myocardial infarction at baseline and during follow-up on mortality from all causes and coronary heart disease*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(9): p. 1413-8.
22. Barrett-Connor, E.L., et al., *Why is diabetes mellitus a stronger risk factor for fatal ischemic heart disease in women than in men? The Rancho Bernardo Study*. Jama, 1991. **265**(5): p. 627-31.
23. Haffner, S.M., H. Miettinen, and M.P. Stern, *Relatively more atherogenic coronary heart disease risk factors in prediabetic women than in prediabetic men*. Diabetologia, 1997. **40**(6): p. 711-7.
24. Huxley, R., F. Barzi, and M. Woodward, *Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women: meta-analysis of 37 prospective cohort studies*. Bmj, 2006. **332**(7533): p. 73-8.
25. Williams, K., et al., *Diabetes, abdominal adiposity, and atherogenic dyslipoproteinemia in women compared with men*. Diabetes, 2008. **57**(12): p. 3289-96.
26. Wannamethee, S.G., et al., *Do women exhibit greater differences in established and novel risk factors between diabetes and non-diabetes than men? The British Regional Heart Study and British Women's Heart Health Study*. Diabetologia, 2012. **55**(1): p. 80-7.
27. Stamler, J., R. Stamler, and J.D. Neaton, *Blood pressure, systolic and diastolic, and cardiovascular risks. US population data*. Arch Intern Med, 1993. **153**(5): p. 598-615.
28. Mozaffarian, D., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association*. Circulation, 2016. **133**(4): p. e38-360.
29. Boggia, J., et al., *Ambulatory blood pressure monitoring in 9357 subjects from 11 populations highlights missed opportunities for cardiovascular prevention in women*. Hypertension, 2011. **57**(3): p. 397-405.
30. Levy, D., et al., *The progression from hypertension to congestive heart failure*. Jama, 1996. **275**(20): p. 1557-62.
31. Stamler, J., D. Wentworth, and J.D. Neaton, *Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT)*. Jama, 1986. **256**(20): p. 2823-8.
32. Kreisberg, R.A. and S. Kasim, *Cholesterol metabolism and aging*. Am J Med, 1987. **82**(1b): p. 54-60.
33. Lerner, D.J. and W.B. Kannel, *Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population*. Am Heart J, 1986. **111**(2): p. 383-90.
34. Shaw, L.J., et al., *Insights from the NHLBI-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) Study: Part I: gender differences in traditional and novel risk factors, symptom evaluation, and gender-optimized diagnostic strategies*. J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(3 Suppl): p. S4-s20.

35. Kenchaiah, S., et al., *Obesity and the risk of heart failure*. N Engl J Med, 2002. **347**(5): p. 305-13.
36. Sturm, R. and A. Hattori, *Morbid obesity rates continue to rise rapidly in the United States*. Int J Obes (Lond), 2013. **37**(6): p. 889-91.
37. Hayward, C.S., C.M. Webb, and P. Collins, *Effect of sex hormones on cardiac mass*. Lancet, 2001. **357**(9265): p. 1354-6.
38. Song, X., et al., *Obesity attenuates gender differences in cardiovascular mortality*. Cardiovasc Diabetol, 2014. **13**: p. 144.
39. Puymirat, E., et al., *Association of changes in clinical characteristics and management with improvement in survival among patients with ST-elevation myocardial infarction*. Jama, 2012. **308**(10): p. 998-1006.
40. Vaccarino, V. and J.D. Bremner, *Behavioral, emotional and neurobiological determinants of coronary heart disease risk in women*. Neurosci Biobehav Rev, 2017. **74**(Pt B): p. 297-309.
41. Regitz-Zagrosek, V., et al., *ESC Guidelines on the management of cardiovascular diseases during pregnancy: the Task Force on the Management of Cardiovascular Diseases during Pregnancy of the European Society of Cardiology (ESC)*. Eur Heart J, 2011. **32**(24): p. 3147-97.
42. Nickens, M.A., R.C. Long, and S.A. Geraci, *Cardiovascular disease in pregnancy: (women's health series)*. South Med J, 2013. **106**(11): p. 624-30.
43. Mosca, L., et al., *Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women--2011 update: a guideline from the american heart association*. Circulation, 2011. **123**(11): p. 1243-62.
44. Bellamy, L., et al., *Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis*. Lancet, 2009. **373**(9677): p. 1773-9.
45. Muka, T., et al., *Association of Age at Onset of Menopause and Time Since Onset of Menopause With Cardiovascular Outcomes, Intermediate Vascular Traits, and All-Cause Mortality: A Systematic Review and Meta-analysis*. JAMA Cardiol, 2016. **1**(7): p. 767-776.
46. Albrektsen, G., et al., *Lifelong Gender Gap in Risk of Incident Myocardial Infarction: The Tromso Study*. JAMA Intern Med, 2016. **176**(11): p. 1673-1679.
47. Thygesen, K., et al., *Third universal definition of myocardial infarction*. Eur Heart J, 2012. **33**(20): p. 2551-67.
48. Roe, M.T., et al., *Clinical and therapeutic profile of patients presenting with acute coronary syndromes who do not have significant coronary artery disease. The Platelet Glycoprotein IIb/IIIa in Unstable Angina: Receptor Suppression Using Integrilin Therapy (PURSUIT) Trial Investigators*. Circulation, 2000. **102**(10): p. 1101-6.
49. Bugiardini, R., O. Manfrini, and G.M. De Ferrari, *Unanswered questions for management of acute coronary syndrome: risk stratification of patients with minimal disease or normal findings on coronary angiography*. Arch Intern Med, 2006. **166**(13): p. 1391-5.
50. Reynolds, H.R., et al., *Mechanisms of myocardial infarction in women without angiographically obstructive coronary artery disease*. Circulation, 2011. **124**(13): p. 1414-25.
51. Suwaidi, J.A., et al., *Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction*. Circulation, 2000. **101**(9): p. 948-54.

52. Bugiardini, R., et al., *Endothelial function predicts future development of coronary artery disease: a study of women with chest pain and normal coronary angiograms*. *Circulation*, 2004. **109**(21): p. 2518-23.
53. Bertrand, M.E., et al., *Frequency of provoked coronary arterial spasm in 1089 consecutive patients undergoing coronary arteriography*. *Circulation*, 1982. **65**(7): p. 1299-306.
54. Spatz, E.S., et al., *The Variation in Recovery: Role of Gender on Outcomes of Young AMI Patients (VIRGO) Classification System: A Taxonomy for Young Women With Acute Myocardial Infarction*. *Circulation*, 2015. **132**(18): p. 1710-8.
55. Regitz-Zagrosek, V. and G. Kararigas, *Mechanistic Pathways of Sex Differences in Cardiovascular Disease*. *Physiol Rev*, 2017. **97**(1): p. 1-37.
56. Sakakura, K., et al., *Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression*. *Heart Lung Circ*, 2013. **22**(6): p. 399-411.
57. Gonzalez, L. and B.L. Trigatti, *Macrophage Apoptosis and Necrotic Core Development in Atherosclerosis: A Rapidly Advancing Field with Clinical Relevance to Imaging and Therapy*. *Can J Cardiol*, 2017. **33**(3): p. 303-312.
58. Lansky, A.J., et al., *Gender and the extent of coronary atherosclerosis, plaque composition, and clinical outcomes in acute coronary syndromes*. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2012. **5**(3 Suppl): p. S62-72.
59. White, S.J., A.C. Newby, and T.W. Johnson, *Endothelial erosion of plaques as a substrate for coronary thrombosis*. *Thromb Haemost*, 2016. **115**(3): p. 509-19.
60. Pagidipati, N.J. and E.D. Peterson, *Acute coronary syndromes in women and men*. *Nat Rev Cardiol*, 2016. **13**(8): p. 471-80.
61. Hung, M.J., P. Hu, and M.Y. Hung, *Coronary artery spasm: review and update*. *Int J Med Sci*, 2014. **11**(11): p. 1161-71.
62. Nishiguchi, T., et al., *Prevalence of spontaneous coronary artery dissection in patients with acute coronary syndrome*. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*, 2016. **5**(3): p. 263-70.
63. Rashid, H.N., et al., *Incidence and characterisation of spontaneous coronary artery dissection as a cause of acute coronary syndrome--A single-centre Australian experience*. *Int J Cardiol*, 2016. **202**: p. 336-8.
64. Ono, R. and L.M. Falcao, *Takotsubo cardiomyopathy systematic review: Pathophysiologic process, clinical presentation and diagnostic approach to Takotsubo cardiomyopathy*. *Int J Cardiol*, 2016. **209**: p. 196-205.
65. Bybee, K.A., et al., *Clinical characteristics and thrombolysis in myocardial infarction frame counts in women with transient left ventricular apical ballooning syndrome*. *Am J Cardiol*, 2004. **94**(3): p. 343-6.
66. Akashi, Y.J., et al., *The clinical features of takotsubo cardiomyopathy*. *Qjm*, 2003. **96**(8): p. 563-73.
67. Kothawade, K. and C.N. Bairey Merz, *Microvascular coronary dysfunction in women: pathophysiology, diagnosis, and management*. *Curr Probl Cardiol*, 2011. **36**(8): p. 291-318.
68. Jones, E., W. Eteiba, and N.B. Merz, *Cardiac syndrome X and microvascular coronary dysfunction*. *Trends Cardiovasc Med*, 2012. **22**(6): p. 161-8.
69. Twerenbold, R., et al., *Clinical Use of High-Sensitivity Cardiac Troponin in Patients With Suspected Myocardial Infarction*. *J Am Coll Cardiol*, 2017. **70**(8): p. 996-1012.
70. Ibanez, B., et al., *2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the*

- management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J, 2018. 39(2): p. 119-177.*
71. Dey, S., et al., *Sex-related differences in the presentation, treatment and outcomes among patients with acute coronary syndromes: the Global Registry of Acute Coronary Events.* Heart, 2009. **95**(1): p. 20-6.
 72. Khan, N.A., et al., *Sex differences in acute coronary syndrome symptom presentation in young patients.* JAMA Intern Med, 2013. **173**(20): p. 1863-71.
 73. Canto, J.G., et al., *Association of age and sex with myocardial infarction symptom presentation and in-hospital mortality.* Jama, 2012. **307**(8): p. 813-22.
 74. Kaul, P., et al., *Temporal trends in patient and treatment delay among men and women presenting with ST-elevation myocardial infarction.* Am Heart J, 2011. **161**(1): p. 91-7.
 75. Diercks, D.B., et al., *Gender differences in time to presentation for myocardial infarction before and after a national women's cardiovascular awareness campaign: a temporal analysis from the Can Rapid Risk Stratification of Unstable Angina Patients Suppress ADverse Outcomes with Early Implementation (CRUSADE) and the National Cardiovascular Data Registry Acute Coronary Treatment and Intervention Outcomes Network-Get with the Guidelines (NCDR ACTION Registry-GWTG).* Am Heart J, 2010. **160**(1): p. 80-87.e3.
 76. Roffi, M., et al., *2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC).* Eur Heart J, 2016. **37**(3): p. 267-315.
 77. Pelletier, R., et al., *Sex-related differences in access to care among patients with premature acute coronary syndrome.* Cmaj, 2014. **186**(7): p. 497-504.
 78. Hochman, J.S., et al., *Sex, clinical presentation, and outcome in patients with acute coronary syndromes. Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries in Acute Coronary Syndromes IIb Investigators.* N Engl J Med, 1999. **341**(4): p. 226-32.
 79. Jneid, H., et al., *Sex differences in medical care and early death after acute myocardial infarction.* Circulation, 2008. **118**(25): p. 2803-10.
 80. Giannitsis, E. and H.A. Katus, *Cardiac troponin level elevations not related to acute coronary syndromes.* Nat Rev Cardiol, 2013. **10**(11): p. 623-34.
 81. Mueller, M., et al., *Cardiac troponin T: from diagnosis of myocardial infarction to cardiovascular risk prediction.* Circ J, 2013. **77**(7): p. 1653-61.
 82. Mills, N.L., et al., *Implementation of a sensitive troponin I assay and risk of recurrent myocardial infarction and death in patients with suspected acute coronary syndrome.* Jama, 2011. **305**(12): p. 1210-6.
 83. Mills, N.L., et al., *Implications of lowering threshold of plasma troponin concentration in diagnosis of myocardial infarction: cohort study.* Bmj, 2012. **344**: p. e1533.
 84. Wiviott, S.D., et al., *Differential expression of cardiac biomarkers by gender in patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction: a TACTICS-TIMI 18 (Treat Angina with Aggrastat and determine Cost of Therapy with an Invasive or Conservative Strategy-Thrombolysis In Myocardial Infarction 18) substudy.* Circulation, 2004. **109**(5): p. 580-6.

85. Apple, F.S., R. Ler, and M.M. Murakami, *Determination of 19 cardiac troponin I and T assay 99th percentile values from a common presumably healthy population*. Clin Chem, 2012. **58**(11): p. 1574-81.
86. *High sensitivity cardiac troponin and the under-diagnosis of myocardial infarction in women: prospective cohort study*. Bmj, 2015. **350**: p. h626.
87. Lew, J., et al., *Sex-Based Differences in Cardiometabolic Biomarkers*. Circulation, 2017. **135**(6): p. 544-555.
88. Pope, J.H., et al., *Missed diagnoses of acute cardiac ischemia in the emergency department*. N Engl J Med, 2000. **342**(16): p. 1163-70.
89. Vaccarino, V., et al., *Sex-based differences in early mortality after myocardial infarction. National Registry of Myocardial Infarction 2 Participants*. N Engl J Med, 1999. **341**(4): p. 217-25.
90. Ahmed, B. and H.L. Dauerman, *Women, bleeding, and coronary intervention*. Circulation, 2013. **127**(5): p. 641-9.
91. Johansson, S., et al., *Mortality and morbidity trends after the first year in survivors of acute myocardial infarction: a systematic review*. BMC Cardiovasc Disord, 2017. **17**(1): p. 53.
92. Valero-Masa, M.J., et al., *Sex differences in acute myocardial infarction: Is it only the age?* Int J Cardiol, 2017. **231**: p. 36-41.
93. Berg, J., et al., *Sex differences in survival after myocardial infarction in Sweden, 1987-2010*. Heart, 2017. **103**(20): p. 1625-1630.
94. Kvakkestad, K.M., et al., *Gender differences in all-cause, cardiovascular and cancer mortality during long-term follow-up after acute myocardial infarction; a prospective cohort study*. BMC Cardiovasc Disord, 2017. **17**(1): p. 75.
95. Ubrich, R., et al., *Sex differences in long-term mortality among acute myocardial infarction patients: Results from the ISAR-RISK and ART studies*. PLoS One, 2017. **12**(10): p. e0186783.
96. Izadnegahdar, M., et al., *Do younger women fare worse? Sex differences in acute myocardial infarction hospitalization and early mortality rates over ten years*. J Womens Health (Larchmt), 2014. **23**(1): p. 10-7.
97. Porrello, E.R., et al., *Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart*. Science, 2011. **331**(6020): p. 1078-80.
98. Matsui, Y., J. Morimoto, and T. Uede, *Role of matricellular proteins in cardiac tissue remodeling after myocardial infarction*. World J Biol Chem, 2010. **1**(5): p. 69-80.
99. Ma, Y., et al., *Myofibroblasts and the extracellular matrix network in post-myocardial infarction cardiac remodeling*. Pflugers Arch, 2014. **466**(6): p. 1113-27.
100. Timmers, L., et al., *The innate immune response in reperfused myocardium*. Cardiovasc Res, 2012. **94**(2): p. 276-83.
101. Frangogiannis, N.G., *The mechanistic basis of infarct healing*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(11-12): p. 1907-39.
102. Saxena, A., et al., *IL-1 induces proinflammatory leukocyte infiltration and regulates fibroblast phenotype in the infarcted myocardium*. J Immunol, 2013. **191**(9): p. 4838-48.
103. Talman, V. and H. Ruskoaho, *Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration*. Cell Tissue Res, 2016. **365**(3): p. 563-81.
104. Willems, I.E., et al., *The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars*. Am J Pathol, 1994. **145**(4): p. 868-75.

105. Vanhoutte, D., et al., *Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(3): p. 604-13.
106. Gonzalez-Santamaria, J., et al., *Matrix cross-linking lysyl oxidases are induced in response to myocardial infarction and promote cardiac dysfunction*. Cardiovasc Res, 2016. **109**(1): p. 67-78.
107. van den Borne, S.W., et al., *Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts*. Nat Rev Cardiol, 2010. **7**(1): p. 30-7.
108. Flachskampf, F.A., et al., *Cardiac imaging after myocardial infarction*. Eur Heart J, 2011. **32**(3): p. 272-83.
109. Zhang, P., et al., *Multiscale Characterization of Impact of Infarct Size on Myocardial Remodeling in an Ovine Infarct Model*. Cells Tissues Organs, 2015. **200**(5): p. 349-62.
110. Konstam, M.A., et al., *Left ventricular remodeling in heart failure: current concepts in clinical significance and assessment*. JACC Cardiovasc Imaging, 2011. **4**(1): p. 98-108.
111. Heineke, J. and J.D. Molkentin, *Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(8): p. 589-600.
112. Spinale, F.G., *Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function*. Physiol Rev, 2007. **87**(4): p. 1285-342.
113. Yan, A.T., et al., *Characterization of the peri-infarct zone by contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging is a powerful predictor of post-myocardial infarction mortality*. Circulation, 2006. **114**(1): p. 32-9.
114. Frangogiannis, N.G., *The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling*. Nat Rev Cardiol, 2014. **11**(5): p. 255-65.
115. Madamanchi, A., *Beta-adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure*. McGill J Med, 2007. **10**(2): p. 99-104.
116. Olivetti, G., et al., *Apoptosis in the failing human heart*. N Engl J Med, 1997. **336**(16): p. 1131-41.
117. Lindpaintner, K., et al., *Selective activation of cardiac angiotensinogen gene expression in post-infarction ventricular remodeling in the rat*. J Mol Cell Cardiol, 1993. **25**(2): p. 133-43.
118. Sigusch, H.H., S.E. Campbell, and K.T. Weber, *Angiotensin II-induced myocardial fibrosis in rats: role of nitric oxide, prostaglandins and bradykinin*. Cardiovasc Res, 1996. **31**(4): p. 546-54.
119. Bhatt, A.S., A.P. Ambrosy, and E.J. Velazquez, *Adverse Remodeling and Reverse Remodeling After Myocardial Infarction*. Curr Cardiol Rep, 2017. **19**(8): p. 71.
120. Maczewski, M., et al., *Late ventricular remodeling in non-reperfused acute myocardial infarction in humans is predicted by angiotensin II type 1 receptor density on blood platelets*. Int J Cardiol, 2008. **127**(1): p. 57-63.
121. Burchfield, J.S., M. Xie, and J.A. Hill, *Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2*. Circulation, 2013. **128**(4): p. 388-400.
122. Galli, A. and F. Lombardi, *Postinfarct Left Ventricular Remodelling: A Prevailing Cause of Heart Failure*. Cardiol Res Pract, 2016. **2016**: p. 2579832.
123. Darasz, K.H., et al., *Measurement of left ventricular volume after anterior myocardial infarction: comparison of magnetic resonance imaging, echocardiography, and radionuclide ventriculography*. Int J Cardiovasc Imaging, 2002. **18**(2): p. 135-42.

124. Piro, M., et al., *Sex-related differences in myocardial remodeling*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(11): p. 1057-65.
125. Masci, P.G., et al., *Relationship between location and size of myocardial infarction and their reciprocal influences on post-infarction left ventricular remodelling*. Eur Heart J, 2011. **32**(13): p. 1640-8.
126. Canali, E., et al., *Impact of gender differences on myocardial salvage and post-ischaemic left ventricular remodelling after primary coronary angioplasty: new insights from cardiovascular magnetic resonance*. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2012. **13**(11): p. 948-53.
127. Wu, J.C., et al., *Influence of sex on ventricular remodeling after myocardial infarction in mice*. J Am Soc Echocardiogr, 2003. **16**(11): p. 1158-62.
128. Brown, D.A., et al., *Susceptibility of the heart to ischaemia-reperfusion injury and exercise-induced cardioprotection are sex-dependent in the rat*. J Physiol, 2005. **564**(Pt 2): p. 619-30.
129. Johnson, M.S., R.L. Moore, and D.A. Brown, *Sex differences in myocardial infarct size are abolished by sarcolemmal KATP channel blockade in rat*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(6): p. H2644-47.
130. Jain, M., et al., *Influence of gender on the response to hemodynamic overload after myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(6): p. H2544-50.
131. Wang, M., et al., *17-beta-Estradiol decreases p38 MAPK-mediated myocardial inflammation and dysfunction following acute ischemia*. J Mol Cell Cardiol, 2006. **40**(2): p. 205-12.
132. Gabel, S.A., et al., *Estrogen receptor beta mediates gender differences in ischemia/reperfusion injury*. J Mol Cell Cardiol, 2005. **38**(2): p. 289-97.
133. Cavasin, M.A., et al., *Testosterone enhances early cardiac remodeling after myocardial infarction, causing rupture and degrading cardiac function*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(5): p. H2043-50.
134. Cavasin, M.A., et al., *Gender differences in cardiac function during early remodeling after acute myocardial infarction in mice*. Life Sci, 2004. **75**(18): p. 2181-92.
135. Fang, L., et al., *Differences in inflammation, MMP activation and collagen damage account for gender difference in murine cardiac rupture following myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2007. **43**(5): p. 535-44.
136. Kuch, B., et al., *Gender specific differences in left ventricular adaptation to obesity and hypertension*. J Hum Hypertens, 1998. **12**(10): p. 685-91.
137. Biondi-Zoccai, G.G., et al., *Reduced post-infarction myocardial apoptosis in women: a clue to their different clinical course?* Heart, 2005. **91**(1): p. 99-101.
138. Ponikowski, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure*. Rev Esp Cardiol (Engl Ed), 2016. **69**(12): p. 1167.
139. Lee, D.S., et al., *Relation of disease pathogenesis and risk factors to heart failure with preserved or reduced ejection fraction: insights from the framingham heart study of the national heart, lung, and blood institute*. Circulation, 2009. **119**(24): p. 3070-7.
140. Mosterd, A. and A.W. Hoes, *Clinical epidemiology of heart failure*. Heart, 2007. **93**(9): p. 1137-46.
141. Redfield, M.M., et al., *Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic*. Jama, 2003. **289**(2): p. 194-202.

142. Bleumink, G.S., et al., *Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study*. Eur Heart J, 2004. **25**(18): p. 1614-9.
143. Ceia, F., et al., *Prevalence of chronic heart failure in Southwestern Europe: the EPICA study*. Eur J Heart Fail, 2002. **4**(4): p. 531-9.
144. Owan, T.E., et al., *Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction*. N Engl J Med, 2006. **355**(3): p. 251-9.
145. *The survival of patients with heart failure with preserved or reduced left ventricular ejection fraction: an individual patient data meta-analysis*. Eur Heart J, 2012. **33**(14): p. 1750-7.
146. Adams, K.F., Jr., et al., *Relationship of serum digoxin concentration to mortality and morbidity in women in the digitalis investigation group trial: a retrospective analysis*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(3): p. 497-504.
147. Charchar, F.J., et al., *Association of the human Y chromosome with cholesterol levels in the general population*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(2): p. 308-12.
148. Charchar, F.J., et al., *Y is there a risk to being male?* Trends Endocrinol Metab, 2003. **14**(4): p. 163-8.
149. Charchar, F.J., et al., *Inheritance of coronary artery disease in men: an analysis of the role of the Y chromosome*. Lancet, 2012. **379**(9819): p. 915-922.
150. Berletch, J.B., et al., *Genes that escape from X inactivation*. Hum Genet, 2011. **130**(2): p. 237-45.
151. Shungin, D., et al., *New genetic loci link adipose and insulin biology to body fat distribution*. Nature, 2015. **518**(7538): p. 187-196.
152. Orłowska-Baranowska, E., et al., *Association of the common genetic polymorphisms and haplotypes of the chymase gene with left ventricular mass in male patients with symptomatic aortic stenosis*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e96306.
153. Wu, H., et al., *Genetic variation and gender determine bradykinin type 1 receptor responses in human tissue: implications for the ACE-inhibitor-induced effects in patients with coronary artery disease*. Clin Sci (Lond), 2014. **126**(6): p. 441-9.
154. Kararigas, G., et al., *Sex-dependent regulation of fibrosis and inflammation in human left ventricular remodelling under pressure overload*. Eur J Heart Fail, 2014. **16**(11): p. 1160-7.
155. Tobi, E.W., et al., *DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(21): p. 4046-53.
156. Stein, A.D., et al., *Exposure to famine during gestation, size at birth, and blood pressure at age 59 y: evidence from the Dutch Famine*. Eur J Epidemiol, 2006. **21**(10): p. 759-65.
157. Queiros, A.M., et al., *Sex- and estrogen-dependent regulation of a miRNA network in the healthy and hypertrophied heart*. Int J Cardiol, 2013. **169**(5): p. 331-8.
158. Cleland, W.H., C.R. Mendelson, and E.R. Simpson, *Aromatase activity of membrane fractions of human adipose tissue stromal cells and adipocytes*. Endocrinology, 1983. **113**(6): p. 2155-60.
159. Carlson, L.E. and B.B. Sherwin, *Higher levels of plasma estradiol and testosterone in healthy elderly men compared with age-matched women may protect aspects of explicit memory*. Menopause, 2000. **7**(3): p. 168-77.
160. Shearman, A.M., et al., *Estrogen receptor alpha gene variation is associated with risk of myocardial infarction in more than seven thousand men from five cohorts*. Circ Res, 2006. **98**(5): p. 590-2.

161. Peter, I., et al., *Association of estrogen receptor beta gene polymorphisms with left ventricular mass and wall thickness in women*. Am J Hypertens, 2005. **18**(11): p. 1388-95.
162. Nordmeyer, J., et al., *Upregulation of myocardial estrogen receptors in human aortic stenosis*. Circulation, 2004. **110**(20): p. 3270-5.
163. Mahmoodzadeh, S., et al., *Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure*. Faseb j, 2006. **20**(7): p. 926-34.
164. Olivetti, G., et al., *Gender differences and aging: effects on the human heart*. J Am Coll Cardiol, 1995. **26**(4): p. 1068-79.
165. Guerra, S., et al., *Myocyte death in the failing human heart is gender dependent*. Circ Res, 1999. **85**(9): p. 856-66.
166. Chen, C., et al., *Apoptosis and autophagy contribute to gender difference in cardiac ischemia-reperfusion induced injury in rats*. Life Sci, 2013. **93**(7): p. 265-70.
167. Iwakura, A., et al., *Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9*. Circulation, 2006. **113**(12): p. 1605-14.
168. Le, T.Y., et al., *Role of androgens in sex differences in cardiac damage during myocardial infarction*. Endocrinology, 2014. **155**(2): p. 568-75.
169. Wang, M., et al., *Role of endogenous testosterone in myocardial proinflammatory and proapoptotic signaling after acute ischemia-reperfusion*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(1): p. H221-6.
170. Kher, A., et al., *Sex differences in the myocardial inflammatory response to acute injury*. Shock, 2005. **23**(1): p. 1-10.
171. Kramer, P.R., V. Winger, and S.F. Kramer, *17beta-Estradiol utilizes the estrogen receptor to regulate CD16 expression in monocytes*. Mol Cell Endocrinol, 2007. **279**(1-2): p. 16-25.
172. Jeanes, H.L., et al., *Oestrogen-mediated cardioprotection following ischaemia and reperfusion is mimicked by an oestrogen receptor (ER)alpha agonist and unaffected by an ER beta antagonist*. J Endocrinol, 2008. **197**(3): p. 493-501.
173. Mahmoodzadeh, S., et al., *Nuclear factor-kappaB regulates estrogen receptor-alpha transcription in the human heart*. J Biol Chem, 2009. **284**(37): p. 24705-14.
174. Patten, R.D., et al., *17 Beta-estradiol differentially affects left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy following myocardial infarction and pressure overload*. J Card Fail, 2008. **14**(3): p. 245-53.
175. Westphal, C., et al., *Effects of estrogen, an ERalpha agonist and raloxifene on pressure overload induced cardiac hypertrophy*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e50802.
176. Kararigas, G., et al., *Sex-specific modification of progesterone receptor expression by 17beta-oestradiol in human cardiac tissues*. Biol Sex Differ, 2010. **1**(1): p. 2.
177. Kararigas, G., et al., *Transcriptome characterization of estrogen-treated human myocardium identifies myosin regulatory light chain interacting protein as a sex-specific element influencing contractile function*. J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(4): p. 410-7.
178. Mahmoodzadeh, S., et al., *17beta-Estradiol inhibits matrix metalloproteinase-2 transcription via MAP kinase in fibroblasts*. Cardiovasc Res, 2010. **85**(4): p. 719-28.
179. Tamura, N., et al., *Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p. 4239-44.

180. Ogawa, Y., et al., *Molecular cloning of the complementary DNA and gene that encode mouse brain natriuretic peptide and generation of transgenic mice that overexpress the brain natriuretic peptide gene*. J Clin Invest, 1994. **93**(5): p. 1911-21.
181. Jujic, A., et al., *A genetic variant of the atrial natriuretic peptide gene is associated with left ventricular hypertrophy in a non-diabetic population--the Malmo preventive project study*. BMC Med Genet, 2013. **14**: p. 64.
182. Hendriks, T., et al., *Predictors of left ventricular remodeling after ST-elevation myocardial infarction*. Int J Cardiovasc Imaging, 2017. **33**(9): p. 1415-1423.
183. Haeck, J.D., 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**(8): p. 1065-9.
184. Kelly, D., et al., *Plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-9: novel indicators of left ventricular remodelling and prognosis after acute myocardial infarction*. Eur Heart J, 2008. **29**(17): p. 2116-2124.
185. Talwar, S., et al., *Profile of plasma N-terminal proBNP following acute myocardial infarction; correlation with left ventricular systolic dysfunction*. Eur Heart J, 2000. **21**(18): p. 1514-21.
186. Wang, T.J., et al., *Impact of age and sex on plasma natriuretic peptide levels in healthy adults*. Am J Cardiol, 2002. **90**(3): p. 254-8.
187. Vasan, R.S., et al., *Plasma natriuretic peptides for community screening for left ventricular hypertrophy and systolic dysfunction: the Framingham heart study*. Jama, 2002. **288**(10): p. 1252-9.
188. Redfield, M.M., et al., *Plasma brain natriuretic peptide concentration: impact of age and gender*. J Am Coll Cardiol, 2002. **40**(5): p. 976-82.
189. Hamada, M., et al., *Plasma levels of atrial and brain natriuretic peptides in apparently healthy subjects: Effects of sex, age, and hemoglobin concentration*. Int J Cardiol, 2017. **228**: p. 599-604.
190. Maffei, S., et al., *Increase in circulating levels of cardiac natriuretic peptides after hormone replacement therapy in postmenopausal women*. Clin Sci (Lond), 2001. **101**(5): p. 447-53.
191. Hwu, C.M., et al., *Increased concentrations of atrial and plasma atrial natriuretic peptide in castrated male rats*. Life Sci, 1993. **52**(2): p. 205-12.
192. Mollmann, H., et al., *Ischemia triggers BNP expression in the human myocardium independent from mechanical stress*. Int J Cardiol, 2010. **143**(3): p. 289-97.
193. Ellis, K.L., et al., *Association of genetic variation in the natriuretic peptide system with cardiovascular outcomes*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(4): p. 695-701.
194. Li, T.Y., et al., *Sex Differences of the Natriuretic Peptide Polymorphism Associated With Angiographic Coronary Atherosclerosis*. Cardiol Res, 2017. **8**(1): p. 1-6.
195. Mayr, A., et al., *Cardiac troponin T and creatine kinase predict mid-term infarct size and left ventricular function after acute myocardial infarction: a cardiac MR study*. J Magn Reson Imaging, 2011. **33**(4): p. 847-54.
196. Hallen, J., et al., *Cardiac troponin I for the prediction of functional recovery and left ventricular remodelling following primary percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction*. Heart, 2010. **96**(23): p. 1892-7.
197. Dohi, T., et al., *Utility of peak creatine kinase-MB measurements in predicting myocardial infarct size, left ventricular dysfunction, and outcome after first anterior*

- wall acute myocardial infarction (from the INFUSE-AMI trial)*. Am J Cardiol, 2015. **115**(5): p. 563-70.
198. Hall, T.S., et al., *Cardiac troponin I for prediction of clinical outcomes and cardiac function through 3-month follow-up after primary percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation myocardial infarction*. Am Heart J, 2015. **169**(2): p. 257-265.e1.
 199. Fertin, M., et al., *Usefulness of serial assessment of B-type natriuretic peptide, troponin I, and C-reactive protein to predict left ventricular remodeling after acute myocardial infarction (from the REVE-2 study)*. Am J Cardiol, 2010. **106**(10): p. 1410-6.
 200. Klein, S.L. and K.L. Flanagan, *Sex differences in immune responses*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(10): p. 626-38.
 201. Aoki, S., et al., *Elevated peripheral blood mononuclear cell count is an independent predictor of left ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction*. J Cardiol, 2011. **57**(2): p. 202-7.
 202. Bauters, A., et al., *White blood cell and peripheral blood mononuclear cell counts for the prediction of left ventricular remodeling after myocardial infarction*. J Cardiol, 2011. **58**(2): p. 197-8; author reply 198.
 203. Tamura, A., T. Watanabe, and M. Nasu, *Association between neutrophil counts on admission and left ventricular function in patients successfully treated with primary coronary angioplasty for first anterior wall acute myocardial infarction*. Am J Cardiol, 2001. **88**(6): p. 678-80.
 204. Maekawa, Y., et al., *Prognostic significance of peripheral monocytosis after reperfused acute myocardial infarction: a possible role for left ventricular remodeling*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(2): p. 241-6.
 205. Tsujioka, H., et al., *Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(2): p. 130-8.
 206. Nunez, J., et al., *Low lymphocyte count in acute phase of ST-segment elevation myocardial infarction predicts long-term recurrent myocardial infarction*. Coron Artery Dis, 2010. **21**(1): p. 1-7.
 207. Borekci, A., et al., *Neutrophil to Lymphocyte Ratio Predicts Left Ventricular Remodeling in Patients with ST Elevation Myocardial Infarction after Primary Percutaneous Coronary Intervention*. Korean Circ J, 2016. **46**(1): p. 15-22.
 208. Seropian, I.M., et al., *Inflammatory markers in ST-elevation acute myocardial infarction*. Eur Heart J Acute Cardiovasc Care, 2016. **5**(4): p. 382-95.
 209. Khera, A., et al., *Race and gender differences in C-reactive protein levels*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(3): p. 464-9.
 210. Guillen, I., et al., *Cytokine signaling during myocardial infarction: sequential appearance of IL-1 beta and IL-6*. Am J Physiol, 1995. **269**(2 Pt 2): p. R229-35.
 211. Orn, S., et al., *Increased interleukin-1beta levels are associated with left ventricular hypertrophy and remodelling following acute ST segment elevation myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention*. J Intern Med, 2012. **272**(3): p. 267-76.
 212. Karpinski, L., et al., *Serum levels of interleukin-6, interleukin-10 and C-reactive protein in relation to left ventricular function in patients with myocardial infarction treated with primary angioplasty*. Kardiol Pol, 2008. **66**(12): p. 1279-85.

213. Weir, R.A., et al., *Interleukin-21--a biomarker of importance in predicting myocardial function following acute infarction?* Cytokine, 2012. **60**(1): p. 220-5.
214. Daniels, L.B. and A. Bayes-Genis, *Using ST2 in cardiovascular patients: a review.* Future Cardiol, 2014. **10**(4): p. 525-39.
215. Weir, R.A., et al., *Serum soluble ST2: a potential novel mediator in left ventricular and infarct remodeling after acute myocardial infarction.* J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(3): p. 243-50.
216. Coglianesi, E.E., et al., *Distribution and clinical correlates of the interleukin receptor family member soluble ST2 in the Framingham Heart Study.* Clin Chem, 2012. **58**(12): p. 1673-81.
217. Dayawansa, N.H., et al., *Role of MIF in myocardial ischaemia and infarction: insight from recent clinical and experimental findings.* Clin Sci (Lond), 2014. **127**(3): p. 149-61.
218. Chan, W., et al., *Macrophage migration inhibitory factor for the early prediction of infarct size.* J Am Heart Assoc, 2013. **2**(5): p. e000226.
219. Kobusiak-Prokopowicz, M., et al., *Kinetics of chemokines in acute myocardial infarction.* Kardiol Pol, 2005. **62**(4): p. 301-14; discussion 315-6.
220. Kobusiak-Prokopowicz, M., et al., *Chemokines and left ventricular function in patients with acute myocardial infarction.* Eur J Intern Med, 2007. **18**(4): p. 288-94.
221. Jourdan-Lesaux, C., J. Zhang, and M.L. Lindsey, *Extracellular matrix roles during cardiac repair.* Life Sci, 2010. **87**(13-14): p. 391-400.
222. Manhenke, C., et al., *The relationship between markers of extracellular cardiac matrix turnover: infarct healing and left ventricular remodelling following primary PCI in patients with first-time STEMI.* Eur Heart J, 2014. **35**(6): p. 395-402.
223. Eschalier, R., et al., *Extracellular matrix turnover biomarkers predict long-term left ventricular remodeling after myocardial infarction: insights from the REVE-2 study.* Circ Heart Fail, 2013. **6**(6): p. 1199-205.
224. Fertin, M., et al., *Serum MMP-8: a novel indicator of left ventricular remodeling and cardiac outcome in patients after acute myocardial infarction.* PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71280.
225. de Boer, R.A., et al., *Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression.* Eur J Heart Fail, 2009. **11**(9): p. 811-7.
226. Perea, R.J., et al., *Utility of galectin-3 in predicting post-infarct remodeling after acute myocardial infarction based on extracellular volume fraction mapping.* Int J Cardiol, 2016. **223**: p. 458-464.
227. Di Tano, G., et al., *Galectin-3 predicts left ventricular remodelling after anterior-wall myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention.* Heart, 2017. **103**(1): p. 71-77.
228. Ho, J.E., et al., *Galectin-3, a marker of cardiac fibrosis, predicts incident heart failure in the community.* J Am Coll Cardiol, 2012. **60**(14): p. 1249-56.
229. Daniels, L.B., et al., *Galectin-3 is independently associated with cardiovascular mortality in community-dwelling older adults without known cardiovascular disease: The Rancho Bernardo Study.* Am Heart J, 2014. **167**(5): p. 674-82.e1.
230. Gerling, I.C., et al., *Gene expression profiles of peripheral blood mononuclear cells reveal transcriptional signatures as novel biomarkers of cardiac remodeling in rats with aldosteronism and hypertensive heart disease.* JACC Heart Fail, 2013. **1**(6): p. 469-76.

231. Wingrove, J.A., et al., *Correlation of peripheral-blood gene expression with the extent of coronary artery stenosis*. *Circ Cardiovasc Genet*, 2008. **1**(1): p. 31-8.
232. Azuaje, F., Y. Devaux, and D.R. Wagner, *Integrative pathway-centric modeling of ventricular dysfunction after myocardial infarction*. *PLoS One*, 2010. **5**(3): p. e9661.
233. Azuaje, F., et al., *Transcriptional networks characterize ventricular dysfunction after myocardial infarction: A proof-of-concept investigation*. *J Biomed Inform*, 2010. **43**(5): p. 812-819.
234. Devaux, Y., et al., *Integrated protein network and microarray analysis to identify potential biomarkers after myocardial infarction*. *Funct Integr Genomics*, 2010. **10**(3): p. 329-37.
235. Azuaje, F.J., et al., *Information encoded in a network of inflammation proteins predicts clinical outcome after myocardial infarction*. *BMC Med Genomics*, 2011. **4**: p. 59.
236. Devaux, Y., et al., *Transforming growth factor beta receptor 1 is a new candidate prognostic biomarker after acute myocardial infarction*. *BMC Med Genomics*, 2011. **4**: p. 83.
237. Goretti, E., D.R. Wagner, and Y. Devaux, *miRNAs as biomarkers of myocardial infarction: a step forward towards personalized medicine?* *Trends Mol Med*, 2014. **20**(12): p. 716-25.
238. Zampetaki, A., et al., *Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction*. *J Am Coll Cardiol*, 2012. **60**(4): p. 290-9.
239. Bye, A., et al., *Circulating microRNAs predict future fatal myocardial infarction in healthy individuals - The HUNT study*. *J Mol Cell Cardiol*, 2016. **97**: p. 162-8.
240. Devaux, Y., et al., *Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction*. *Clin Chem*, 2012. **58**(3): p. 559-67.
241. Grabmaier, U., et al., *Diagnostic and prognostic value of miR-1 and miR-29b on adverse ventricular remodeling after acute myocardial infarction - The SITAGRAMI-miR analysis*. *Int J Cardiol*, 2017. **244**: p. 30-36.
242. Bauters, C., et al., *Circulating miR-133a and miR-423-5p fail as biomarkers for left ventricular remodeling after myocardial infarction*. *Int J Cardiol*, 2013. **168**(3): p. 1837-40.
243. Matsumoto, S., et al., *Circulating p53-responsive microRNAs are predictive indicators of heart failure after acute myocardial infarction*. *Circ Res*, 2013. **113**(3): p. 322-6.
244. Devaux, Y., et al., *MicroRNA-150: a novel marker of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction*. *Circ Cardiovasc Genet*, 2013. **6**(3): p. 290-8.
245. Liu, X., et al., *Circulating MicroRNA-146a and MicroRNA-21 Predict Left Ventricular Remodeling after ST-Elevation Myocardial Infarction*. *Cardiology*, 2015. **132**(4): p. 233-41.
246. Dubois-Deruy, E., et al., *MicroRNAs regulating superoxide dismutase 2 are new circulating biomarkers of heart failure*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 14747.
247. Viereck, J. and T. Thum, *Circulating Noncoding RNAs as Biomarkers of Cardiovascular Disease and Injury*. *Circ Res*, 2017. **120**(2): p. 381-399.
248. Ishii, N., et al., *Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction*. *J Hum Genet*, 2006. **51**(12): p. 1087-99.
249. Zangrando, J., et al., *Identification of candidate long non-coding RNAs in response to myocardial infarction*. *BMC Genomics*, 2014. **15**: p. 460.

250. Kumarswamy, R., et al., *Circulating long noncoding RNA, LIPCAR, predicts survival in patients with heart failure*. *Circ Res*, 2014. **114**(10): p. 1569-75.
251. Han, P., et al., *A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy*. *Nature*, 2014. **514**(7520): p. 102-106.
252. Zhang, J., et al., *Long Noncoding RNA MHRT Protects Cardiomyocytes against H2O2-Induced Apoptosis*. *Biomol Ther (Seoul)*, 2016. **24**(1): p. 19-24.
253. Yan, Y., et al., *Circulating Long Noncoding RNA UCA1 as a Novel Biomarker of Acute Myocardial Infarction*. *Biomed Res Int*, 2016. **2016**: p. 8079372.
254. Vausort, M., D.R. Wagner, and Y. Devaux, *Long noncoding RNAs in patients with acute myocardial infarction*. *Circ Res*, 2014. **115**(7): p. 668-77.
255. Devaux, Y., *Transcriptome of blood cells as a reservoir of cardiovascular biomarkers*. *Biochim Biophys Acta*, 2017. **1864**(1): p. 209-216.
256. Vausort, M., et al., *Myocardial Infarction-Associated Circular RNA Predicting Left Ventricular Dysfunction*. *J Am Coll Cardiol*, 2016. **68**(11): p. 1247-1248.
257. Melander, O., et al., *Plasma proneurotensin and incidence of diabetes, cardiovascular disease, breast cancer, and mortality*. *Jama*, 2012. **308**(14): p. 1469-75.
258. Januzzi, J.L., Jr., et al., *Circulating Proneurotensin Concentrations and Cardiovascular Disease Events in the Community: The Framingham Heart Study*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016. **36**(8): p. 1692-7.
259. Wettersten, N., et al., *Usefulness of Proneurotensin to Predict Cardiovascular and All-Cause Mortality in a United States Population (from the Reasons for Geographic and Racial Differences in Stroke Study)*. *Am J Cardiol*, 2018. **122**(1): p. 26-32.
260. Drum, C.L., et al., *Thymosin Beta-4 Is Elevated in Women With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction*. *J Am Heart Assoc*, 2017. **6**(6).
261. AlBadri, A., et al., *Inflammatory biomarkers as predictors of heart failure in women without obstructive coronary artery disease: A report from the NHLBI-sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE)*. *PLoS One*, 2017. **12**(5): p. e0177684.
262. Burkhardt, R., et al., *Integration of Genome-Wide SNP Data and Gene-Expression Profiles Reveals Six Novel Loci and Regulatory Mechanisms for Amino Acids and Acylcarnitines in Whole Blood*. *PLoS Genet*, 2015. **11**(9): p. e1005510.
263. Kirsten, H., et al., *Dissecting the genetics of the human transcriptome identifies novel trait-related trans-eQTLs and corroborates the regulatory relevance of non-protein coding locidagger*. *Hum Mol Genet*, 2015. **24**(16): p. 4746-63.
264. Azuaje, F.J., et al., *Systems-based approaches to cardiovascular biomarker discovery*. *Circ Cardiovasc Genet*, 2012. **5**(3): p. 360-7.
265. Higashimoto, K., et al., *Imprinting disruption of the CDKN1C/KCNQ1OT1 domain: the molecular mechanisms causing Beckwith-Wiedemann syndrome and cancer*. *Cytogenet Genome Res*, 2006. **113**(1-4): p. 306-12.
266. Sasaki, S., et al., *Clinical Usefulness of Immunohistochemical Staining of p57 kip2 for the Differential Diagnosis of Complete Mole*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 905648.
267. Khouja, M.H., et al., *The clinical importance of Ki-67, p16, p14, and p57 expression in patients with advanced ovarian carcinoma*. *Int J Gynecol Pathol*, 2007. **26**(4): p. 418-25.
268. Xu, X.Y., et al., *Clinical implications of p57 KIP2 expression in breast cancer*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012. **13**(10): p. 5033-6.

269. Rodriguez, I., et al., *Role of the CDKN1A/p21, CDKN1C/p57, and CDKN2A/p16 genes in the risk of atherosclerosis and myocardial infarction*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(5): p. 620-5.
270. Takagi, Y., *Adenovirus-mediated overexpression of a cyclin-dependent kinase inhibitor, p57Kip2, suppressed vascular smooth muscle cell proliferation*. *Hokkaido Igaku Zasshi*, 2002. **77**(3): p. 221-30.
271. Nakano, N., et al., *Downregulation of cyclin-dependent kinase inhibitor; p57(kip2), is involved in the cell cycle progression of vascular smooth muscle cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **338**(3): p. 1661-7.
272. Rodriguez, B.A., et al., *Estrogen-mediated epigenetic repression of the imprinted gene cyclin-dependent kinase inhibitor 1C in breast cancer cells*. *Carcinogenesis*, 2011. **32**(6): p. 812-21.
273. Miyazono, K., et al., *A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1*. *Embo j*, 1991. **10**(5): p. 1091-101.
274. Bristow, J., et al., *Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B*. *J Cell Biol*, 1993. **122**(1): p. 265-78.
275. Petersen, J.W. and J.Y. Douglas, *Tenascin-X, collagen, and Ehlers-Danlos syndrome: tenascin-X gene defects can protect against adverse cardiovascular events*. *Med Hypotheses*, 2013. **81**(3): p. 443-7.
276. Jing, L., et al., *Tenascin-x facilitates myocardial fibrosis and cardiac remodeling through transforming growth factor-beta1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma in alcoholic cardiomyopathy*. *Chin Med J (Engl)*, 2011. **124**(3): p. 390-5.
277. Takase, H. and Y. Dohi, *Kidney function crucially affects B-type natriuretic peptide (BNP), N-terminal proBNP and their relationship*. *Eur J Clin Invest*, 2014. **44**(3): p. 303-8.
278. Gabet, A., et al., *National trends in rate of patients hospitalized for heart failure and heart failure mortality in France, 2000-2012*. *Eur J Heart Fail*, 2015. **17**(6): p. 583-90.
279. Mayr, M., et al., *MicroRNAs within the continuum of postgenomics biomarker discovery*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013. **33**(2): p. 206-14.
280. Siemelink, M.A. and T. Zeller, *Biomarkers of coronary artery disease: the promise of the transcriptome*. *Curr Cardiol Rep*, 2014. **16**(8): p. 513.
281. 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*, 2011. **4**: p. 26.
282. Vargas, J., et al., *Use of the Corus(R) CAD Gene Expression Test for Assessment of Obstructive Coronary Artery Disease Likelihood in Symptomatic Non-Diabetic Patients*. *PLoS Curr*, 2013. **5**.
283. Pham, M.X., et al., *Gene-expression profiling for rejection surveillance after cardiac transplantation*. *N Engl J Med*, 2010. **362**(20): p. 1890-900.
284. Crespo-Leiro, M.G., et al., *Clinical usefulness of gene-expression profile to rule out acute rejection after heart transplantation: CARGO II*. *Eur Heart J*, 2016. **37**(33): p. 2591-601.
285. Pfister, R., et al., *Differential white blood cell count and incident heart failure in men and women in the EPIC-Norfolk study*. *Eur Heart J*, 2012. **33**(4): p. 523-30.
286. Nakada, Y., et al., *Sex differences in clinical characteristics and long-term outcome in acute decompensated heart failure patients with preserved and reduced ejection fraction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016. **310**(7): p. H813-20.

287. Kim, H.L., et al., *Gender Difference in the Prognostic Value of N-Terminal Pro-B Type Natriuretic Peptide in Patients With Heart Failure- A Report From the Korean Heart Failure Registry (KorHF)*. *Circ J*, 2017. **81**(9): p. 1329-1336.
288. Hartman, M.H.T., et al., *The contemporary value of peak creatine kinase-MB after ST-segment elevation myocardial infarction above other clinical and angiographic characteristics in predicting infarct size, left ventricular ejection fraction, and mortality*. *Clin Cardiol*, 2017. **40**(5): p. 322-328.
289. Omland, T., et al., *Impact of sex on the prognostic value of high-sensitivity cardiac troponin I in the general population: the HUNT study*. *Clin Chem*, 2015. **61**(4): p. 646-56.
290. Lyngbakken, M.N., et al., *Gender, High-Sensitivity Troponin I, and the Risk of Cardiovascular Events (from the Nord-Trondelag Health Study)*. *Am J Cardiol*, 2016. **118**(6): p. 816-821.
291. Lundberg, V., et al., *Diabetes as a risk factor for myocardial infarction: population and gender perspectives*. *J Intern Med*, 1997. **241**(6): p. 485-92.
292. Gustafsson, I., et al., *Influence of diabetes and diabetes-gender interaction on the risk of death in patients hospitalized with congestive heart failure*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. **43**(5): p. 771-7.
293. Juutilainen, A., et al., *Gender difference in the impact of type 2 diabetes on coronary heart disease risk*. *Diabetes Care*, 2004. **27**(12): p. 2898-904.
294. Clayton, J.A. and F.S. Collins, *Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies*. *Nature*, 2014. **509**(7500): p. 282-3.
295. http://ec.europa.eu/research/participants/docs/h2020-funding-guide/cross-cutting-issues/gender_en.htm.

RESUME

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Les coronaropathies ischémiques dont l'infarctus du myocarde (IDM) sont responsables de la moitié de ces décès. Après un IDM, le cœur met en place un processus de cicatrisation afin de pallier la mort des cardiomyocytes et la perte de contractilité. S'il est dérégulé, ce processus peut conduire à un remodelage ventriculaire gauche (RVG) délétère qui altère la fonction ventriculaire (FV) et prédispose à l'insuffisance cardiaque. La découverte de nouveaux biomarqueurs capables de prédire le risque du RVG pourrait permettre d'améliorer la prise en charge des patients à risque et ainsi de réduire l'incidence de l'insuffisance cardiaque. De nombreuses différences ont été mises en évidence entre les hommes et les femmes avec IDM, et ce au niveau de la pathophysiologie, des symptômes, des biomarqueurs et même du processus du RVG. Ces différences impliquent le besoin de découvrir des biomarqueurs spécifiques à chaque sexe ou d'utiliser les biomarqueurs actuels différemment chez les femmes et les hommes. L'objectif de ce travail de thèse a été de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs de la FV après un IDM. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux différences homme-femme dans les capacités prédictives de ces biomarqueurs.

La première étude a eu pour objectif de valider l'association de cinq gènes avec la FV après un IDM établie lors d'études préliminaires. Une combinaison de trois gènes (LTBP4, TGFBR1 et TNXB) a été identifiée comme étant capable d'améliorer la prédiction de la dysfonction ventriculaire par les marqueurs actuels. Dans un second temps, nous avons montré dans une cohorte nationale d'IDM que le peptide natriurétique NT-proBNP n'était pas capable de prédire la FV chez les femmes alors que la troponine cardiaque était associée avec la dysfonction ventriculaire dans ce groupe. Dans une troisième étude, nous avons mis en évidence l'association entre le gène CDKN1C et la dysfonction ventriculaire spécifiquement chez les femmes.

En conclusion, nos études contribuent à la découverte de nouveaux biomarqueurs du RVG post-IDM et attirent l'attention sur les différences hommes-femmes pour l'utilisation de ces biomarqueurs vers une médecine personnalisée.

Mots clés : *infarctus du myocarde – biomarqueur – gène - sexe – remodelage ventriculaire gauche*

ABSTRACT

Cardiovascular disease is the first cause of mortality worldwide. Ischemic heart diseases among which myocardial infarction (MI), are responsible for half of these deaths. In order to cope with the loss of cardiomyocytes after MI and to attenuate the alteration of contractility, a repair process is implemented in the heart. If this repair process is dysregulated, it could lead to a maladaptive left ventricular remodeling (LVR) altering LV function and leading to heart failure. The discovery of novel biomarkers able to predict accurately the risk of LVR could lead to a better management of the patients at risk and reduce the incidence of heart failure. Many differences have been highlighted between men and women with MI, regarding the pathophysiology, the symptoms, levels of cardiac biomarkers and the process of LVR. These differences imply the discovery of novel sex-specific biomarkers for LVR prediction or the use of the known biomarkers in a sex-specific manner. The aim of this work was to discover novel biomarkers of left ventricular function (LVF) after an AMI, focusing on sex-differences.

First, we aimed to validate the association between five genes previously found to be associated with LVF in small-scale studies. A panel of three genes (LTBP4, TGFBR1 and TNXB) was able to improve the ability of a clinical model to predict LVF. Second, we observed that the cardiac biomarker NT-proBNP was not predictor of LVF in women, whereas cardiac troponin was associated with LVF in this sex-group. A third study showed the association of the gene CDKN1C with LVF post-MI in a female-specific manner.

In conclusion, our studies contribute to the discovery of novel biomarkers of LVF and draw the attention to sex differences in the clinical use of biomarkers towards the implementation of personalized medicine.

Key words: *myocardial infarction – biomarker – gene - sex – left ventricular remodelling*