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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

ECOLE DOCTORALE BioSE
BIOLOGIE - SANTÉ - ENVIRONNEMENT
ED 266

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 **Adeline BOILEAU**

Biomarqueurs transcriptomiques sanguins des maladies cardiovasculaires

30 Novembre 2018

Membres du jury :

Rapporteurs :	**Mme Florence PINET**	PhD, DR INSERM, INSERM U744, Institut Pasteur de Lille, Lille, France
	Mme Florence DUMAS	PhD, MD, INSERM U970, Centre d'Expertise Mort Subite, Université Paris Descartes, Paris, France
Examinateurs :		
	M. Yvan DEVAUX	PhD, Unité de Recherche Cardiovasculaire, Luxembourg Institute of Health, Strassen, Luxembourg, directeur de thèse
	Mme Anne PIZARD	PhD, Directrice des affaires scientifiques, IBENS, Paris, France
	M. Natzi SAKALIHASAN	PhD, MD, Professeur et Chef du Centre de Recherche Chirurgical, Département de chirurgie cardiovasculaire et thoracique, Hôpital universitaire de Liège, Liège, Belgique
	M. Jean-Baptiste MICHEL	PhD, MD, DR INSERM, INSERM 1148, Laboratoire de science vasculaire translationnelle, Paris 7- Université Denis Diderot, Hôpital Xavier Bichat Paris, France

---

Unité de Recherche Cardiovasculaire, Luxembourg Institute of Health, 1A-B rue Thomas Edison, L-1445 Strassen

REMERCIEMENTS

Je souhaite vivement remercier le regretté Dr Daniel Wagner, tout d'abord pour m'avoir accueillie dans son laboratoire mais également pour sa grande gentillesse et sa grande humanité lors de mes stages de Master et au début de ma thèse.

Je remercie également le Dr Yvan Devaux, pour m'avoir accueillie également dans son laboratoire, pour m'avoir donné la chance de travailler dans son équipe et d'apprendre énormément à son contact, mais surtout pour avoir eu confiance en moi.

Je remercie chaleureusement les membres de mon jury de thèse : les Dr Florence Pinet et Dr Florence Dumas pour avoir accepté les rôles prenants de rapporteurs de thèse ; les Pr Natzi Sakalihasan, Dr Jean-Baptiste Michel et Dr Anne Pizard pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci également au Professeur Guillaume Jondeau, qui n'a malheureusement pas pu joindre ce jury, pour avoir accepté d'être membre du comité de suivi de ma thèse.

Un grand merci à toute l'équipe de l'Unité de Recherche Cardiovasculaire du LIH, pour votre implication dans mes différents projets, votre aide et vos conseils. Je suis particulièrement reconnaissante envers Antonio, Mélanie, Lu et Andrew pour leur disponibilité et leurs conseils avisés, envers François, Angela, Christelle et Bernadette pour leur expérience et leurs compétences ; et enfin envers Clarissa et Torkia, car partager un bureau avec vous fut un plaisir ! Enfin, un merci à Carine et Tania, pour leur grande aide dans l'organisation.

Je souhaite également remercier tous les collaborateurs ayant participés à mon projet de thèse : Mark Lindsay et Christian Lino Cardenas, merci beaucoup pour votre aide et vos compétences; Jean-Baptiste Michel et Catherine Deschildre, merci pour votre accueil et votre partage d'expérience et enfin Natzi Sakalihasan et Audrey Courtois, merci à vous pour votre partage de connaissances.

J'adresse ma vive reconnaissance envers les Fonds National de la Recherche pour avoir sélectionné et cru en ce projet, il y a maintenant 4 ans, et sans qui rien de cela n'aurait été possible.

Enfin, je remercie surtout tous mes proches pour m'avoir soutenue au cours de ces quatre dernières années. Vincent, un immense merci pour ton soutien sans faille qui m'a facilité la vie pendant cette longue aventure. Un très grand merci à ma famille également, mes parents, et Hélène, Camille et Renaud, qui m'ont toujours soutenue et encouragée malgré toutes les difficultés rencontrées.

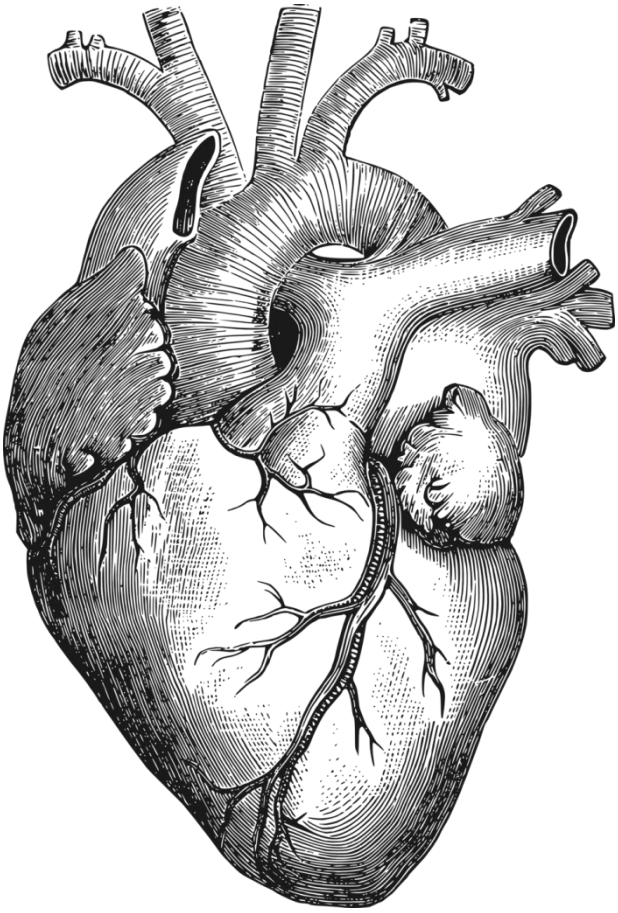


Image libre de droit tirée de phttp://www.publicdomainfiles.com

« *On ne voit bien qu'avec le cœur. L'essentiel est invisible pour les yeux* »

Antoine de Saint-Exupéry

« Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre »

Marie Curie

« Celui qui trouve sans chercher est celui qui a longtemps cherché sans trouver »

Gaston Bachelard

A tous mes proches …

LISTE DES TRAVAUX

Publications relatives à ce mémoire

Incremental Value of Circulating MiR-122-5p to Predict Outcome after Out of Hospital Cardiac Arrest.

Devaux Y, Salgado-Somoza A, Dankiewicz J, Boileau A, Stammet P, Schritz A, Zhang L, Vausort M, Gilje P, Erlinge D, Hassager C, Wise MP, Kuiper M, Friberg H, Nielsen N; TTM-trial investigators

Theranostics. 2017 Jun 25;7(10):2555-2564.

Endogenous Heparin Interferes with Quantification of MicroRNAs by RT-qPCR.

Boileau A, Lino Cardenas CL, Lindsay ME, Devaux Y

Clin Chem. 2018 May;64(5):863-865.

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

Boileau A, Lalem T, Vausort M, Zhang L, Devaux Y

Int J Cardiol. 2018 Mar 1;254:28-35.

MicroRNA-574-5p: A Circulating Marker of Thoracic Aortic Aneurysm

Boileau A, Lino Cardenas C, Courtois A, Lu Zhang, Rodosthenous RS, Das S, Natzi S, Michel JB, Lindsay ME, Devaux Y

(Soumise à ATVB, sous révision)

Circulating levels of miR-574-5p are associated with neurological outcome after cardiac arrest in females

Adeline Boileau, Antonio Salgado Somoza,, Josef Dankiewicz, Pascal Stammet, Patrik Gilje, David Erlinge, Christian Hassager, Matthew P. Wise, Michael Kuiper, Hans Friberg, Niklas Nielsen, Yvan Devaux, and the TTM-trial investigators.

(Soumise à Resuscitation)

Publication non présentée dans ce mémoire

Epigenetics in ascending thoracic aortic aneurysm and dissection

Boileau A, Lindsay ME, Michel JB, Devaux Y

Aorta (Stamford). 2018;61:1-12.

Communication orale

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

Boileau A, Lalem T, Vausort M, Zhang L, Devaux Y

Annual meeting of the European Council for Cardiovascular Research (ECCR), Garde, Octobre 2017

Posters

The retrotransposon VL30 in myocardial injury

Boileau A, Salgado-Somoza A, Zangrando J, Zhang L, Vausort M, Maskali F, Marie PY, Devaux Y

European Society Summer School, Nice, Juin 2017

MicroRNA-574-5p: A Circulating Marker of Thoracic Aortic Aneurysm

Adeline Boileau, MSc[1], Christian L. Lino Cardenas, PharmD MSc PhD[2], Audrey Courtois, PhD[3]; Lu Zhang, MSc[1]; Rodosthenis S. Rodosthenous, ScD[2], Saumya Das MD, PhD[2], Natzi Sakalihasan MD, PhD[3], Jean-Baptiste Michel, MD, PhD[4]; Mark E. Lindsay MD, PhD[2]; Yvan Devaux, PhD[1]

Sixth International Meeting on Aortic Diseases, Liège, Septembre 2018

LISTE DES ABREVIATIONS

AAT	Anévrisme de l'aorte thoracique
AC	Arrêt cardiaque
ACTA2	Actine aortique des muscles lisses alpha2
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
Ago2	Argonaute 2
AHA	Association américaine du cœur ou *American Heart association*
AIC	Critère d'information d'Akaike ou *Akaike information criterion*
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférents
ARNm	ARN messager
ARNpi	ARN interagissant avec le complexe protéique Piwi
ARNr	ARN ribosomique
ARNrasi	Petits ARN interférents associés aux répétitions
ARNt	ARN de transfert
ARNti	Petits ARN issus du clivage des ARNt dû au stress
ATP	Adénosine tri-phosphate
AUC	Aire sous la courbe ou *Area under the curve*
AVC	Accident vasculaire cérébral
BAV	Bicuspidie de la valve aortique
BNP	peptide natri-urétique de type B
BPCO	Broncho-pneumopathie chronique obstructive
circARN	ARN circulaires
CML	Cellules musculaires lisses
COL3A1	Collagène de type III a1
CPC	Catégorie de performance cérébrale
CPK	Créatines phospho-kinases
Ct	Cycle de réplication
c-TnT	Troponine cardiaque T
c-TnT-us	Troponine cardiaque T ultrasensible
DNAse	Désoxyribonucléase

eARN	ARN amplificateur
ECG	Electrocardiogramme
EFEMP2	Fibuline-4
FBN1	Fibrilline-1
FE	Fraction d'éjection
FISH	Hybridation *in situ* en fluorescence
FV	Fibrillation ventriculaire
GRACE	*Global Registry of Acute Coronary Events*
HIF1a	Sous-unité alpha du facteur 1 inductible par l'hypoxie ou *hypoxia inducible facto 1a*
HR	Ratio de risque ou *hazard ratio*
IC	Insuffisance cardiaque
ICP	Intervention coronaire percutanée
IDI	Critère d'amélioration intégré ou *integrated discrimination improvement*
IM	Infarctus du myocarde
IMC	Indice de masse corporelle
LMNB1	Lamine B1
lncARN	ARN long non-codant
LOX	Lysyl oxydase
LTBP4	Protéine latente 4 liée au facteur de croissance transformant beta
LUCKY	*Luxembourg Acute Myocardial Infarction Registry*
MCV	Maladies cardiovasculaires
MEC	Matrice extracellulaire
MFAP5	Glycoprotéine associée micro-fibrillaire 5
miARN	MicroARN
MIAT	*Myocardial infarction associated transcript*
MICRA	*Myocardial Infarction-associated Circular RnA*
MMP	Métallo peptidases matricielles
MMP9	Metallo peptidase matricielle 9
MYH11	Chaîne lourde 11 de la myosine
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
NRI	Index de la reclassification ou *net reclassification index*
NSE	Enolase neurospécifique ou *neuron-specific enolase*
NSTEMI	Infarctus du myocarde sans décalage du segment ST
NT-proBNP	N-terminal pro-peptide natri-urétique

OMS	Organisation mondiale de la santé
OR	Risque relatif ou *odd ratio*
pARNi	Petits ARN interférents
PBS	Tampon phosphate salin ou *phosphate buffered saline*
PCR	Polymérisation en chaine ou *Polymerase chain reaction*
PRKG1	Protéine kinase CGMP-dépendante de type I
RACS	Retour à une circulation spontanée
RCP	Réanimation cardiopulmonaire
RNAse	Ribonucléase
ROC	*Receiver operating characteristic*
scaARN	Petits ARN des corps de Cajal
snARN	Petits ARN nucléaires
snoARN	Petits ARN nucléolaires
SNORD68	S*mall Nucleolar RNA, C/D Box 68*
snRNP	Complexes ribonucléiques-protéiques
STEMI	Infarctus du myocarde avec décalage du segment ST
TGFBR1	Récepteur de type 1 au TGF-β
TGFBR2	Récepteur de type 2 au TGF-β
TGF-β	Facteur de croissance transformant beta
TNXB	Ténascine XB
TTM	*Target Temperature Management trial*
TV	Tachycardie ventriculaire
VE	Vésicules extracellulaires
Wt	Wild-type
(CI 95%)	Intervalle de confiance à 95%

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1: Le coeur humain 21
Figure 2: Représentation du système cardiovasculaire 23
Figure 3: Représentation du cycle de contraction cardiaque 23
Figure 4: La structure des parois vasculaires, comparaison entre artères, veines et capillaires. 25
Figure 5: Les différents segments aortiques 26
Figure 6: Athérosclérose et IM 30
Figure 7: Le remodelage ventriculaire post-IM 32
Figure 8: Localisation des anévrismes de l'aorte thoracique 35
Figure 9: La dissection aortique 35
Figure 10: Valves aortiques biscupside et tricupside 36
Figure 11: Dogme central de la biologie moléculaire d'après Watson et Crick. 47
Figure 12: Les familles d'ARN. 50
Figure 13: Transcription des ARNm. 52
Figure 14: Représentation simplifiée de la réaction d'épissage 53
Figure 15: Biogénese et fonction des miARN 56
Figure 16: Représentation schématique de différents modes d'action des lncARN 58
Figure 17: Formation des vésicules extracellulaires porteuses d'ARN circulant. 60
Figure 18: La classification CPC 91
Figure 19: Scan d'une puce à miARN contenant huit échantillons 103
Figure 20: Transcription inverse et PCR quantitative d'ARNm et d'ARN non-codants courts grâce au système miScript PCR system de Qiagen 104

Tableaux

Tableau 1. Caractéristiques de la sous-cohorte PAMI 85
Tableau 2. Caractéristiques de la cohorte tissu AAT-Paris. 87
Tableau 3. Caractéristiques de la cohorte sérum AAT-Liège 89
Tableau 4. Caractéristiques de la cohorte TTM et des sous-cohortes sérum et plasma 92
Tableau 5: Caractéristiques des amorces utilisées pour mesurer l'expression des ARNm par PCR quantitative 106

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS 1

LISTE DES TRAVAUX 3

LISTE DES ABREVIATIONS 5

TABLE DES ILLUSTRATIONS 8

Figures 8

Tableaux 8

TABLE DES MATIERES 9

INTRODUCTION 13

PRESENTATION GENERALE DU MANUSCRIT 19

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 21

1. Chapitre 1 : Les maladies cardiovasculaires 21

1.1. Le cœur 21

1.1.1. Anatomie 21

1.1.2. Fonctionnement et cycle cardiaque 22

1.2. Les vaisseaux 24

1.2.1. Les artères et les veines 24

1.2.2. L'aorte 26

1.3. Epidémiologie des MCV 27

1.4. Les MCV étudiées 29

1.4.1. L'IM 29

1.4.2. L'AAT 34

1.4.3. L'AC 40

2. Chapitre 2 : Le transcriptome 47

2.1. Définitions 47

2.1.1. La théorie centrale de la biologie moléculaire 47
2.1.2. Molécules ADN, molécules ARN 47
2.1.3. Le transcriptome & les familles d'ARN 48
2.2. Les ARN codants ou ARNm 51
2.2.1. La transcription 51
2.2.2. Maturation & épissage 52
2.2.3. Traduction 54
2.2.4. Epigénétique : définition 54
2.3. Les microARN 54
2.3.1. Génèse 55
2.3.2. Mécanisme de fonctionnement 57
2.4. Les ARN long non-codants 57
2.5. Le transcriptome sanguin 59
2.5.1. Transport 59
2.5.2. Origine et association avec les MCV 61
3. Chapitre 3 : Intérêt du transcriptome comme réservoir de biomarqueurs des maladies cardiovasculaires 63
3.1. Enjeux des biomarqueurs 63
3.1.1. Concept de médecine personnalisée 63
3.1.2. Définition et qualités des biomarqueurs 63
3.1.3. Biomarqueurs et MCV 65
3.1.4. Outils de mesure des biomarqueurs transcriptomiques sanguins 66
3.2. Transcriptome sanguin et potentiel de biomarqueur dans les MCV 68
3.2.1. Risque avant l'IM, diagnostic et évolution de la fonction cardiaque post-IM 68
3.2.2. Risque de développer un AAT et de dissection aortique 76
3.2.3. Risque de subir un AC, évolution neurologique et survie post-AC 79
MATERIELS & METHODES 83
1. Cohortes de patients 83

1.1. Cohorte LUCKY 83
1.2. Les cohortes anévrisme aortique 86
1.2.1. La cohorte tissu AAT-Paris 86
1.2.2. Cohorte sérum AAT-Liège 88
1.3. Cohorte TTM & sous-cohortes sérum et plasma 90
2. Protocoles expérimentaux 93
2.1. Traitement des souris 93
2.1.1. Mesure du diamètre aortique 93
2.1.2. Récupération des tissus, plasma et VEs 94
2.2. Culture et traitement des CML 95
2.2.1. Isolation et culture 95
2.2.2. Traitement 95
3. Analyses biochimiques 95
3.1. Comptage des VE 95
3.2. Hybridation in situ en fluorescence et marquages immunochimiques 96
3.3. Mesure de l'héparine 97
4. Analyses moléculaires 98
4.1. Extraction d'ARN total 98
4.1.1. A partir de sérum ou de plasma 98
4.1.2. A partir de sang total : tubes PAXgene™ 99
4.1.3. A partir de de tissu murin ou de VE 100
4.1.4. A partir de tissu humain 100
4.2. Analyse quantitative et qualitative de l'ARN 101
4.3. Ajout d'héparine et traitement de l'ARN avec héparinase 101
4.4. Puces à miRNA 102
4.5. Transcription inverse et PCR quantitative en temps réel 103
4.5.1. Etape de transcription inverse 103
4.5.2. PCR quantitative 105

5. Analyses bio-informatiques 110

6. Analyses statistiques 110

RESULTATS 113

1. Etude n°1: Interférence de l'héparine endogène avec la transcription inverse et la PCR quantitative 113

2. Etude n°2 : Trois transcrits sanguins prédicteurs de la fonction cardiaque après un infarctus du myocarde 115

3. Etude n°3 : Le miR-574-5p : biomarqueur diagnostique potentiel de l'anévrisme de l'aorte thoracique 117

4. Etudes n°4 & n°5 : Valeur prédictive des microARN envers l'évolution neurologique et la survie post-arrêt cardiaque 121

4.1. Valeur prédictive du miR-122-5p 121

4.2. Valeur prédictive du miR-574-5p et spécificité liée au sexe 123

DISCUSSION 125

❖ Enjeux et limites des techniques utilisées pour mesurer l'expression du transcriptome sanguin (Etude 1) 125

❖ Le transcriptome dans les cellules sanguines et l'IM (Etude 2) 128

❖ Valeur diagnostique et prédictive des miARN dans les MCV 130

- Valeur du miR-574-5p dans l'AAT (Etude 3) 131
- Valeur du miR-122-5p dans l'AC (Etude 4) 134
- Valeur du miR-574-5p dans l'AC (Etude 5) 136

❖ Accent porté sur la spécificité des miARN 139

❖ Potentiel thérapeutique du transcriptome sanguin 143

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES 147

BIBLIOGRAPHIE 149

RESUME 183

ABSTRACT 183

INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent actuellement la première cause de mortalité en Europe, et dans le monde. De plus, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime que les MCV seront toujours la première cause de mortalité dans le monde en 2030 [1].

Certaines MCV sont nommées aigues : elles correspondent à une urgence vitale, nécessitant d'être diagnostiquées et prises en charge rapidement. Parmi elles, l'infarctus du myocarde (IM) et la dissection de l'aorte thoracique sont des MCV aigues et sévères qui peuvent mener à la survenue d'une autre MCV aigue telle que l'arrêt cardiaque (AC) [2]. D'autres MCV sont chroniques, comme l'anévrisme de l'aorte thoracique (AAT), et elles peuvent être associées au développement d'affections aigues telles que la dissection aortique.

Après leur survenue, ces maladies peuvent évoluer de plusieurs manières. Ainsi, un IM, qui correspond à une blessure ischémique du muscle cardiaque [3], peut conduire par la suite au développement d'une dysfonction cardiaque ou insuffisance cardiaque (IC) [4]. Un AAT est une dilatation de l'aorte dans sa partie thoracique, asymptomatique, et donc difficile à diagnostiquer [5]. Il induit une fragilisation de la paroi aortique, ce qui la rend sujette à des affections aortiques sévères telles que la dissection aortique [6]. Enfin, l'AC correspond à l'arrêt de fonctionnement du cœur. Lorsqu'il est extrahospitalier, il est associé à un taux de survie faible (10%) [7], et est associé à une mauvaise évolution neurologique pour la moitié des survivants [8].

La capacité à prédire l'évolution de ces maladies est un enjeu primordial. Elle permettrait d'adapter finement les traitements en adéquation avec la balance bénéfice/risque et les besoins réels du patient, jusqu'à finalement aboutir à une médecine personnalisée.

Actuellement, l'utilisation des biomarqueurs sanguins protéiques participent au diagnostic et pronostic des MCV. Toutefois, l'utilisation de ces biomarqueurs, couplée à d'autres paramètres, ne permet pas encore de prédire assez précisément l'évolution de ces maladies pour adapter totalement la prise en charge des patients. La découverte de nouveaux biomarqueurs est ainsi essentielle.

En parallèle, le transcriptome représente tous les transcrits composés d'acides ribonucléiques (ARN) produits par les cellules : 2% de ces transcrits sont les ARN messagers (ARNm) et codent pour des protéines [9]; le reste des transcrits constitue les ARN non codants qui ne codent pour aucune protéine.

Parmi eux, les longs ARN non codants (lncARN) contiennent plus de 200 nucléotides, à l'inverse du groupe des petits ARN non codants, qui contient entre autres la famille des microARN (miARN). Les ARN non codants ont des capacités régulatrices leur permettant de modifier l'expression de leur gène cible ou de réguler des fonctions physiologiques [10]. Leur implication dans les MCV a été démontrée [11].

Le transcriptome sanguin regroupe les transcrits présents dans le sang. Ils sont exprimés dans les cellules sanguines, ou sont présents dans la circulation, encapsulés dans des vésicules extracellulaires (VE) ou associés à des complexes protéiques ou lipidiques [12]. Ces VE peuvent être sécrétées par la plupart des types cellulaires, et sont supposées être libérées dans la circulation sanguine pour atteindre une cellule ou un tissu cible, de manière paracrine [13]. Il a été montré que des miARN transportés par des VE étaient capables de moduler l'expression de leur gène cible dans des cellules ayant incorporé ces VE. Le rôle et le contenu des VE est seulement en cours de caractérisation, mais laisse entrevoir de nombreuses possibilités diagnostiques et thérapeutiques.

Le transcriptome sanguin dispose ainsi de plusieurs atouts comme source de biomarqueurs : il est facilement accessible, de manière peu invasive, et présente une expression relativement stable grâce à la protection conférée par les cellules sanguines, les VE ou les protéines auxquelles il peut être associé. Il représente donc un vivier à nouveaux biomarqueurs.

La mesure de l'expression d'un groupe de 23 ARNm exprimés dans les cellules sanguines est actuellement utilisée pour diagnostiquer les maladies coronariennes [14]. Un autre test, AlloMap®, utilise également l'expression des ARNm dans le sang pour distinguer les patients souffrant d'un rejet après une greffe cardiaque [15]. Ces kits représentent les seuls tests diagnostiques commercialisés basés sur l'utilisation du transcriptome sanguin. Toutefois, les niveaux circulants de nombreux ARN non codants (et en particulier de miARN) sont dérégulés dans les MCV, telles que l'IM[16-19], l'AAT[20,21] et l'AC[22,23]. Ces résultats esquissent le potentiel de biomarqueur diagnostique et pronostique du transcriptome sanguin dans les MCV.

Hypothèses de travail & objectifs

Ce travail est basé sur l'hypothèse que le transcriptome sanguin, et en particulier les ARNm et les miARN, présente un potentiel de biomarqueur diagnostique et/ou pronostique dans certaines MCV.

Ainsi, nous nous sommes intéressés au potentiel de biomarqueur de certains transcrits sanguins (ARNm et miARN) dans différents contextes cardiovasculaires : l'évolution post-IM, le diagnostic de l'AAT et l'évolution post-AC.

Dans une première étude plutôt technique, nous nous sommes intéressés à l'influence qu'un inhibiteur endogène, l'héparine, pouvait avoir sur la mesure de l'expression des transcrits (en particulier des miARN) par transcription inverse et PCR quantitative. Nous avons utilisé des échantillons de plasma et de sérum provenant de personnes saines, auxquels des concentrations croissances d'héparine ont été ajoutées.

Dans une seconde étude, nous avons déterminé le potentiel de biomarqueur pronostique de l'évolution de la fonction cardiaque 4 mois post-IM d'un panel de 3 transcrits codants exprimés dans le sang total. La cohorte LUCKY a été impliquée dans cette étude. Elle contient des patients ayant subi un IM pour lesquels un prélèvement sanguin a été effectué après la reperfusion.

Au cours de la troisième étude, nous avons identifié un miARN, le miR-574-5p, comme nouveau marqueur diagnostique potentiel de l'AAT. Plusieurs cohortes de patients ont été impliquées dans cette étude :

- La cohorte AAT-Liège, comprenant des patients ayant un AAT et des contrôles sains pour lesquels des échantillons de sérum ont été récupérés.
- La Bio-banque de tissus cardiovasculaires de l'unité LVTS 11 contenant des tissus aortiques de patients ayant eu un AAT et de personnes saines [24].

Le modèle murin $Fbn1^{C1039G/+}$ a également été utilisé dans cette étude. Il est caractérisé par une mutation sur le gène de la fibrilline-1 (FBN1), menant au développement d'AAT spontanés.

Les quatrième et cinquième études visaient à identifier des miARN avec un potentiel de biomarqueur de l'évolution neurologique post-AC.

Elles impliquent toutes les deux la cohorte TTM (*Target Temperature Management trial)*, un essai multicentrique international qui comprend 939 patients recrutés au niveau de 36 sites. Les patients avaient été admis en unité de soins intensifs, inconscients, suite à un AC. 590 patients pour lesquels

des échantillons de sang et les informations cliniques étaient disponibles ont été inclus dans nos 2 sous-études.

Chacune de ces études a conduit à la rédaction d'un article :

- Etude 1

Endogenous Heparin Interferes with Quantification of MicroRNAs by RT-qPCR.

Boileau A, Lino Cardenas CL, Lindsay ME, Devaux Y

Clin Chem. 2018 May;64(5):863-865.

- Etude 2

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

Boileau A, Lalem T, Vausort M, Zhang L, Devaux Y

Int J Cardiol. 2018 Mar 1;254:28-35.

- Etude 3

MicroRNA-574-5p: A Circulating Marker of Thoracic Aortic Aneurysm

Boileau A, Lino Cardenas C, Courtois A, Lu Zhang, Rodosthenous RS, Das S, Natzi S, Michel JB, Lindsay ME, Devaux Y

(Soumise à ATVB, sous révision)

- Etude 4

Incremental Value of Circulating MiR-122-5p to Predict Outcome after Out of Hospital Cardiac Arrest.

Devaux Y, Salgado-Somoza A, Dankiewicz J, Boileau A, Stammet P, Schritz A, Zhang L, Vausort M, Gilje P, Erlinge D, Hassager C, Wise MP, Kuiper M, Friberg H, Nielsen N; TTM-trial investigators

Theranostics. 2017 Jun 25;7(10):2555-2564.

- Etude 5

MiR-574-5p is a female specific biomarker of neurological outcome after cardiac arrest – A TTM-Trial Sub-study

Adeline Boileau MSc[1], Pascal Stammet, MD, PhD[2], Antonio Salgado Somoza, PhD[1], Yvan Devaux, PhD[1], and the TTM-trial investigators.

(Soumise à Resuscitation)

J’ai également pu, au cours de ma thèse, participer à la rédaction d’un article de revue bibliographique :

Epigenetics in ascending thoracic aortic aneurysm and dissection

Boileau A, Lindsay ME, Michel JB, Devaux Y

Aorta (Stamford). 2018;61:1-12.

Contribution personnelle dans chaque étude

Dans l'étude 1, j'ai contribué à la partie expérimentale en effectuant l'extraction d'ARN, le traitement à l'héparinase, la transcription inverse, la PCR quantitative pour certains échantillons. J'ai procédé à l'analyse de toutes les données et ai rédigé la première version de l'article.

Dans l'étude 2, ma contribution fut essentiellement technique : j'ai effectué les PCR quantitatives pour certains échantillons et j'ai participé à l'analyse des résultats.

L'étude 3 a été le cœur de mon projet de thèse. Au cours de cette étude, j'ai procédé à l'extraction ARN depuis les tissus aortiques à la transcription inverse, la PCR quantitative. J'ai bénéficié de l'aide et de l'expérience de François Massart pour ces étapes. J'ai également bénéficié de l'aide importante d'Angela Tavares Furtado pour l'extraction d'ARN, la transcription inverse et la PCR quantitative depuis les sérums de patients issus de la bio-banque de Liège. J'ai effectué les puces à miARN et Lu Zhang m'a beaucoup aidée pour l'analyse des résultats obtenus ainsi que pour les analyses bioinformatiques. La génération d'un modèle murin de souris développant des AAT et les expériences d'hybridation in situ en fluorescence (FISH) ont été menées à Boston, par nos collaborateurs Mark Lindsay et Christian Lino Cardenas et leur équipe. J'ai également participé à la rédaction de l'article.

Ma contribution fut essentiellement technique dans l'étude 4, puisque j'ai participé aux PCR quantitatives effectuées sur certains échantillons et à l'analyse des résultats.

Au cours de l'étude 5, j'ai participé aux PCR quantitatives effectuées sur certains échantillons et ai effectué l'analyse des résultats. J'ai rédigé la première version de l'article.

PRESENTATION GENERALE DU MANUSCRIT

Ce manuscrit est divisé en cinq grandes parties.

La première partie est une étude bibliographique résumant l'état de l'art du sujet traité. En premier lieu, elle présente les maladies étudiées au cours de cette thèse : l'IM, l'AAT et l'AC. Ensuite, elle fournit une présentation des caractéristiques du transcriptome. Enfin, elle présente l'intérêt des ARN comme biomarqueurs des MCV et en particulier de l'IM, l'AAT et l'AC.
La seconde partie est méthodologique et présente les cohortes de patients, les modèles animaux, les lignées cellulaires et les techniques de biologie moléculaire impliqués dans ce travail.
La troisième partie présente les résultats obtenus.
La quatrième partie discute ces résultats.
La cinquième et dernière partie conclut et propose des perspectives ouvertes par ce travail.

Cette thèse a été menée à l'Unité de Recherche Cardiovasculaire du *Luxembourg Institute of Health*, sous la direction du Dr Yvan Devaux. Elle a été financée par les Fonds Nationaux de la Recherche du Luxembourg.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Chapitre 1 : Les maladies cardiovasculaires

1.1. Le cœur

Le cœur est l'organe majeur du système cardiovasculaire. En se contractant régulièrement, il assure la circulation sanguine et approvisionne tous les autres organes en dioxygène et en nutriments.

1.1.1. Anatomie

Le cœur est divisé en deux moitiés (droite et gauche) par le septum inter-ventriculaire. Chacune est elle-même composée d'une oreillette (ou atria) et d'un ventricule.

Le cœur contient ainsi quatre cavités. Le ventricule droit est délimité par la valve tricuspide du côté de l'oreillette droite et par la valve pulmonaire du côté de l'artère pulmonaire. Parallèlement, la valve mitrale marque l'entrée du ventricule gauche et la valve aortique marque sa sortie vers l'aorte (**Figure 1**).

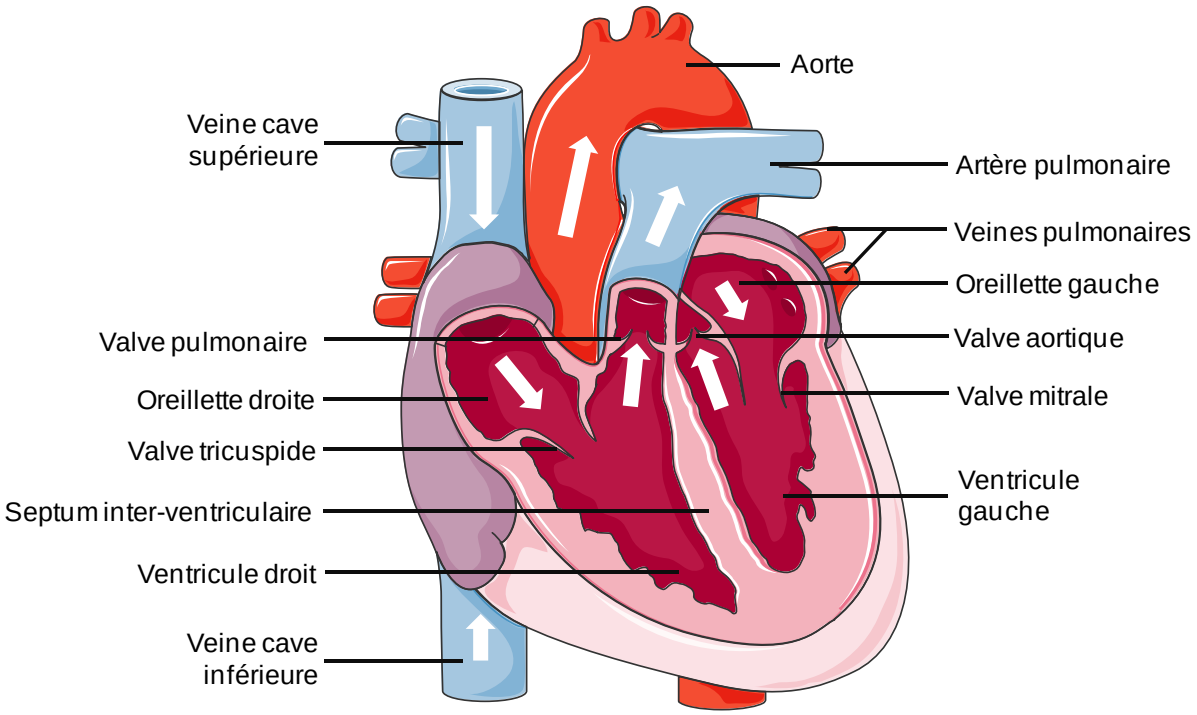


Figure 1: Le coeur humain

(⇨ :sens de la circulation sanguine ; Image extraite de la banque d'image Servier Medical Art ®)

Le cœur est composé de différentes tuniques, respectivement de l'intérieur vers l'extérieur :

- L'endocarde est une fine tunique au contact du sang : il est composé d'un endothélium à sa surface, puis il contient une couche de tissu conjonctif sous-jacente composée de fibres élastiques et de cellules musculaires lisses (CML). Les replis de l'endocarde forment les valves cardiaques, qui empêchent le sang de refluer.
- Le myocarde est le muscle cardiaque, qui confère au cœur sa puissance d'éjection. C'est une tunique épaisse composée majoritairement de cardiomyocytes, mais également de fibroblastes.
- Le péricarde est la tunique externe : il a principalement un rôle de protection. Il entoure le cœur et la base des vaisseaux entrant ou sortant du cœur (artères aortes, pulmonaires ; veines caves et pulmonaires). Il comprend plusieurs feuillets et un espace, de l'intérieur vers l'extérieur: l'épicarde (couche séreuse interne) placée directement entre le myocarde et l'espace péricardique. Cet espace est lui-même délimité par une seconde couche séreuse, la couche pariétale. La couche pariétale est finalement elle-même entourée par une autre couche séreuse.

Le cœur est lui-même irrigué par les artères et les veines coronaires, présentes à sa surface. L'irrigation de la moitié cardiaque gauche est assurée par le tronc commun coronaire gauche, qui se divise en différentes artères coronaires (interventriculaire antérieure, circonflexe, diagonales, marginales et septales). Parallèlement, la moitié droite est irriguée par l'artère coronaire droite et les petites artères issues de cette dernière (marginale du bord droit, rétro-ventriculaire gauche, interventriculaire postérieure).

1.1.2. Fonctionnement et cycle cardiaque

Le cœur, via ses deux moitiés (droite et gauche), génère deux circuits distincts (**Figure 2**) :

- L'oreillette droite collecte le sang désoxygéné par les veines caves et le transmet au ventricule droit. Ce dernier envoie le sang désoxygéné vers les poumons où il sera déchargé en dioxyde de carbone et chargé en dioxygène. La moitié droite du cœur est ainsi en charge de « la petite circulation ».
- Parallèlement, l'oreillette gauche reçoit le sang oxygéné provenant des poumons via les veines pulmonaires et le transmet au ventricule gauche. Ce dernier éjecte le sang oxygéné vers tous les organes via l'aorte, dans « la grande circulation » ou circulation systémique.

Le ventricule gauche est plus important en taille, en puissance et en fonction que le ventricule droit, car il assure la circulation systémique qui nécessite une puissance d'éjection supérieure à celle de la petite circulation (qui concerne uniquement le cœur et les poumons).

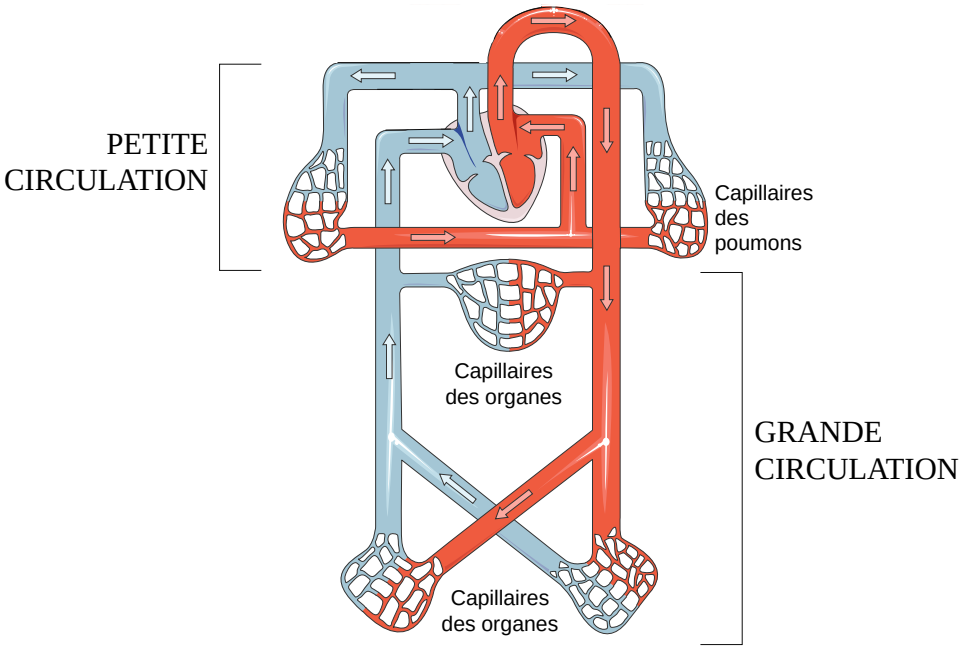


Figure 2: Représentation du système cardiovasculaire

Image extraite et modifiée à partir de la banque d'image Servier Medical Art ®

Lors du cycle de contraction cardiaque, la phase de remplissage des oreillettes et des ventricules est nommée diastole, et correspond à la décontraction du muscle cardiaque. A l'inverse, la phase de contraction est notée systole. La systole peut être divisée en deux temps : la systole auriculaire qui sera suivie de la systole ventriculaire. Cette dernière correspond à la contraction simultanée des cardiomyocytes ventriculaires et constitue également la phase d'éjection des ventricules (**Figure 3**).

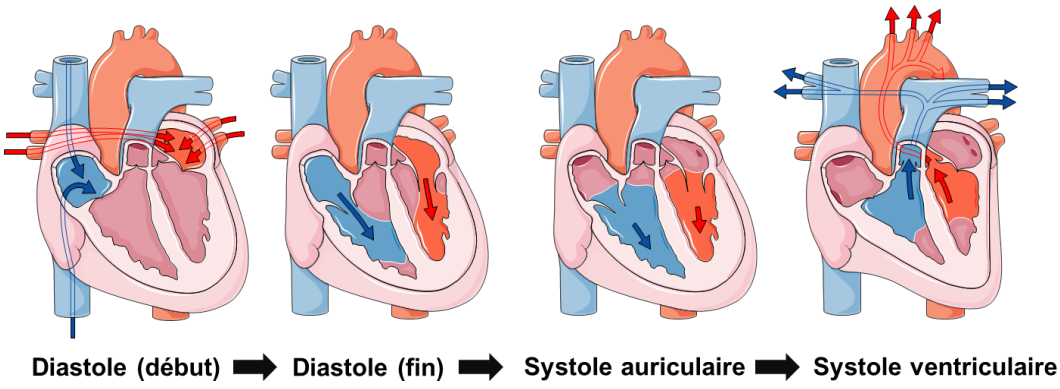


Figure 3: Représentation du cycle de contraction cardiaque

Images extraites et modifiées à partir de la banque d'image Servier Medical Art ®

La fraction d'éjection du ventricule gauche (FE) est mesurée pour estimer la fonction cardiaque. Elle correspond au calcul suivant : ((volume télé diastolique – volume télé systolique)/volume télé diastolique) x 100. Le volume télé diastolique se mesure à la fin de la diastole, lorsque le ventricule est plein ; alors que le volume télé systolique est mesuré à la fin de la systole, après l'éjection. Chez les individus sains, elle est supérieure à 50%, avec une valeur moyenne de 62.3% [25].

Le cœur se contracte de manière autonome. Le tissu nodal est à l'origine de la contraction cardiaque. Il est formé par les cardiomyocytes électriques présents dans le myocarde et est organisé en nœuds et faisceaux (respectivement, nœud sinusal, nœud atrio-ventriculaire, faisceau de His, branches de Tawara et réseau de Purkinjé).

En mettant en mouvement le sang, le cœur transmet une force mécanique à ce fluide. Cette force constitue l'hémodynamisme, que le sang va appliquer sur les organes qui le contiennent (le cœur et les vaisseaux).

1.2. Les vaisseaux

1.2.1. Les artères et les veines

Les vaisseaux représentent le second composant du système cardiovasculaire. Ils sont divisés en trois catégories: les artères, les veines et les capillaires:

- Les artères sont les vaisseaux qui partent du cœur vers les organes. Elles transportent du sang oxygéné, à l'exception de l'artère pulmonaire.
- Les veines partent des organes pour rejoindre le cœur. Elles véhiculent du sang désoxygéné, à l'exception des veines pulmonaires.
- Les capillaires sont des vaisseaux au calibre très fin (entre 10 et 20 µm). Présents dans tous les organes, ils assurent la vascularisation de chaque cellule présente dans un organe. Ils sont le lieu d'échange entre les nutriments et le dioxygène apportés par le sang ; et les déchets métaboliques et le dioxyde de carbone générés par les cellules.

Comme le cœur, les vaisseaux sont généralement constitués de trois tuniques, de l'intérieur vers l'extérieur (**Figure 4**) :

- L'intima qui est un endothélium : c'est une couche monocellulaire en contact avec le sang. Dans les veines, il existe des valvules qui empêchent le sang de refluer. Elles sont constituées de replis de l'intima.
- La media est la couche intermédiaire. Elle est séparée de l'intima par une limitante élastique. Elle contient toujours des CML et des fibres élastiques et de collagène mais en proportion variable en fonction du rôle du vaisseau qui la contient.
- L'adventice est majoritairement composée de tissu conjonctif. Au niveau des vaisseaux de calibre important (comme l'aorte), elle peut également contenir des nerfs (*nervi vascularis*) et de petits vaisseaux (*vasa vasorum*) qui vont irriguer la media. Elle peut être séparée de la media par une limitante élastique externe dans les artères.

Les vaisseaux possédant un petit calibre tels que les capillaires sont uniquement composés par un endothélium.

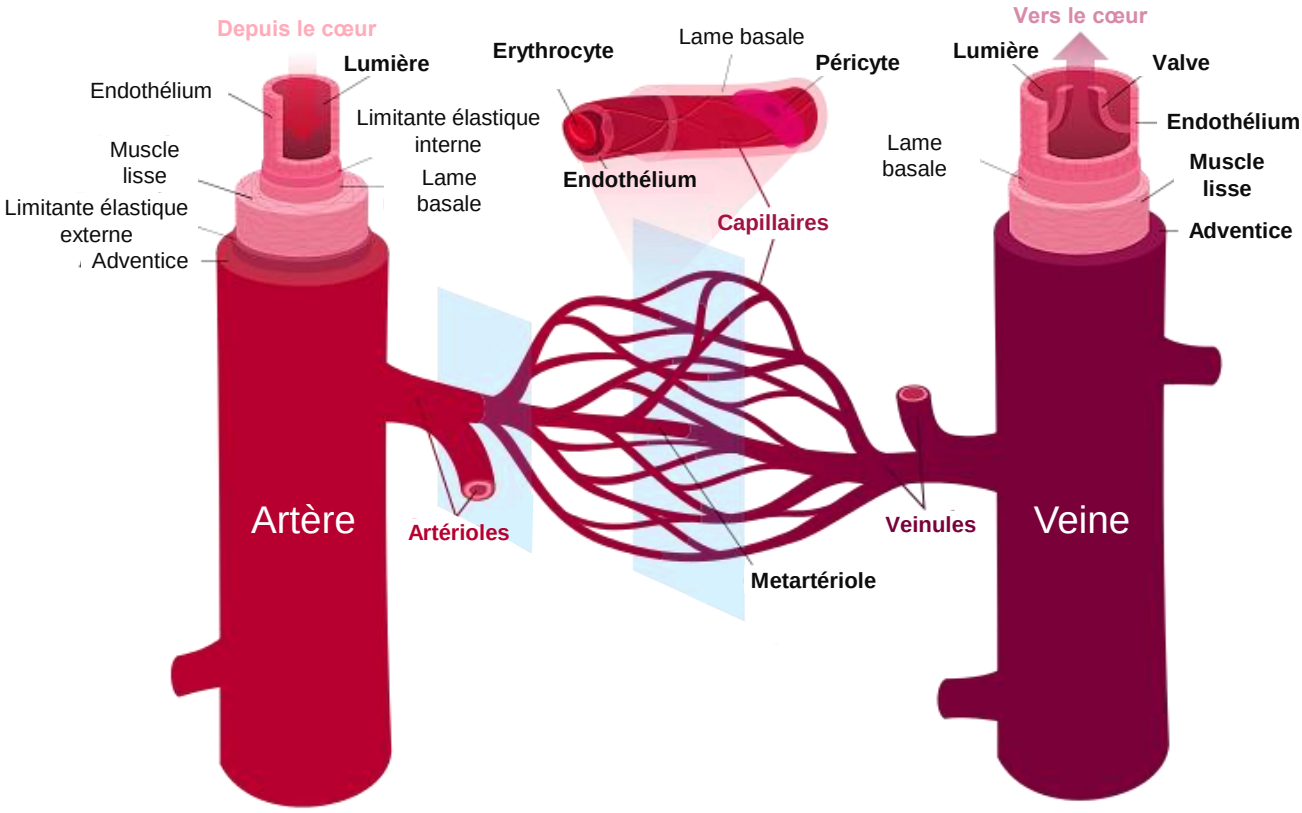


Figure 4: La structure des parois vasculaires, comparaison entre artères, veines et capillaires. Image traduite et extraite depuis https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blood_vessels-en.svg

Les vaisseaux sont soumis aux forces de l'hémodynamisme, qui est un processus continu, variable se traduisant par des tensions appliquées sur leur paroi, appelées contraintes de cisaillement.

1.2.2. L'aorte

L'aorte est l'artère la plus large du corps humain, avec un diamètre d'environ 30 mm à sa base [26], à la sortie du ventricule gauche. Elle est divisée en différentes sections, depuis la sortie du ventricule gauche, respectivement: la racine aortique, la jonction sino-tubulaire, l'aorte ascendante, l'arche aortique et enfin l'aorte descendante qui est-elle même divisée en aorte thoracique (au-dessus du diaphragme) et aorte abdominale (en dessous du diaphragme, **Figure 5**). Le diamètre aortique diminue dans les segments les plus éloignés du cœur : l'aorte descendante aortique mesure environ 25mm [26].

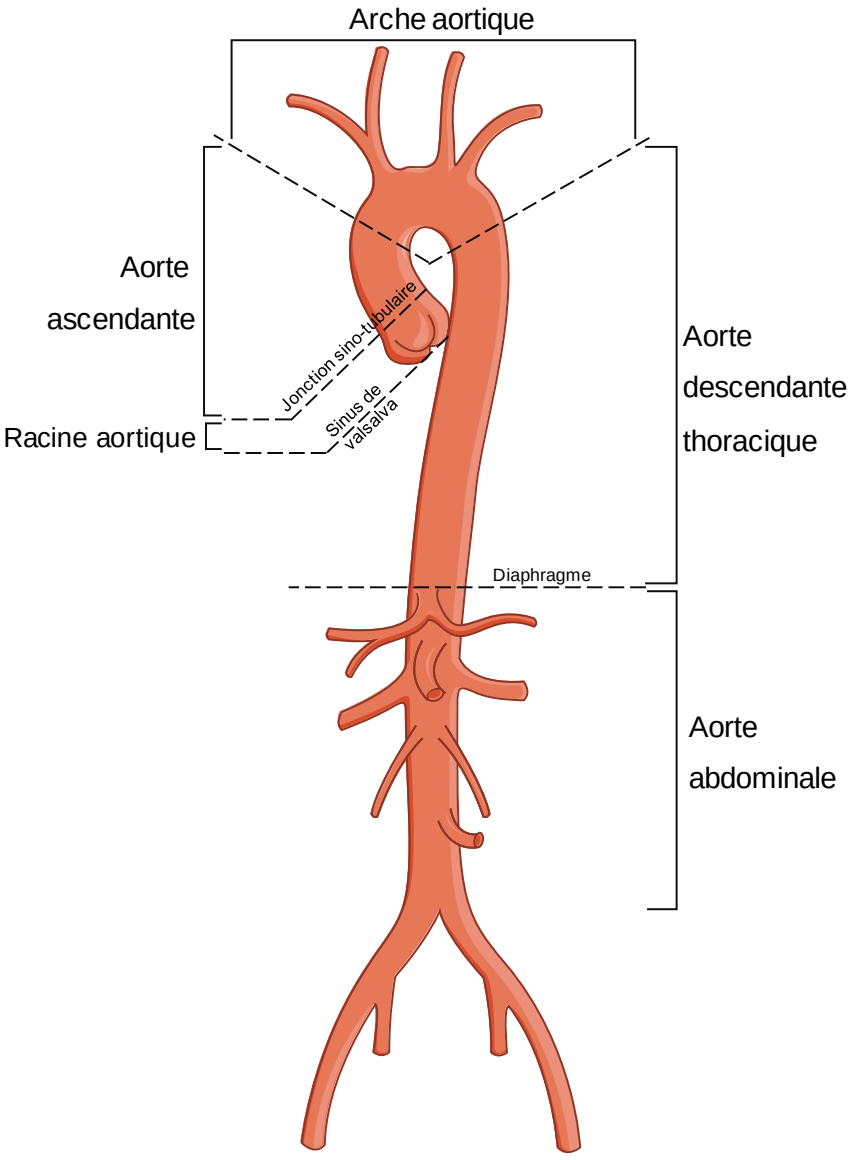


Figure 5: Les différents segments aortiques

Image extraite et modifiée à partir de la banque d'image Servier Medical Art ®

Le diamètre aortique augmente tout au long de la vie à un taux de 0.9mm/décade chez les hommes et 0.7mm/décade chez les femmes [27], sans toutefois dépasser 40mm. La taille du diamètre aortique est également associée à la surface corporelle et à l'indice de masse corporelle (IMC) [28]. Bien que la ou les causes précises de cet élargissement ne soient pas précisément connues, l'âge et la modification des compositions de collagène et d'élastine de la media aortique sont supposément responsables de ce mécanisme [29].

La media aortique contient généralement un seul type cellulaire, des CML, ainsi qu'une grande quantité de fibres élastiques (élastine) et de collagène. Cette forte élasticité est essentielle au bon fonctionnement de l'aorte et lui confère sa compliance. En effet, au cours de la systole ventriculaire, la valve aortique s'ouvre et 50% du volume sanguin éjecté par le ventricule est envoyé directement dans la circulation systémique. Les 50% restants sont stockés dans les artères élastiques telles que l'aorte. Pendant la diastole, la valve aortique est fermée. La pression chute progressivement dans l'aorte qui, grâce à ses propriétés élastiques, restitue la force mécanique qu'elle a reçue pendant la systole et renvoie ainsi le volume sanguin qu'elle contenait dans la circulation systémique [30]. L'aorte est ainsi impliquée dans l'hémodynamisme en assurant une fonction de tampon et en transformant le flot sanguin ponctuel éjecté par le ventricule gauche en flux sanguin presque continu.

Tout au long de la vie, la paroi aortique reçoit de fortes pressions sanguines, subit et s'adapte aux tensions produites par l'hémodynamisme. Ainsi, des modifications histologiques, observées chez des personnes âgées, sont associées à l'âge : une fragmentation des fibres d'élastine, une interruption de la lamelle élastine, de la fibrose et une perte de noyaux des CML. L'origine de ces modifications n'est pas connue. Toutefois, leur localisation laisse supposer qu'elles découlent de blessures et de cicatrisations de la paroi aortique causées par les tensions hémodynamiques [26].

1.3. Epidémiologie des MCV

Les MCV regroupent un ensemble de maladies qui touchent le cœur ou les vaisseaux, ou les deux à la fois. L'OMS rapportait en 2016 qu'elles étaient la première cause de mortalité dans le monde et en Europe (avec respectivement 31.4% et 43.3% des décès) [1]. En particulier, les cardiopathies coronariennes et les accidents vasculaires cérébraux sont responsables de la majorité de ces décès dans le monde (respectivement 16.6% et 10% des décès de l'année 2016). Pour l'année 2030, les

prévisions de l'OMS annoncent que les maladies cardiovasculaires resteront la première cause de décès mondiale [1].

Les MCV sont divisées en sous-groupes :

- les cardiopathies coronariennes, telles que l'IM, qui touchent à la fois les vaisseaux coronariens et le cœur
- les maladies cérebro-vasculaires telles que les accidents vasculaires cérébraux (AVC), qui atteignent les vaisseaux cérébraux et le cerveau
- l'hypertension, qui concerne majoritairement les vaisseaux mais qui touche différents organes à long terme (principalement le cœur et les reins), en modifiant l'hémodynamisme
- les artériopathies périphériques, qui regroupent les différentes maladies touchant les vaisseaux approvisionnant les membres inférieurs et supérieurs
- les thromboses veineuses profondes et embolies pulmonaires, dues à la formation d'un caillot au niveau des veines et ses conséquences lorsque ce dernier migre dans la circulation
- l'IC et les troubles du rythme cardiaque, qui atteignent le cœur et peuvent affecter son fonctionnement
- les malformations cardiaques congénitales qui sont des anomalies structurelles du cœur, présentes avant la naissance

Les causes, évolutions et traitements de ces maladies sont nombreux, différents et complexes. Toutefois, certains facteurs sont reconnus comme favorisant la survenue d'une MCV. Certains ne peuvent être modifiés, tels que l'âge, le sexe ou une prédisposition génétique. D'autres sont liés à des habitudes, des comportements et peuvent être corrigés : le tabagisme, le manque d'exercice physique, de mauvaises habitudes alimentaires et l'obésité, une consommation excessive d'alcool [1], la consommation de drogues de type opioïde [31]. Enfin, d'autres sont liés à l'existence d'une autre maladie et doivent être médicalement surveillés, tels que l'hypertension artérielle, le diabète et l'hypercholestérolémie [1].

De nombreuses MCV sont ainsi des maladies chroniques, difficiles voire impossibles à guérir actuellement. Certaines de ces maladies sont caractérisées par une évolution lente associée à une dégradation des capacités physiques (et parfois cognitives) du patient, une qualité de vie diminuée [32], des soins et des hospitalisations fréquents [33] et des taux de dépression plus élevés [34,35]. Certains facteurs de risque des MCV étant modifiables, la prévention représente un enjeu de santé publique primordial pour éviter la survenue de ces maladies souvent complexes et coûteuses à traiter.

Des outils, basés sur les facteurs de risques des MCV, sont utilisés pour évaluer le risque de développer une MCV. Parmi eux, les scores Framingham et GRACE sont les plus utilisés.

Le score Framingham, repose sur l'étude de la cohorte Framingham, composée de 5345 personnes suivies pendant 12 ans. Il prédit, sur 10 ans, le risque de développer une maladie coronarienne et repose sur un algorithme qui prend en compte l'âge, le sexe, les niveaux de cholestérol totaux et à haute densité, le tabagisme, la pression systolique et les traitements utilisés pour la traiter si utilisés [36].

Le score GRACE est calculé à partir de l'âge, du nombre de battements cardiaques/minute, de la pression systolique, des niveaux de créatinine, de la présence d'un AC lors de l'admission, d'une déviation des segments ST sur l'ECG, de niveaux anormaux des enzymes cardiaques et enfin de la gravité de l'événement cardiaque selon la classification de Killip Kimball. Il permet d'estimer le risque de mourir [37], de développer une IC [38], ou un AVC [39] dans les 6 mois suivant la survenue d'un événement coronarien.

1.4. Les MCV étudiées

Au cours de ce travail, nous nous sommes focalisés sur trois MCV en particulier : l'IM, l'AAT et l'AC.

1.4.1. L'IM

Cliniquement, l'IM a été défini par la société européenne de cardiologie (ou *European Society of Cardiology*) en 2012 [3] comme « une blessure du myocarde accompagnée d'une nécrose dans un contexte clinique concordant avec une ischémie myocardique ». L'IM est une cardiopathie coronarienne fréquente: une personne en est victime toutes les 34 secondes aux Etats-Unis, et il est associé à un taux de mortalité de 15% [40].

Les facteurs de risque associés à l'IM sont : l'hypertension, le diabète, l'obésité abdominale, l'activité physique, la consommation d'alcool, le tabagisme et le stress psychosocial (présence de dépression, stress global, stress financier) [41].

1.4.1.1. Angine de poitrine et survenue de l'IM

L'angine de poitrine est cliniquement caractérisée par une douleur près du sternum, qui peut diffuser dans les membres supérieurs, la mâchoire et parfois dans le dos [42]. Elle survient généralement pendant un effort ou au cours d'un stress mais peut aussi se produire spontanément. Physiologiquement, elle correspond à la réduction du débit sanguin d'une artère coronaire. Cette réduction peut être due à une contraction spasmodique, une sténose de l'artère ou à la présence d'une plaque d'athérosclérose dans l'artère. Une plaque d'athérosclérose est une accumulation focale de lipides, de produits sanguins, de glucides complexes, de dépôts calcaires et de tissu fibreux. Le muscle cardiaque souffrira de ces conditions ischémiques partielles et ponctuelles, responsables la douleur thoracique caractéristique de l'angine de poitrine.

L'obstruction de l'artère coronaire peut aussi être totale, comme par exemple suite à la rupture d'une plaque athéromateuse, ou suite à une contraction spasmodique. Le réseau coronaire étant terminal et sans suppléance, la zone cardiaque normalement irriguée par cette artère coronaire sera en condition d'ischémie totale tant que l'artère sera obstruée. Cet épisode d'ischémie myocardique correspond au syndrome aigu coronarien. Lorsque qu'il se prolonge, il induit la nécrose de la zone ischémique : cette nécrose myocardique, c'est l'IM (**Figure 6**).

Les IM peuvent être de taille et de localisation différente, n'importe quelle artère de l'arbre coronaire peut être obstruée.

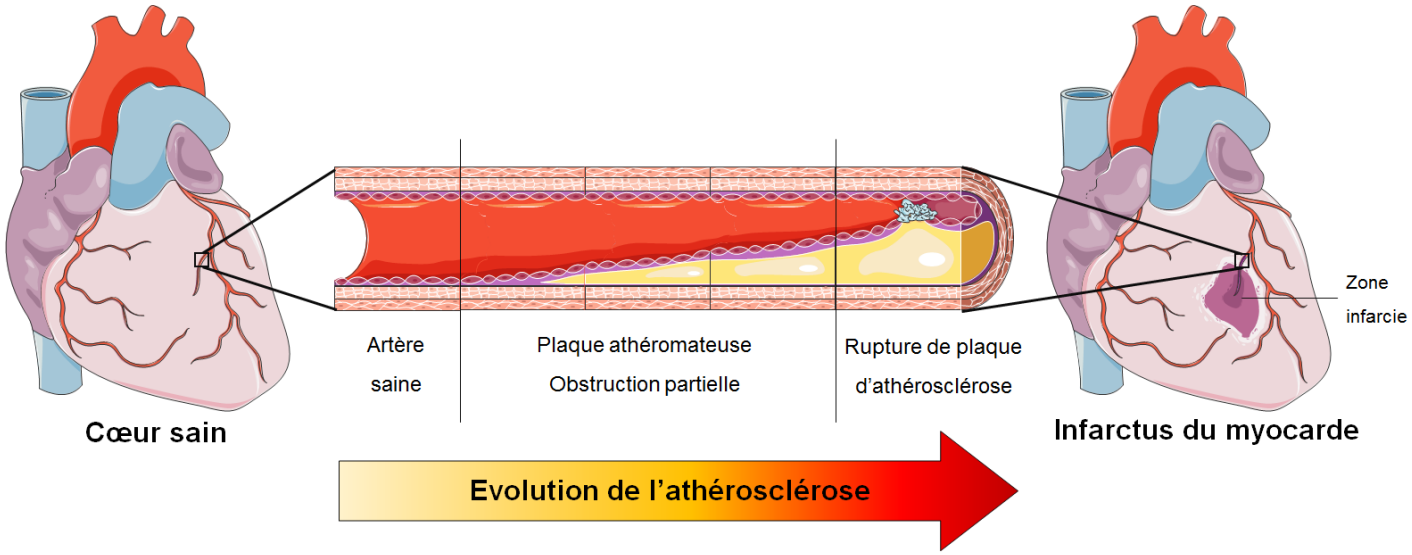


Figure 6: Athérosclérose et IM

Images extraites et modifiées à partir de la banque d'image Servier Medical Art ®

Plus le temps d'ischémie est long, plus la nécrose du muscle cardiaque et le risque de séquelles ou de mort augmentent. Il importe donc de diagnostiquer et de traiter rapidement un IM.

1.4.1.2. Diagnostic

Une forte douleur thoracique semblable à l'angine de poitrine, mais persistante (jusque plusieurs heures) est symptomatique d'un IM. La validation du diagnostic d'IM repose sur des examens complémentaires : la mesure de marqueurs sanguins et un électrocardiogramme (ECG). Les marqueurs sanguins mesurés peuvent être les créatines phospho-kinases (CPK) ou la créatine kinase MB, enzymes sécrétées par les cellules cardiaques et musculaires endommagées ou encore les troponines cardiaques T (c-TnT) ou I, enzymes spécifiques du myocarde. La détection de la c-TnT a été améliorée dernièrement : une mesure à haute sensibilité permet de mesurer des concentrations de c-TnT aussi faibles que 3ng/L [43]. Les niveaux de c-TnT mesurés avec ce dispositif sont nommés c-TnT ultra-sensible (c-TnT-us).

Selon les recommandations de l'ESC, l'élévation d'un de ces marqueurs (idéalement la c-TnT) au-dessus du 99th percentile supérieur à la limite de référence est une caractéristique de l'IM [3]. Pour valider le diagnostic d'IM, cette dernière doit s'accompagner soit de douleur symptomatique d'une ischémie, soit de preuves (par des examens tels qu'une angiographie) de la présence d'un thrombus intra-coronaire, soit de preuves d'une perte d'une partie du myocarde ou soit de modifications visibles sur l'ECG [44]. Parmi ces modifications, un décalage du segment ST peut être observé et permet de classer l'IM comme un IM avec décalage du segment ST (STEMI). Toutefois, ce décalage n'est pas toujours présent et dans ce cas l'IM est sans décalage du segment ST (NSTEMI). Un IM peut aussi entraîner l'apparition de l'onde Q pathologique (qui est un signe de nécrose) sur l'ECG [44]. Au cours d'un IM, la blessure peut être si étendue qu'elle peut toucher le tissu nodal ou fragiliser considérablement le cœur, entraînant la survenue de complications telles qu'une fibrillation ventriculaire (FV) ou une rupture cardiaque.

1.4.1.3. Remodelage ventriculaire

Après la survenue d'un IM, l'artère coronaire encombrée sera désobstruée au cours d'une angioplastie ou intervention coronaire percutanée (ICP), qui consiste à insérer un cathéter à ballonnet dans une artère périphérique (généralement l'artère fémorale), jusqu'au niveau de l'obstruction coronaire. Le ballonnet est alors gonflé pour dilater l'artère et permettre sa désobstruction. Le retour du flux sanguin dans l'artère coronaire est vérifié par angiographie. Cependant, pour une proportion de patients allant jusque 50%, la désobstruction effective de l'artère coronaire ne conduit pas au retour total de la

circulation : cette complication est l'obstruction microvasculaire [45], et elle est associée à une altération du pronostic cardiovasculaire post-IM [46].

Pour les zones cardiaques et les patients non affectés par cette complication, la zone infarcie sera de nouveau irriguée et recevra subitement une grande quantité de dioxygène. Cette reperfusion, bien que nécessaire, induit elle aussi des dommages dus au stress oxydant et l'ensemble des blessures observées dans la zone infarcie seront appelées blessures d'ischémie-reperfusion.

Pendant les heures qui suivent la survenue de l'IM, les phénomènes de nécrose et d'apoptose stimulent le recrutement de cellules immunitaires provenant de la circulation sanguine vers la zone infarcie. Ces dernières sont majoritairement des macrophages et des monocytes, qui induisent et participent au phénomène de cicatrisation de la zone infarcie. Le tissu cicatriciel nouvellement formé est majoritairement fibreux. Il permet le maintien de l'intégrité du myocarde, mais est responsable d'une réduction de la contractilité de la zone infarcie et par extension, d'une réduction de la contractilité cardiaque.

Pour continuer à fonctionner convenablement face à cette nouvelle situation, le cœur va s'adapter grâce au remodelage ventriculaire post-IM (**Figure 7**). Ce phénomène est complexe et est défini comme un « ensemble de modifications moléculaires, cellulaires et interstitielles qui se manifestent par des changements de taille, forme et fonction cardiaque suite à une blessure du cœur » [47].

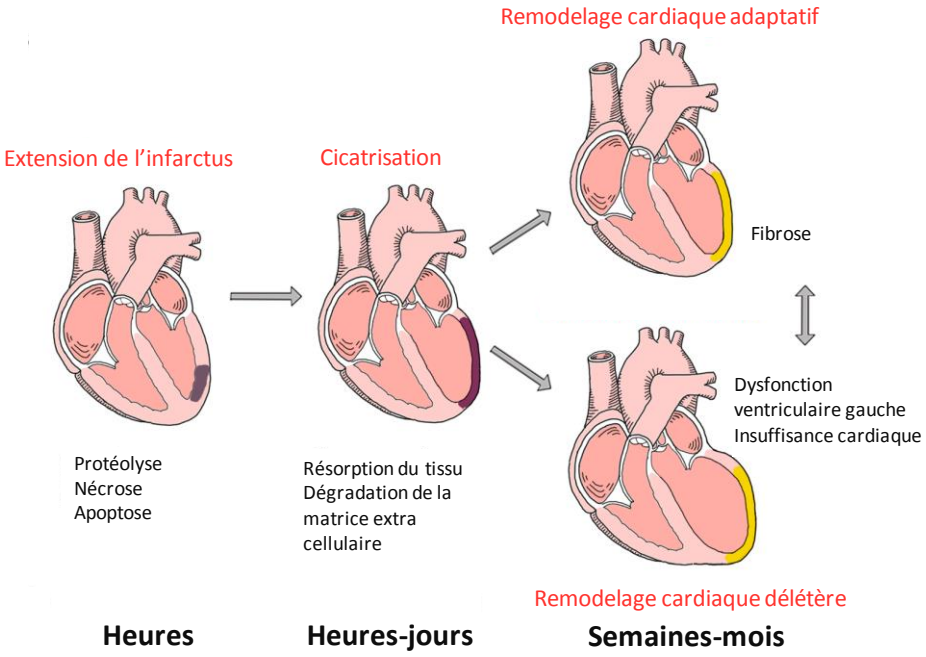


Figure 7: Le remodelage ventriculaire post-IM

Image modifiée à partir de Gombozhapova et al, 2017 [48]

Le remodelage cardiaque peut être bénéfique et peut permettre au cœur de retrouver un équilibre semblable à celui qu'il avait avant l'IM. Inversement, le remodelage peut échouer à rétablir l'équilibre cardiaque. Il est alors nommé délétère et les mécanismes d'adaptation qui le caractérise seront responsables de la dégradation progressive de la fonction cardiaque, qui évoluera vers l'IC. De plus, le remodelage délétère est associé avec des prévalences accrues de rupture cardiaque, d'arythmie et de formation d'anévrisme [49].

Pour faciliter l'adaptation du cœur à sa nouvelle condition, et limiter la récidive d'IM, différents facteurs associés à la circulation sont traités. En premier lieu, l'hypertension est traitée grâce à l'utilisation de bétabloquants ou d'antagonistes du calcium (en cas de contre-indication aux bétabloquants), d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, d'inhibiteurs des récepteurs de l'angiotensine II et parfois de diurétiques. Les statines permettent d'éviter les récidives d'IM. Enfin, la coagulation du sang est traitée avec de l'aspirine ou du clopidogrel pour limiter l'apparition de caillots (et donc de récidive de l'IM).

Toutefois, l'utilisation de ces traitements ne permet pas le rétablissement d'une fonction cardiaque normale chez les personnes atteintes d'un remodelage délétère. En revanche, elle assure un ralentissement de la dégradation progressive de la fonction cardiaque, menant à l'IC.

La stratification des patients à fort risque de développer une IC post-IM permettrait d'affiner le traitement appliqué aux patients. Ainsi, au cours de l'étude 2, nous nous sommes intéressés à des biomarqueurs potentiels capables de prédire l'évolution de la fonction cardiaque post-IM.

1.4.1.4. L'insuffisance cardiaque

Cliniquement, l'IC a été caractérisée par l'ESC selon ses symptômes typiques tels « qu'un essoufflement, des œdèmes aux membres inférieurs et de la fatigue, elle peut être accompagnée par différents signes (pression élevée dans la veine jugulaire, crépitements pulmonaires et des œdèmes périphériques), causée par une anomalie cardiaque structurelle et/ou fonctionnelle responsable d'une éjection cardiaque réduite et/ou des pressions intracardiaques élevées, au repos et lors d'un stress » [50]. Le terme d'IC regroupe des symptômes et des états hétérogènes. Ainsi, selon la gravité des symptômes, quatre grades d'IC ont été distingués par l'association cardiaque de New York [51]. Quatre stades, basés sur la fonction cardiaque, ont également été déterminés par l'association américaine du cœur (AHA ou *American Heart association*) [52]. La gravité de l'IC peut également être estimée par la mesure des taux sanguins de peptide natri-urétique de type B (BNP) et sa forme non active le N-

terminal pro-peptide natri-urétique de type B (NT-proBNP). Le NT-proBNP est secrété par les cardiomyocytes en réponse à un étirement, une activation endocrine et une hypoxie du myocarde [53]. Ainsi, une augmentation de leur sécrétion est corrélée avec la gravité de l'IC.

Des traitements permettant de traiter l'hypertension et de ménager le muscle cardiaque sont disponibles pour traiter les symptômes de l'IC ou pour ralentir son évolution [52]. Ces traitements sont semblables à ceux donnés suite à un IM, et visent à renforcer la fonction cardiaque, éviter la rétention d'eau et limiter l'hypertension.

Toutefois, l'IC reste incurable et est associée à une réduction importante de la mobilité, de la qualité de vie et un coût de soins élevé. Pour les stades les plus avancés, seule la transplantation cardiaque permet de rétablir une fonction cardiaque entièrement fonctionnelle. Cette dernière option ne permet pas toutefois de récupérer une qualité de vie similaire à celle avant l'IC, elle induit des conséquences sur la qualité de vie telle qu'un développement de cancers plus important que la population saine [54]. La prévention et la détection des patients ayant un risque de développer une IC au long terme (après un IM, ou suite à une autre cause) revêt alors une importance toute particulière. Différents marqueurs pronostiques de survie ou d'hospitalisation ont été identifiés chez les patients souffrant d'IC, mais leur application en clinique reste limitée [50]. Le développement de marqueurs pronostiques fiables et utilisables cliniquement est essentiel pour permettre une meilleure stratification des patients.

1.4.2. L'AAT

Un AAT est un « élargissement progressif de l'aorte en sa partie thoracique d'au moins 50% du diamètre, associé à une perte du parallélisme des parois vasculaires » [5]. Cette maladie a une incidence de 10 pour 100 000 personnes [55].

Les AAT peuvent se produire au niveau de chaque segment aortique, mais surviennent plus fréquemment au niveau de l'aorte ascendante et de l'aorte descendante thoracique (**Figure 8**).

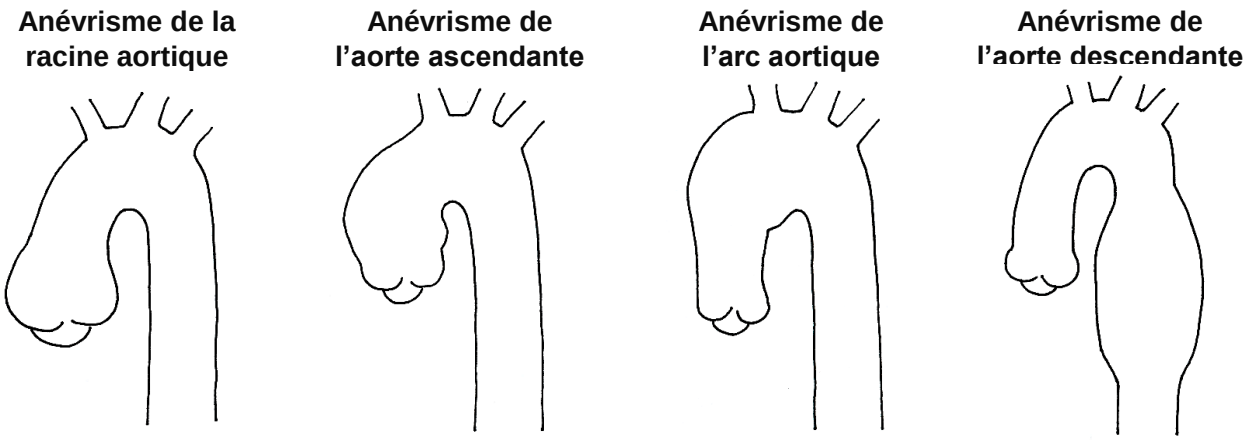


Figure 8: Localisation des anévrismes de l'aorte thoracique

L'AAT induit une fragilisation de la paroi aortique, la rendant sujette à d'autres maladies sévères et aigues telles qu'une dissection ou une rupture aortique, le développement d'un caillot ou encore d'un hématome [56]. La dissection aortique est une déchirure de la media aortique, accompagnée d'une hémorragie entre les feuillets de la paroi vasculaire [57] (**Figure 9**). Selon la classification de Stanford, les dissections aortiques peuvent être classées : les dissections survenant dans la partie ascendante de l'aorte sont des dissections de type A (**Figure 9**) alors que les dissections survenant dans la partie descendante de l'aorte sont de type B [58]. La dissection de type A peut rapidement mener à la rupture totale de la paroi aortique et constitue ainsi une urgence vitale pouvant induire un décès rapide par hémorragie massive. Toutefois, il est actuellement difficile de prédire sa survenue. De plus, la dissection aortique reste difficile à diagnostiquer car pour jusqu'à 39% des cas, le diagnostic n'est posé au moment de l'autopsie [59].

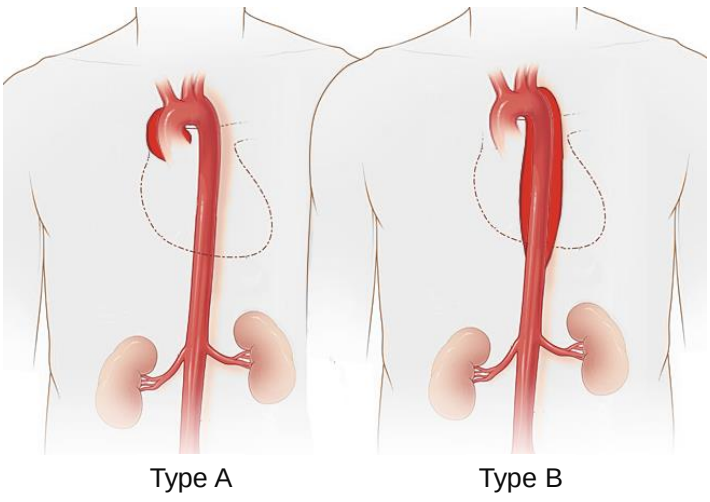


Figure 9: La dissection aortique

Image traduite depuis https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aortic_dissection_types.jpg

Différentes étiologies induisent la formation d'un AAT. Cependant, tous les AAT présentent généralement une fragilisation de la media aortique [60] avec une fragmentation de ses fibres élastiques, une diminution des quantités d'élastine [61] et de CML, une inflammation chronique, une dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) avec activation des métallo protéinases matricielles (MMP) [62].

De plus, les CML saines se divisent peu et présentent un phénotype différencié et contractile. Au niveau de la media aortique anévrysmale, les CML se dédifférencient pour aboutir à un phénotype dit sécrétoire [63,64], caractérisé par une perte de contractilité, une augmentation de leurs capacités sécrétoires (synthèse de produits de la MEC par exemple) [65] et une habilité accrue à se diviser et à migrer.

1.4.2.1. Etiologies & évolution

Les AAT sont généralement dus à une forme familiale (20% des cas) [66] ou de type dégénératif sporadique et idiopathique. Ils surviennent également chez les patients porteurs d'une malformation cardiaque congénitale fréquente: la bicuspidie de la valve aortique (BAV) [67], qui sera alors composée de deux feuillets alors que la valve aortique est normalement tricuspide (composée de trois feuillets, **Figure 10**). Plus rarement, un AAT peut être causé par une inflammation due à un stade avancé de syphilis ou de tuberculose. Des artérites (de Takayaku, ou artérite à cellules géantes) peuvent rarement induire un AAT. Enfin, un AAT peut exceptionnellement être d'origine traumatique.

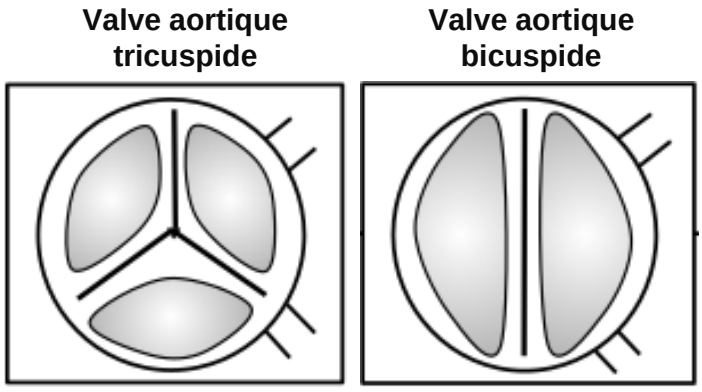


Figure 10: Valves aortiques biscupside et tricupside

Image modifiée depuis : https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bicuspid_Aortic_Valve.svg

Les sujets plutôt jeunes sont généralement touchés par une affection d'ordre génétique alors que la forme dégénérative touche préférentiellement les sujets plus âgés [68].

Il existe différentes formes d'AAT héréditaires, formes syndromiques ou familiales, telles que:

- Le syndrome de Marfan, dû à des mutations sur le gène codant la fibrilline-1 (FBN1) [69,70]. La déficience en *FBN1* augmente l'activité du facteur de croissance transformant beta (TGF-β) [71].
- Le syndrome de Loeys-Dietz, causé par des mutations dans les gènes codants pour des protéines impliquées dans la voie du TGF-β telles que : TGF-β2 [72], TGF-β3 [73], les récepteurs de type 1 (TGFBR1) et 2 (TGFBR2) au TGF-β [74], ou encore SMAD3 [75]. La BAV peut être une manifestation de ce syndrome [76].
- Le syndrome d'Ehler-Danlos de type IV ou vasculaire, dû à des mutations dans le gène codant pour le collagène de type III (COL3A1).
- Les formes familiales sont observées dans des familles porteuses de mutations dans les gènes codant pour différentes protéines telles que l'actine aortique des muscles lisses alpha2 (ACTA2) [77], la chaîne lourde 11 de la myosine (MYH11) [78] ; la fibuline-4 (EFEMP2) [79], la lysyl oxydase (LOX) [80], la glycoprotéine associée micro-fibrillaire 5 (MFAP5) [81], la protéine kinase CGMP-dépendante de type I (PRKG1) [82]. La présence de mutations sur un locus particulier peut également être à l'origine d'une forme familiale d'AAT : mutation sur le locus 11q23.3-q24 [83] ou encore sur le locus 5q13-q14 [84].
- La BAV est également observée chez des patients porteurs d'une mutation sur le gène *ACTA2* [76] ou encore sur le gène *NOTCH1* [85].

L'altération ou la suppression de l'expression de ces nombreux gènes est ainsi associée au développement d'un AAT. Les gènes listés ci-dessus sont impliqués dans trois fonctions majeures : la voie de signalisation du TGF-β (TGF-β2, TGF-β3, TGFBRI, TGFBR2, SMAD3, FBN1), le maintien de l'intégrité de la MEC (COL3A1, LOX, EFEMP2, MFAP5) et le contrôle de la contractilité des CML aortiques [86] (ACTA2, MYH11, PRKG1).

Parallèlement, l'environnement joue également un rôle dans la pathogénèse de l'AAT car plusieurs facteurs de risques sont reconnus comme favorisant l'apparition de l'AAT dégénératif de forme sporadique: l'hypercholestérolémie [87], le tabagisme, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) et l'hypertension [88].

De plus, l'aorte et sa paroi s'adaptent à l'hémodynamisme, c'est-à-dire aux forces mécaniques appliquées par le flot sanguin. En conditions normales, les forces mécaniques sanguines induisent des pressions telles que des contraintes de cisaillement sur la paroi aortique. La paroi aortique s'adapte à

ces contraintes selon la loi de Laplace T=P.r/2h, ou T est la tension exercée sur la paroi, P la pression sanguine, h l'épaisseur de la paroi aortique et r le diamètre de l'aorte.

L'hypertension constitue une augmentation de la pression sanguine, qui modifie l'hémodynamisme en appliquant une pression plus forte sur la paroi aortique. En réaction à cette augmentation de pression, l'aorte s'adapte en devenant plus rigide à l'endroit où cette pression est appliquée [26].

La présence d'une BAV modifie également l'hémodynamisme au niveau de la sortie du ventricule gauche et de l'aorte [89] : une augmentation des contraintes de cisaillement est observée chez les patients porteurs d'une BAV. En particulier, les parties de la paroi aortique soumises à ces contraintes de cisaillement accrues présentent une désorganisation des fibres d'élastine alors que les parties de la paroi aortique non soumises à ces contraintes n'en présentent pas ou peu. [90].

La présence d'un AAT modifie également la réponse de l'aorte aux pressions : selon la loi de Laplace, une augmentation du diamètre aortique est associée avec un amincissement de la paroi aortique, ce qui provoque une augmentation de la tension appliquée sur la paroi aortique sans changement de pression aortique. La présence d'un AAT modifie donc l'hémodynamisme négativement, entrainant une tension de plus en plus forte appliquée au point le plus aminci de la paroi aortique. L'aorte et l'hémodynamisme s'influencent sans cesse réciproquement.

Il a été observé que les patients porteurs d'un syndrome de Marfan développent généralement des AAT dans la partie basse de l'aorte ascendante, au niveau des sinus de Valsalva. Inversement, les AAT de l'aorte ascendante se développent généralement à la fin de l'aorte ascendante, avant l'arc aortique.

Le grand nombre et la variété de gènes associés au développement d'un AAT, ainsi que l'existence de formes sporadiques suggèrent que la pathogenèse de cette maladie est complexe, qu'elle fait intervenir plusieurs voies et qu'elle n'est pas exclusivement génétique car elle également est influencée par l'environnement. Cependant, la pathogénèse de cette maladie n'est pas tout à fait comprise actuellement.

1.4.2.2. Diagnostic

Dans la majeure partie des cas (95%) [91], l'AAT est asymptomatique mais il peut induire des douleurs dans la poitrine ou un murmure de la valve aortique [92]. Généralement, le diagnostic survient après un

examen d'imagerie (radiologie, scanner ou échographie), effectué au cours de l'étude d'une autre maladie (en particulier d'une maladie cardiaque). Le diagnostic peut également survenir à la faveur d'une complication de l'AAT.

Le fait de l'AAT soit asymptomatique laisse penser qu'une grande proportion de patients porteurs de cette maladie l'ignore. L'utilisation de biomarqueurs sanguins fiables pourrait permettre le lancement de grandes campagnes de dépistages des AAT, et serait moins coûteux que l'utilisation des techniques d'imageries utilisées actuellement pour poser le diagnostic.

Ainsi, nous avons recherché des biomarqueurs diagnostiques de l'AAT au cours de l'étude 3.

1.4.2.3. Traitement et évolution

Suite au diagnostic d'un AAT, la détermination de l'étiologie est primordiale car la découverte d'une forme syndromique nécessite la mise en place d'une surveillance familiale et du suivi des autres organes touchés par ce syndrome.

Toutefois, quelle que soit son étiologie, l'identification d'un AAT induit la mise en place d'une surveillance régulière du diamètre aortique. Des diamètres aortiques supérieurs à 60mm et 70mm au niveau de l'aorte ascendante et descendante, respectivement, sont associés à une rapide augmentation du risque de dissection aortique [6]. De plus, la vitesse d'expansion de l'anévrisme diffère selon sa localisation. Un anévrisme de l'aorte ascendante s'étend à un rythme de 1 mm/an alors qu'un anévrisme de l'aorte thoracique descendante croit à un rythme de 3 mm/an.

Parallèlement à cette surveillance, différents facteurs de risques seront traités afin de ralentir l'expansion de l'AAT. L'arrêt du tabagisme sera fortement recommandé [88] et l'hypertension et l'hypercholestérolémie seront médicalement traitées. A cet effet, des bêtabloquants (adrénergiques) pourront être prescrits, permettant de diminuer l'impact de l'hémodynamisme dans l'aorte en diminuant la pression sanguine et le rythme cardiaque. La pression sanguine peut également être diminuée avec des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II ou des bloqueurs du récepteur à l'angiotensine [88].

Lorsque l'anévrisme devient trop large, le remplacement chirurgical de la partie anévrysmale est proposé. Selon les consignes de l'ESC concernant le diagnostic et le suivi des maladies aortiques

publiées en 2014 [92], la chirurgie est proposée dès lors que le diamètre de l'aorte thoracique ascendante atteint 55mm.

Les patients porteurs d'une forme syndromique se verront proposer une chirurgie pour des diamètres inférieurs (50mm en l'absence de facteurs de risques, 45mm en présence de ces derniers ou en cas de remplacement de la valve aortique). Le seuil est également abaissé à 50mm pour les patients porteurs d'une BAV et de facteurs de risques.

Un diamètre aortique de 55mm au niveau de l'arc aortique doit également être réparé par chirurgie [92].

En revanche, pour les AAT de l'aorte descendante, une réparation endovasculaire sera d'abord considérée pour patients ayant un AAT supérieur à 55mm. Si la réparation endovasculaire ne peut être effectuée, la chirurgie est recommandée pour un diamètre supérieur à 60mm [92]. La réparation endovasculaire présente l'avantage d'être moins invasive que la chirurgie classique (qui oblige à ouvrir la cage thoracique et l'aorte) puisqu'elle est effectuée en passant par l'artère fémorale au niveau de l'aine. Elle est toutefois encore peu utilisée et peu recommandée pour les AAT de l'aorte ascendante [93].

Le remplacement chirurgical de la partie anévrismale est une mesure prophylactique qui permet d'éviter la survenue d'affections sévères telles que la dissection.

1.4.3. L'AC

Selon l'AHA, l'AC est défini comme un arrêt de la circulation sanguine, provoqué par un arrêt soudain du cœur. Dans le monde, l'AC est responsable d'un quart des décès imputables aux MCV [94]. Les AC sont généralement classés en fonction du lieu dans lequel ils surviennent : les AC survenus en dehors de l'hôpital sont distingués de ceux se produisant à l'hôpital, qui découlent généralement d'une autre maladie en cours de traitement. De plus, les AC en hôpitaux bénéficient généralement d'une prise en charge rapide, car l'arrêt du cœur est rapidement détecté grâce aux équipements de surveillance. A l'inverse, les AC extra hospitaliers peuvent se produire sans être remarqués immédiatement. Ainsi, parmi les personnes ayant un AC extrahospitalier, seuls 10% y survivent [7].

1.4.3.1. Causes & étiologies

De nombreuses causes peuvent induire la survenue d'un AC:

- Les causes cardiaques :
  - Troubles du rythme ou de la conduction [95] : le cœur se contracte de manière trop irrégulière ou trop rapide pour permettre une contraction efficace. Les troubles du rythme peuvent être causés par des anomalies structurelles ou fonctionnelles du cœur ou encore par une altération génétique des canaux (calciques, potassiques etc) des cardiomyocytes
  - Blessure du muscle cardiaque qui empêche son bon fonctionnement (par exemple au cours d'un IM) [96]
  - Présence d'une malformation congénitale [97]
  - Présence d'une maladie des valves [98]
  - Inflammation du muscle cardiaque (myocardite) [99]
  - Dysfonctionnement général du cœur (comme lors d'un stade très avancé d'IC) [96]

- Les causes non-cardiaques (dues à l'environnement ou à d'autres maladies):
  - Electrocution, qui peut également court-circuiter le système électrique cardiaque [100]
  - Noyade [101]
  - Overdose de drogues (cocaïne, héroïne…) [99]
  - Hémorragie massive, comme par exemple au cours d'une rupture de l'aorte [102]
  - Choc septique ou anaphylactique [103]
  - Causes métaboliques [104] : hypoxie, déséquilibres en de la concentration sanguine en potassium (hypo/hyperkaliémie), en calcium (hypo/hypercalcémie) ou en acides (acidose)

Les facteurs de risques associés à l'AC sont : l'âge, le sexe, le tabagisme, l'hypertension, le diabète, l'hypercholestérolémie, l'obésité et des antécédents familiaux de maladie coronarienne [95]. Ces facteurs de risques sont communs à ceux des maladies coronariennes, ce qui semble logique car une certaine proportion de patients ayant un AC souffre également d'une maladie coronarienne [105].

L'AC peut apparaitre comme étant une conséquence de troubles du rythme tels que la tachycardie ventriculaire (TV), dégénérant en FV puis en asystolie [95]. La FV est majoritairement rencontrée : elle induit une arythmie ventriculaire qui ne permet pas une contraction cardiaque efficace. Ces troubles

du rythme sont présents chez les personnes porteuses des syndromes arythmogéniques du court et long QT, de Brugada ou encore de Wolff-Parkinson-White [106], entre autres. Cependant, seulement une petite proportion de personnes ayant un AC est positive pour les marqueurs associés à un risque élevé d'arythmie [107] et environ 50% des personnes subissant un AC n'ont pas de maladie cardiaque diagnostiquée [94].

Parmi les patients souffrant d'un AC, les sujets jeunes présentent généralement des troubles du rythme (de cause génétique ou non) ou des cardiomyopathies, un abus de drogue ou une myocardite, alors que les sujets plus âgés ont généralement des problèmes cardiaques sous-jacents (maladie coronarienne/IM, maladie des valves, IC) [94]. De même, avoir un antécédent familial d'AC augmente les risques de développer un AC [108]. Cependant, la cause de l'AC n'est pas toujours élucidée (de 2% jusqu'à 54% des cas, même lorsqu'une autopsie est effectuée) [109]. La découverte de nouveaux moyens permettant de déceler les personnes à risque de faire un AC est essentielle.

1.4.3.2. Symptômes & diagnostic

La majeure partie des personnes subissant un AC n'ont pas de symptômes avant l'AC. Toutefois, chez certains patients, des symptômes ont été ressentis avant la survenue d'un AC : une douleur à la poitrine, des palpitations, des difficultés à respirer, une syncope.

Une perte de connaissance sans réaction aux stimulations (un état de mort apparent), une absence de respiration ou une respiration difficile, saccadée et une absence de pouls permettent de poser le diagnostic de l'AC.

Lors de l'AC, le sang ne circule plus dans le corps, toutes les cellules se retrouvent alors en condition d'ischémie, privées de dioxygène et de nutriments. Le cerveau est particulièrement sensible à ces conditions d'ischémie. Les chances de survie diminuent très rapidement au fur et à mesure que le temps s'écoule après la survenue d'un AC. Il est essentiel de rétablir la circulation le plus rapidement possible par des manœuvres de réanimation cardiopulmonaire (RCP). Dans les cas d'AC hors hôpital, la pratique rapide de la RCP, initiée par les témoins permet d'améliorer la survie post-AC [110]. La durée de la RCP est également importante, car plus la RCP est longue, plus la proportion de patients ayant une bonne évolution de la fonction neurologique après un AC diminue [111].

Si la RCP n'a pas été initiée auparavant, celle-ci sera mise en place lors de l'admission à l'hôpital. Cependant, en accord avec le refus de futilité médicale, l'idéal serait de ne pas pratiquer la RCP si les

chances de survie ou de qualité de vie qu'elle apporte sont nulles. Toutefois, en pratique, il est très difficile (si ce n'est impossible) de définir ces chances. Ainsi, des taux de succès inférieurs à 1% justifient l'effort de RCP [112].

Ensuite, dès l'admission, une ventilation mécanique est mise en place et un ECG est effectué : une asystolie (aucun mouvement électrique cardiaque), une bradycardie extrême, une TV ou une FV sont généralement observés. Les résultats de l'ECG permettent de décider de la prise en charge du patient. Ils peuvent aussi renseigner sur l'étiologie de l'AC (si survenu à la suite d'un IM par exemple).

1.4.3.3. Traitement, syndrome post-AC et évolution post AC

En premier lieu, il est important de rétablir une activité cardiaque normale. Pour les patients présentant une asystolie, le traitement vise à relancer l'activité électrique cardiaque. Il est généralement composé d'une dose d'adrénaline par voie veineuse.

Pour les patients présentant une FV ou une TV, l'activité électrique est toujours présente dans le muscle cardiaque, mais ne suffit pas à induire une contraction homogène du cœur. L'utilisation d'un défibrillateur peut permettre au cœur de se resynchroniser et d'obtenir une activité électrique cardiaque de nouveau normale. En cas d'inefficacité de la défibrillation, des traitements anti-arythmiques pourront être utilisés.

- Retour à la circulation spontanée

Le retour d'une activité cardiaque normale permet le retour de la circulation spontanée (RACS). Tous les tissus seront de nouveau irrigués normalement, induisant l'arrivée subite d'une quantité importante de dioxygène (et donc de stress oxydant) dans des tissus ayant subi une période d'ischémie. Les dégâts occasionnés par l'ischémie et la reperfusion induisent une réponse systémique.

Si l'étiologie de l'AC est identifiée, elle doit être traitée dès le RACS (par exemple, utilisation d'une ICP pour les patients souffrant d'un AC provoqués par un IM). Egalement, plus le temps écoulé entre la survenue de l'AC et le RASC est long, plus les chances de survie ou de récupérer une bonne fonction neurologique post-AC diminuent pour les patients [113,114].

Les conséquences engendrées par l'AC induisent le syndrome post-AC, qui débute entre la survenue de l'AC et les 72h qui suivent. Il comprend 4 mécanismes : 1) les blessures cérébrales post-AC ; 2)

les dysfonctions du myocarde post-AC ; 3) la réponse systémique face à l'ischémie/reperfusion et 4) la persistance de la maladie responsable de l'AC en premier lieu [115].

Parmi les conséquences du syndrome post-AC, la dysfonction cardiovasculaire post-AC est responsable de la majorité des décès dans les 3 jours suivant l'AC, alors que les blessures cérébrales sont responsables de la majorité des décès associés à l'AC à plus long terme [116,117]. La mesure de certains marqueurs cardiaques (telles que les troponines) est effectuée pour évaluer les dégâts cardiovasculaires.

- Hypothermie thérapeutique

Selon les recommandations de l'AHA, tous les patients en état comateux avec un RASC post-AC devraient bénéficier d'une hypothermie thérapeutique (entre 32°C et 36°C) effectuée pendant au moins 24h [118]. Cette hypothermie a montré des effets bénéfiques sur l'évolution de la fonction neurologique post-AC [119]. Le choix de la température est laissé aux praticiens. L'étude multicentrique TTM a comparé l'utilisation de l'hypothermie thérapeutique à 33°C et celle à 36°C : l'utilisation de ces deux températures semble induire des effets comparables sur la survie et l'évolution neurologique post-AC [120]. L'hypothermie thérapeutique peut être prolongée au-delà des 24h pour prévenir la survenue de fièvre [118].

La prise en charge des patients va ensuite dépendre de l'estimation de leur pronostic. Ce dernier peut être effectué dès 72h post-AC chez les patients qui n'ont pas reçu d'hypothermie thérapeutique. En revanche, pour les patients traités par hypothermie thérapeutique, l'estimation pronostique la plus précoce sera effectuée 72h après retour à la normothermie [118].

- Prédiction de l'évolution neurologique

Bien que certains outils soient utilisés pour essayer de prédire l'évolution et la survie des patients après un AC, aucun test ou résultat d'analyse seul ne permet d'effectuer cette prédiction [118].

Actuellement, la prédiction de l'évolution neurologique post-AC repose sur l'observation de [121] :

- signes cliniques tels que l'absence de réflexe pupillaire à la lumière à 72 ou plus post-AC
- l'électrophysiologie : absence ou non de potentiels
- l'électroencéphalographie
- l'imagerie cérébrale

- la mesure des niveaux sanguins de biomarqueurs protéiques spécifiques du cerveau tels que l'énolase neurospécifique (NSE ou *neuron-specific enolase*) ou la protéine S100b

La NSE est exprimée dans les neurones, et la S100b dans les cellules gliales. Au cours d'une blessure cérébrale, ces protéines sont libérées dans la circulation sanguine lors de la lyse des cellules qui les contiennent. Les niveaux circulants de NSE mesurés à 48h et 72h post-AC apparaissent être des prédicteurs d'une mauvaise évolution cérébrale post-AC [122]. Cependant, la variabilité des niveaux de NSE dans différentes études ne permet pas actuellement l'établissement d'une valeur seuil au-dessus de laquelle le pronostic de mauvaise évolution neurologique serait posé [116]. La protéine S100b présente une valeur prédictive moins forte que la NSE et est ainsi moins utilisée [123].

Il a été également rapporté que les niveaux de marqueurs cardiaques tels que le NT-proBNP et la c-TnT-us sont associés avec l'évolution neurologique et la mort post-AC [124,125]. Ces associations n'ont toutefois pas été validées et n'ont pas été incluses dans les recommandations.

Après un AC, la fonction neurologique est généralement évaluée grâce à l'utilisation de l'échelle de Catégorie de Performance Cérébrale (CPC). Cette échelle comporte 5 niveaux [126] :

- CPC 1 : pas de séquelles ou de très légers troubles neurologiques
- CPC 2 : séquelles neurologiques modérées
- CPC 3 : séquelles neurologiques importantes
- CPC 4 : état comateux ou état végétatif persistant
- CPC 5 : mort cérébrale ou mort

Une mauvaise évolution neurologique (regroupant généralement les classes CPC3, CPC4 et CPC5) est associée avec un risque accru de décès et une piètre qualité de vie. Ainsi, en accord avec les principes d'éthique et la non-futilité médicale (le traitement doit prolonger la vie mais en offrant une qualité de vie acceptable), chez les patients pour lesquels la prédiction de l'évolution neurologique est mauvaise, l'arrêt des soins de maintien en vie sera envisagé [112].

De plus, le maintien en vie de patients ayant une très mauvais qualité de vie (tels que les états végétatifs) est associé à des soins lourds et représente une douleur importante pour les familles de ces patients. Il a été observé que les proches des patients décédés d'un AC ont mieux réagi à leur perte lorsque les efforts de RCP futile n'avaient pas lieu ou étaient stoppés rapidement [112].

Au niveau de plusieurs aspects, éthiques, économiques [127], la prédiction de l'évolution post-AC reste un enjeu de taille, porteuse de lourdes conséquences. La découverte de nouveaux biomarqueurs est essentielle pour permettre d'affiner la stratification des patients, de faciliter la prédiction de l'évolution post-AC et d'adapter la prise en charge des patients [128].

C'est pourquoi, dans les études 4 et 5, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de nouveaux biomarqueurs prédicteurs de la fonction neurologique post-AC.

2. Chapitre 2 : Le transcriptome

2.1. Définitions

2.1.1. La théorie centrale de la biologie moléculaire

Chaque être vivant possède des caractéristiques qui lui sont propres. Ces caractéristiques observables constituent le phénotype. Parmi les êtres vivants, les cellules sont des unités indépendantes, capables de se maintenir en vie, de se reproduire et même de se rassembler pour composer des organismes pluricellulaires. Chez les organismes eucaryotes, comme l'homme, les cellules comprennent des sous-compartiments, les organites tels que le noyau, maintenus dans le cytoplasme.

La théorie ou le dogme fondamental de la biologie moléculaire découlent des travaux de Francis Crick [129] et de James Watson[130]. Selon cette théorie, le patrimoine génétique ou génotype d'un être vivant est contenu dans le noyau de ses cellules et est encodé par des molécules d'ADN, organisées dans une structure en double hélice [131]. Pour pouvoir être exprimée par la cellule, une petite partie de ce patrimoine génétique, un gène, correspond à une séquence d'ADN qui sera transcrite en ARN. Cette molécule d'ARN, simple brin, pourra alors être exportée du noyau et traduite en protéine dans le cytoplasme (**Figure 11**).

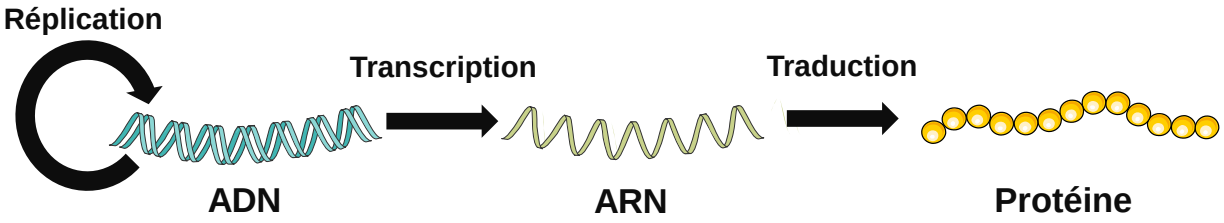


Figure 11: Dogme central de la biologie moléculaire d'après Watson et Crick.
Images extraites et modifiées à partir de la banque d'image Servier Medical Art ®

2.1.2. Molécules ADN, molécules ARN

Les molécules d'ADN et d'ARN sont des polymères composés de nucléotides. Un nucléotide est composé d'une base azotée, d'un sucre ou ose qui peut être ribose ou désoxyribose (en fonction de la présence ou l'absence d'un atome d'oxygène sur la base) et enfin d'un à trois groupement phosphate. Les molécules ADN sont composées de quatre nucléotides : l'adénine, la guanine, la cytosine et la thymine. Parallèlement, les molécules ARN sont composées de quatre nucléotides, l'adénine, la

guanine, la cytosine et l'uracile, qui est l'équivalent de la thymine désoxyribonucléique. Certains de ces nucléotides sont complémentaires entre eux et s'associent grâce à des liaisons non-covalentes. Ces dernières permettent de lier entre eux les deux brins d'une molécule d'ADN. L'adénine est complémentaire de la thymine et de l'uracile, alors que la guanine et la cytosine sont complémentaires.

Les molécules d'ARN ou d'ADN sont composées de séquences consécutives de nucléotides. C'est la séquence qui contient les informations essentielles, associées à la structure et à la fonction de la molécule en question.

L'ADN sert au stockage du patrimoine génétique et à sa transmission aux générations de cellules suivantes. A l'inverse, l'ARN a un rôle transitoire. Ces différences de fonction sont soulignées par le fait que l'ADN, grâce au désoxyribose qu'il contient, est plus résistant que l'ARN.

Des complexes protéiques sont capables de dégrader les molécules ADN et ARN : ce sont, respectivement, les désoxyribonucléases (DNAse) et les ribonucléases (RNAse). Les DNAse sont produites par de nombreux être vivants. Deux familles ont été identifiées chez l'homme, et sont hautement exprimées dans certains tissus ou cellules spécifiques. La DNAse I est exprimée dans le sang, et participe à l'élimination de molécules d'ADN libres dans le sang [132]. Les RNAse sont également exprimées par de nombreux êtres vivants, depuis les protozoaires jusqu'aux humains, chez qui il existe huit types de RNAse [133]. Elles sont exprimées dans de nombreux organes et parmi elles, trois sont présentes dans la circulation sanguine. La forte présence des RNAse contribue à la fragilité des molécules ARN dans les tissus ou les fluides biologiques, et en particulier des molécules ARN à double brin [133]. Les RNAse permettent en effet d'éliminer les molécules ARN libres présentes dans le sang.

2.1.3. Le transcriptome & les familles d'ARN

De nombreuses études ont été menées depuis l'établissement de ce dogme central, permettant de confirmer cette théorie. D'autres connaissances ont également été ajoutées : il a été découvert qu'une partie du patrimoine génétique était présente dans des organites (les mitochondries), que l'ARN constitue le patrimoine génétique de certains êtres vivants (des virus) et que toutes les molécules d'ARN produites ne sont pas nécessairement traduites en protéines, et ne vont pas nécessairement dans le cytoplasme.

Un terme regroupe tous les transcrits ARN produits par le génome : le transcriptome. Le génome quant à lui, est l'ensemble des informations génétiques d'un individu. Il contient toutes les informations nécessaires à l'organisme pour fonctionner et est stocké sous la forme de chromosomes, de longues molécules composées d'ADN.

En rapport avec le dogme central présenté ci-dessus et la croyance que les molécules ARN devaient être nécessairement traduites, certaines définitions du transcriptome ne s'attachent qu'à la transcription des parties codantes (les gènes) du génome. Ce n'est pas le cas ici, ou le transcriptome considère l'ensemble des transcrits ARN.

La transcription des molécules ADN en molécules ARN est effectuée par des complexes protéiques, les ARN polymérases. Il en existe plusieurs types : ARN polymérases de type I, de type II, de type III (toutes trois présentes dans le noyau) et les ARN polymérases mitochondriales.

Le transcriptome comprend plusieurs types de molécules ARN, qui peuvent être groupées en « famille » ou « types » d'ARN, présentées dans la **Figure 12**. La première famille est celle des ARN codants, qui sont traduits en protéines et représentent 2% du génome [9]. Les ARN non-codants qui représentent 80% du génome, sont transcrits sans produire de protéines et constituent la seconde famille. Si les ARN codants ou ARNm ont été fortement étudiés ces 50 dernières années, l'étude des ARN non-codants est beaucoup plus récente. Ainsi, la fonction ou la structure de nombreux ARN non-codants reste actuellement méconnue [134].

Dans la famille des ARN non codants, plusieurs distinctions existent. Une première est basée sur la longueur de la molécule et permet de séparer les lncARN, comportant au moins 200 nucléotides, des ARN non codants courts, qui contiennent moins de 200 nucléotides.

Les sous-groupes de lncARN sont distingués en fonction de leur localisation par rapport à un gène (sens, antisens, intronique, intergénique), de leur fonctionnement (ARN amplificateur ou eARN) ; ou encore à cause de leur forme comme pour les ARN circulaires (circARN).

Pour les ARN non codants courts, la fonction est également un critère de classement. Les ARN ribosomiques (ARNr) et ARN de transfert (ARNt) participent à la traduction des ARNm en protéines.

Les ARN présents dans le noyau : petits ARN nucléaires (snARN) ; petits ARN nucléolaires (snoARN) et petits ARN des corps de Cajal (scaARN) ont des fonctions régulatrices ; certains participent entre autres à la transcription ou aux modifications post-transcriptionnelles d'autres ARN [135-137].

Les petits ARN issus du clivage des ARNt dû au stress (ARNti) présentent des fonctions de régulation envers la transcription des ARNm et joueraient plusieurs rôles biologiques [138].

La voie des ARN interférents (ARNi) comprend les molécules ARN capables d'interférer avec l'expression d'un ou plusieurs gènes en ciblant son ARNm. Parmi elles, il y a les petits ARN interférents (pARNi), les miARN, les ARN interagissant avec le complexe protéique Piwi (ARNpi), les petits ARN interférents associés aux répétitions (ARNrasi) et enfin les Agotrons sont associés avec les protéines argonautes.

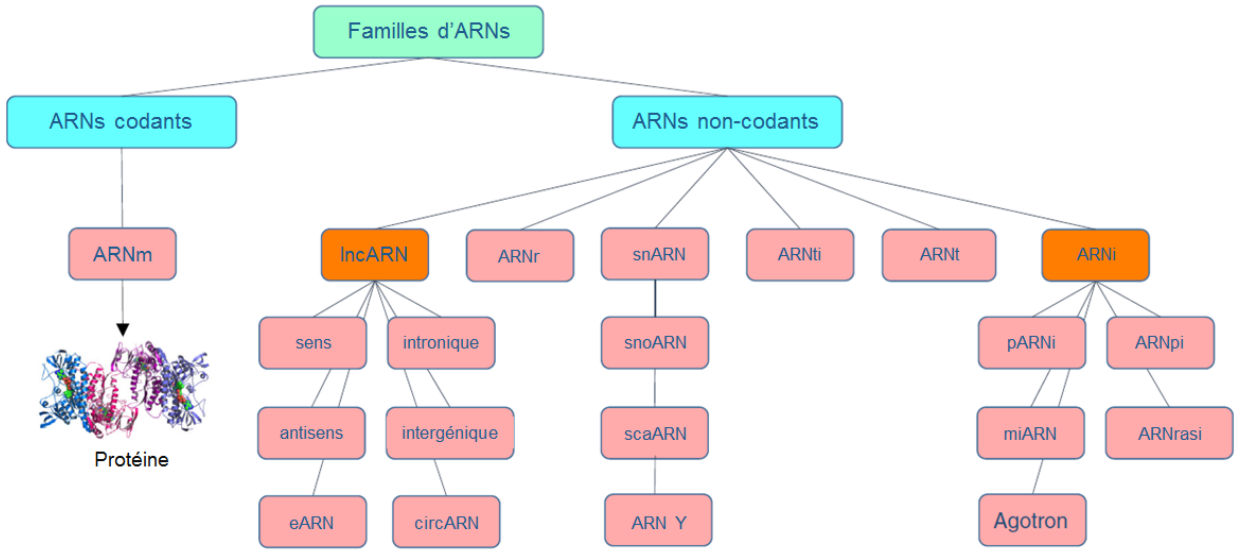


Figure 12: Les familles d'ARN.

Abréviations: ARNm: ARN messager; lncARN: ARN long non-codant; eARN: ARN amplificateur; circARN: ARN circulaire; ARNr: ARN ribosomique; snARN: petits ARN nucléaires; snoARN: petits ARNs nucléolaires; scaARN: petits ARN des corps de Cajal; ARN Y: petits ARN dérivés de RNY; ARNt: ARN de transfert, ARNti: petits ARN induits pas le stress dérivés d'ARNt; ARNi : interférence ARN; pARNi: petits ARN interférants; ARNpi: ARN interagissants avec piwi; miARN: microARN; ARNrasi: répétition associées aux petits ARN interférants. Image traduite d'après Devaux, 2017[10].

Bien que la fonction de nombreux ARN non-codants ne soit pas encore élucidée à ce jour, il est déjà établi que les ARN non-codants ont d'importantes fonctions régulatrices : ils agissent de manière épigénétique ou post-transcriptionnelle pour modifier l'expression des gènes [10]. De plus, il a été montré que les ARN non-codants pouvaient passer la membrane plasmique [134].

Nous allons à présent détailler les processus de formation et de fonctionnement des ARNm, des miARN et des lncARN et définir les concepts d'épigénétique et de transcriptome sanguin.

2.2. Les ARN codants ou ARNm

Bien qu'ils ne représentent que 2% du génome, les ARNm permettent la production de toutes les protéines nécessaires à l'organisme. Pour cela, chaque ARNm doit être transcrit depuis son gène codant.

2.2.1. La transcription

Ce processus nécessite plusieurs étapes (**Figure 13**). La première est l'initiation : chaque gène comporte une séquence promotrice (ou promoteur), situé en amont de la séquence à transcrire.

La polymérase ARN de type II sera recrutée sur la séquence promotrice, grâce à l'action de facteurs de transcription. Après l'ouverture de l'hélice double brin d'ADN, la transcription est initiée. L'ARN polymérase procède ensuite à l'élongation du nouveau brin d'ARN formé.

Enfin, une séquence présente à la fin du gène nommée terminateur assure la mise en place d'une structure tridimensionnelle qui induit l'arrêt de la transcription en bloquant la polymérase ARN.

Le transcrit est considéré comme un pré-ARNm à la fin de la transcription.

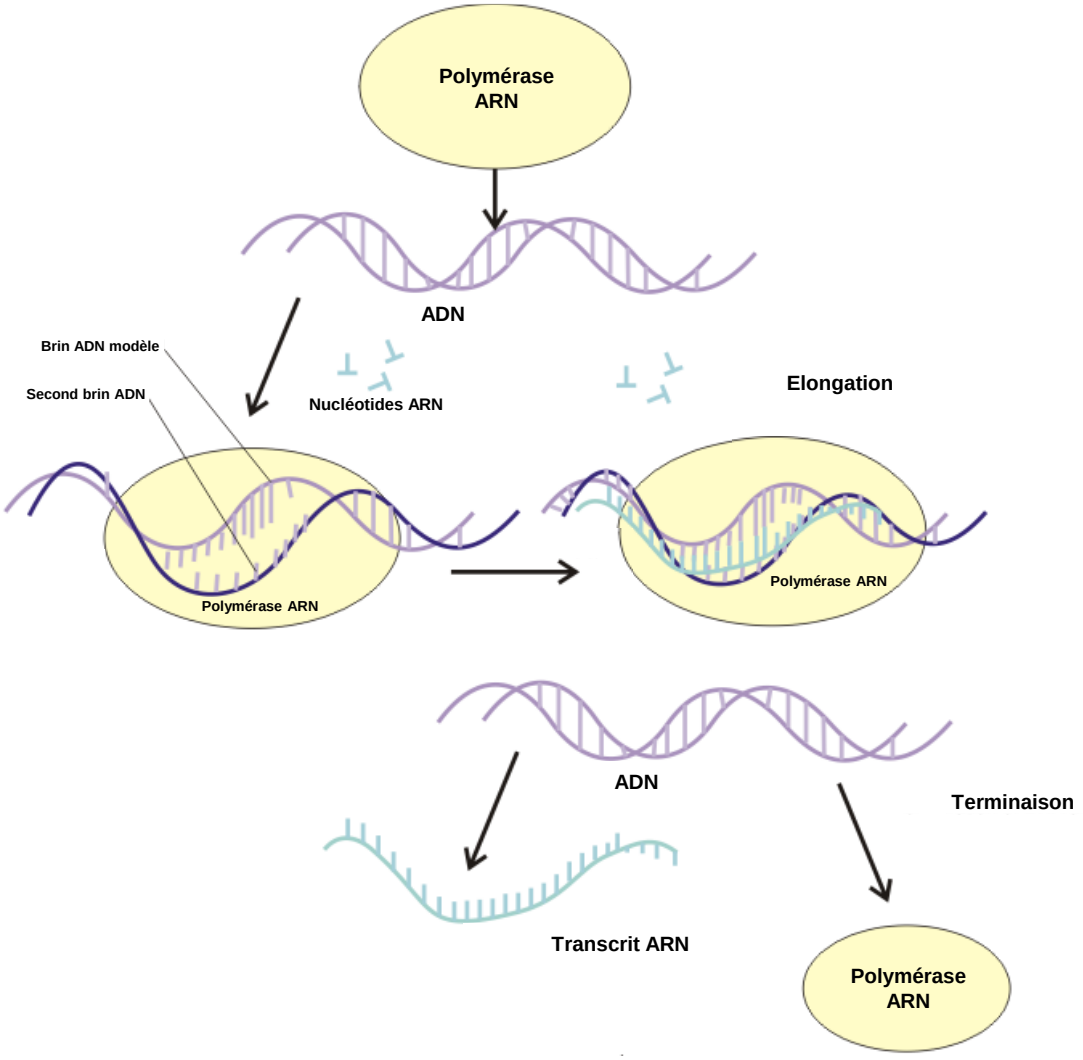


Figure 13: Transcription des ARNm.

Image créée par le Dr Franck Boumphrey modifiée depuis

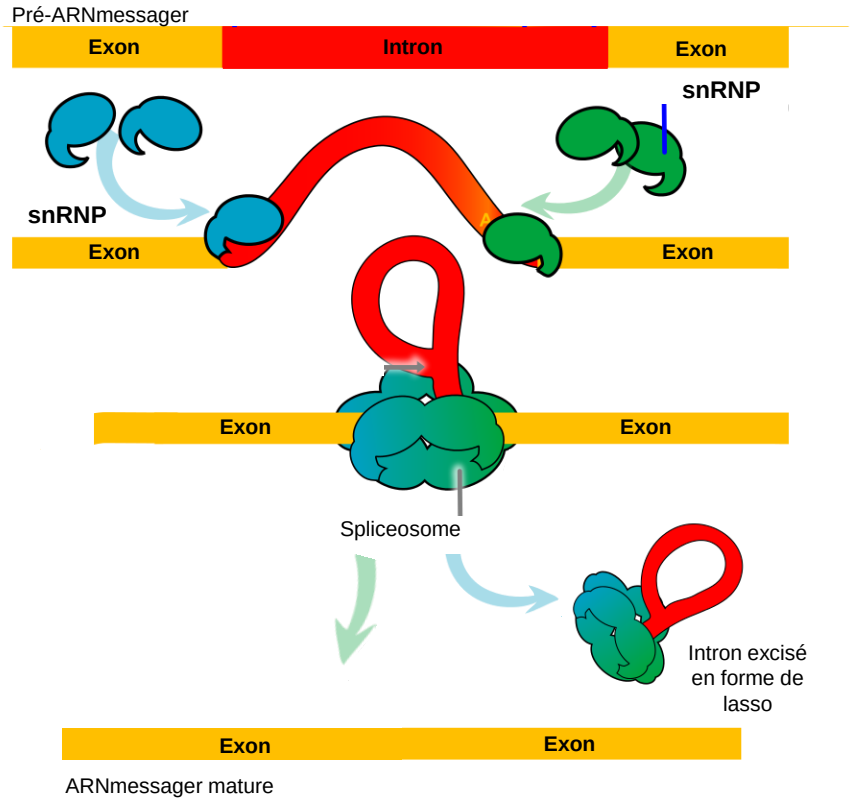
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mrna_trans2.png

2.2.2. Maturation & épissage

Les ARNm subissent des modifications post-transcriptionnelles, effectuées dans le noyau. Chaque gène est composé de parties nommées introns ou exons. Juste après la transcription, l'ARNm d'un gène contient les introns et les exons. Les introns sont des parties qui ne seront pas traduites en protéine, elles seront éliminées lors du processus de formation de l'ARNm mature.

En premier lieu, une « coiffe » constituée d'une molécule de guanine-tri-phosphate est mise en place à l'extrémité 5' du pré-ARNm par le complexe protéique *Cap-binding complex*. L'autre extrémité du transcrit, du côté 3', est allongée avec 200 adénines grâce à l'action d'une poly-A polymérase. Cette dernière n'a pas besoin de brin modèle pour effectuer la polymérisation.

Enfin, l'épissage intervient pour éliminer les introns afin d'obtenir un ARNm mature (**Figure 14**). La réaction d'épissage fait intervenir le complexe spliceosome, qui contient des protéines et des snARN associés ensembles sous la forme de petits complexes ribonucléiques-protéiques (snRNP). Le spliceosome est capable de reconnaître les jonctions exons-introns, de briser le brin d'ARN au niveau du début de l'intron. L'intron se replie sur lui-même pour former une boucle, et le spliceosome catalyse la rupture de l'ARN à la fin de l'intron ; puis il permet la formation d'une nouvelle liaison entre les deux exons, aboutissant à la formation d'une nouvelle jonction entre deux exons.



<u>Figure 14:</u> Représentation simplifiée de la réaction d'épissage

Image modifiée depuis https://commons.wikimedia.org/wiki/File:RNA_splicing_diagram_pl.svg

Un épissage alternatif peut être mis en place, conduisant à l'élimination de certains exons et à la production d'une protéine différente de celle obtenue avec tous les exons du gène.

Après la maturation, l'ARNm mature est exporté du noyau vers le cytoplasme, via les pores nucléaires. La coiffe et la queue poly-A protègent l'ARNm mature de la dégradation dans le cytoplasme.

2.2.3. Traduction

La traduction repose sur un système de codons : un codon est un groupe de trois nucléotides codant pour un acide aminé. Elle est effectuée par les ribosomes. Ces complexes ribonucléoprotéiques sont composés de deux unités majeures elles-mêmes constituées de protéines et d'ARNr. La traduction nécessite également l'action des ARNt. Un ribosome reconnaît le début de la séquence codante de l'ARNm grâce au codon adénine-uracile-guanine (ou AUG) initiateur. Il initie la traduction à l'aide d'un ARNt initiateur. Ensuite, pour chaque codon, un ARNt sera utilisé afin d'ajouter un acide aminé au peptide en cours d'utilisation. La terminaison est effectuée à l'aide d'un facteur protéique RF qui est structurellement similaire à un ARNt et qui se fixe uniquement sur un codon « stop » (UAA, UAG ou UGA).

2.2.4. Epigénétique : définition

Le terme d'épigénétique regroupe les processus qui induisent un changement d'expression génique héréditaires qui ne sont pas associés à des modifications de la séquence ADN [139]. Les modifications épigénétiques regroupent plusieurs mécanismes : 1) La modification structurelle des molécules d'ADN effectuée par les protéines associées à l'ADN (histones), menant à sa compaction plus ou moins importante, sous forme de chromatine ; ou 2) par la méthylation de l'ADN ; 3) mais également l'action des ARN non codants régulateurs après la transcription [140]. A l'inverse de la séquence génétique, qui est normalement figée, non modifiable (hors mutation), les modifications épigénétiques peuvent se produire à la suite de changements environnementaux [139].

Parmi les ARN non codants, l'action épigénétique des miARN a été fortement étudiée et est relativement bien comprise. En revanche, celle des autres catégories d'ARN non-codants n'est pas encore totalement élucidée.

2.3. Les microARN

Les miARN sont des molécules ARN simple brin d'environ 18 à 25 nucléotides de longueur. Les miARN sont hautement conservés au cours de l'évolution, suggérant leur rôle essentiel dans la régulation de processus physiologiques. Actuellement, 1881 précurseurs et 2588 miARN matures sont enregistrés dans la base de données miRBase [141].

2.3.1. Génèse

La génèse des miARN est composée de plusieurs étapes (**Figure 15**).
La transcription est la première de ces étapes et permet l'obtention d'un pri-miARN, qui forme une structure en épingle à cheveux. La séquence des miARN peut être incluse dans la séquence d'un gène. Dans ce cas, le miARN sera co-transcrit en même temps que le gène par la polymérase ARN II selon les étapes décrites précédemment [142]. La séquence codant pour d'autres miARN peut également être transcrite seule, par la polymérase ARN III [143].

Le pri-miARN sera ensuite clivé par le complexe protéique composé de la RNase Drosha et de la protéine associée DGCR8 [144]. Ce complexe peut se fixer sur le pri-ARN grâce à des domaines de liaison spécifiques de l'ARN double brin [145]. Ce clivage est effectué à environ 22 nucléotides de la boucle terminale et permet la transformation du pri-miARN en pré-miARN, qui sera exporté du noyau vers le cytoplasme par le complexe protéique Exportin-5-Ran-GTP [146].

Dans le cytoplasme, le pré-miARN est de nouveau clivé au niveau de la boucle terminale, par la RNAse Dicer (qui est de type endonucléase) associée avec la protéine TRBP (qui se lie aux ARN double brin) [147]. Le clivage produit un petit ARN double brin qui est immédiatement pris en charge par les protéines Dicer, TRBP, PACT et Argonaute 2 (Ago2) pour former un complexe pré-RISC. Le complexe RISC mature est obtenu après la suppression du brin « passager » de l'ARN, après un éventuel clivage par Ago2 [148]. C'est le complexe RISC, comprenant le miARN mature qui va pouvoir permettre l'interaction entre le miARN mature et son ARNm cible.

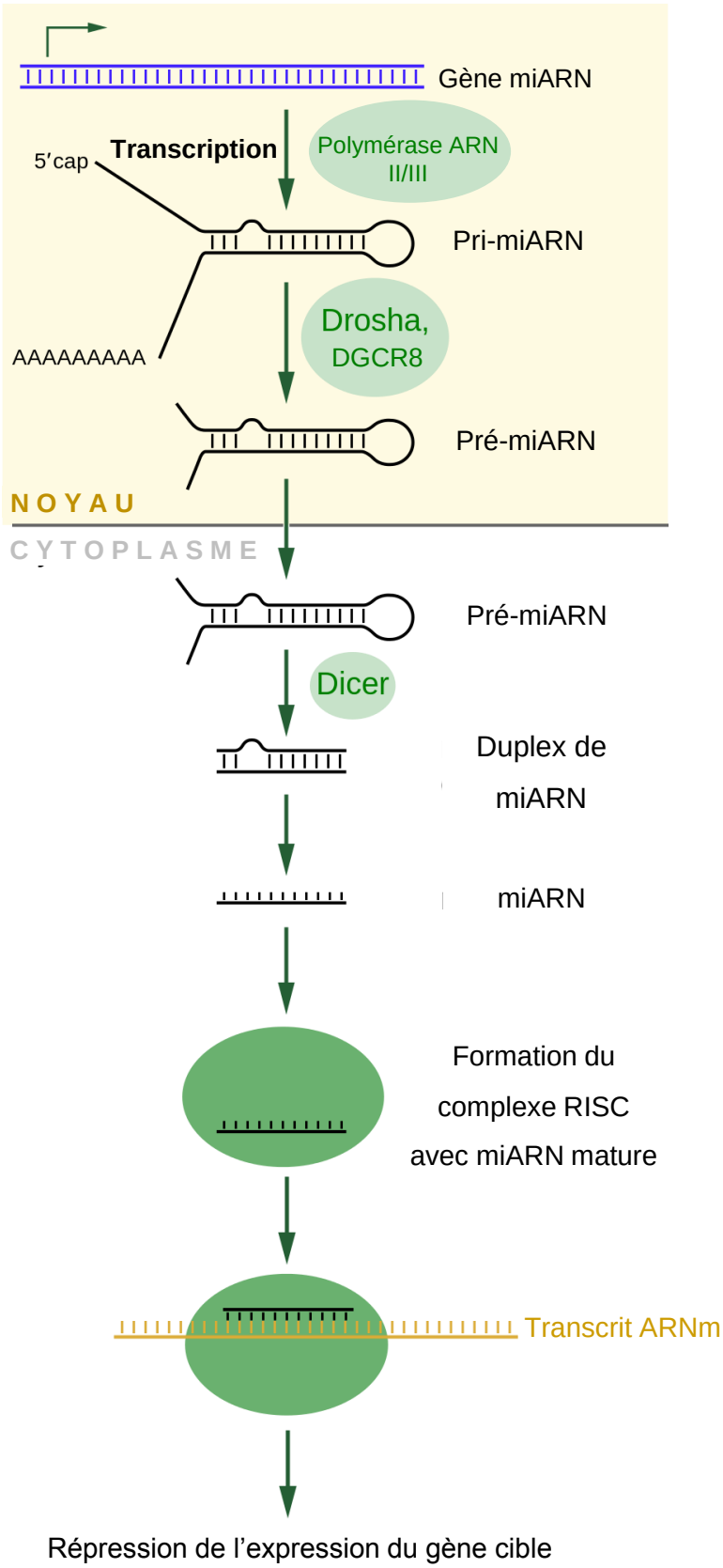


Figure 15: Biogénese et fonction des miARN

Image modifiée depuis https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MiRNA_processing.jpg

2.3.2. Mécanisme de fonctionnement

Chaque miARN possède une séquence régulatrice spécifique (ou *seed sequence*) composée d'environ 6 à 8 nucléotides. Cette séquence est généralement complémentaire de l'extrémité 3' UTR de l'ARNm cible du miARN et permet sa reconnaissance par le complexe RISC. La fixation du miARN (inclus dans le complexe RISC) sur son ARNm induit une répression de l'expression du gène cible (**Figure 15**) par deux moyens:

- Le clivage de l'ARNm, catalysé par Ago2 [149], est induit lorsque la complémentarité entre l'ARNm et la séquence régulatrice spécifique du miARN est parfaite [150].
- La répression de la traduction de l'ARNm [149], se produit lorsque la complémentarité entre l'ARNm et la séquence régulatrice spécifique du miARN est imparfaite et ne permet pas d'activer le clivage de l'ARNm [151]. Les miARN peuvent inhiber la traduction au niveau de l'initiation, de l'élongation ou de la terminaison [152].

Chaque miARN peut cibler un ou plusieurs ARNm cible(s), et inversement, un ARNm peut être la cible de plusieurs miARN. De plus, il a été estimé que les miARN réguleraient la traduction de plus de 60% des gènes codants [153]. Les modifications épigénétiques affectant la structure de l'ADN peuvent également réguler l'expression des miARN [154].

2.4. Les ARN long non-codants

Définis comme étant des molécules ARN de plus de 200 nucléotides sans capacité codante, les lncARN sont généralement transcrits par la polymérase ARN II, et subissent des transformations post-transcription (ajout de coiffe et de queue poly-A), comme les ARNm. De ce fait, ils peuvent être présents dans le noyau mais également dans le cytoplasme [155]. Actuellement, le consortium ENCODE contient environ 16 000 séquences ADN de lncARN, permettant l'existence de 28 000 transcrits [156]. A l'inverse des miARN, les lncARN ne sont pas conservés entre les espèces [157].

Les lncARN peuvent réguler l'expression d'autres transcrits selon plusieurs mécanismes, comme précisé dans la **Figure 16** :

- En interagissant avec les complexes protéiques responsables de la compaction de l'ADN [158]
- En interférant avec la machinerie transcriptionnelle : en recrutant ou en séquestrant les facteurs de transcription [159], en modulant la stabilité de protéines associées à l'ADN [160].

- En étant impliqués dans des structures moléculaires en se liant directement à l'ADN génomique telles que les *paraspeckles* [161], qui semblent associées à la régulation de la transcription [162] ou les *R-loop* [163] structures formées lors de la transcription [164]
- En régulant des mécanismes post-transcriptionnels tels que l'épissage [165], la traduction [166], la stabilité des protéines associées à des molécules ARN [167] ou en agissant comme une « éponge » à miARN [168], [169]

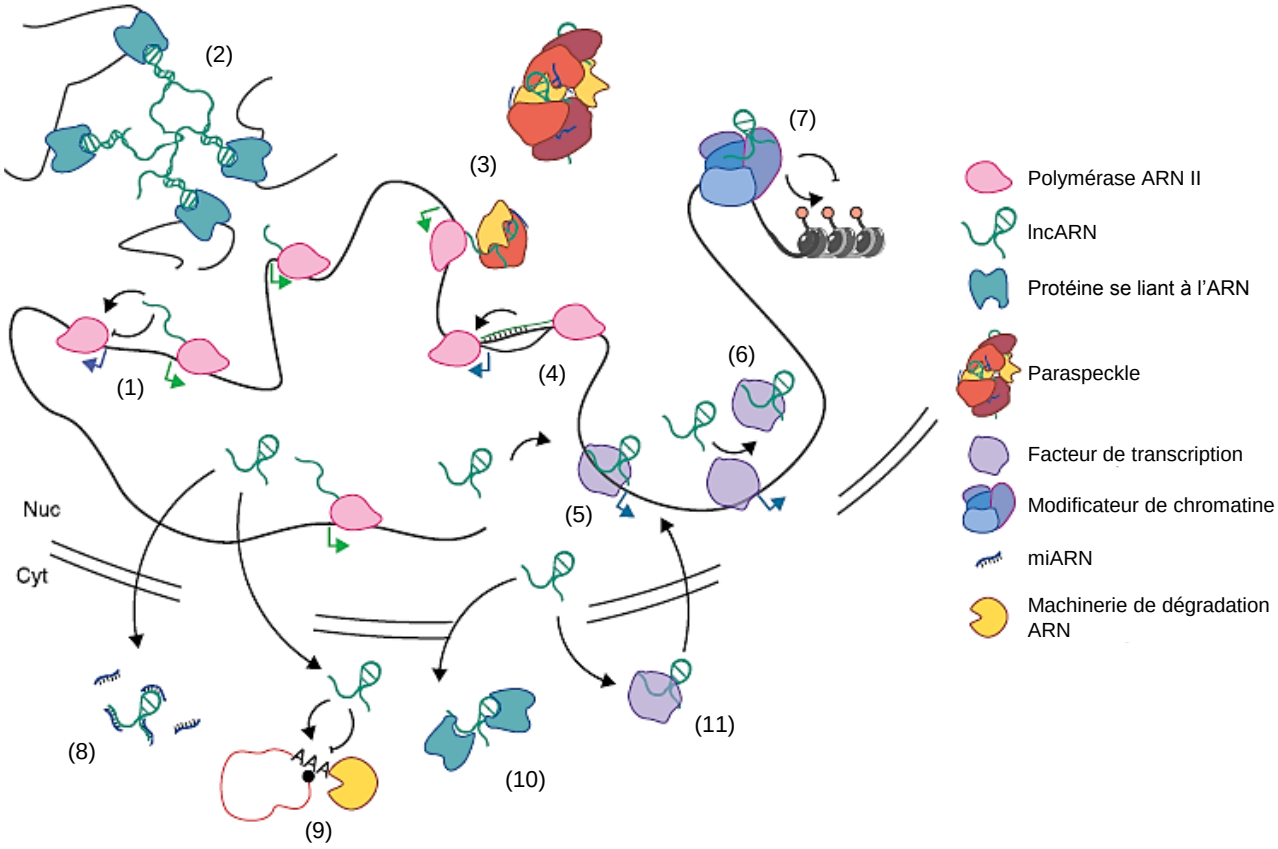


Figure 16: Représentation schématique de différents modes d'action des lncARN

1. Activation ou inhibition de la transcription des gènes voisins (appartenant au même cluster) ; 2. Implication dans les interactions inter chromosomes, 3.Participation dans la formation de structures nucléaires de type paraspeckle, 4. Ou de type R-loop ; 5. Rôle de guide ; 6. Ou de leurre envers les facteurs de transcription ; 7. Rôle d'échafaudage pour les complexes modificateurs de la chromatine ; 8. Rôle « d'éponge » à miARN ; 9. Rôle de leurre régulateur des modifications post-transcriptionnelles ; 10. Régulation de la localisation cellulaire des protéines associées à l'ARN ou 11. à l'ADN. Image traduite depuis Marchese et al, 2017 [156].

Le rôle et la fonction de nombreux lncARN n'ayant pas encore été élucidés, d'autres mécanismes d'action pourraient être découverts dans le futur.

2.5. Le transcriptome sanguin

Les études incluses dans ce travail ont été menées sur le transcriptome sanguin, à l'aide d'échantillons de sang total, de sérum ou de plasma.

Deux aspects du transcriptome sanguin sont à considérer. D'une part, les molécules ARN présentes dans les cellules sanguines sont protégées et sont mesurables dans les échantillons de sang total. D'autre part, il existe des ARN non-codants (en particulier les miARN), présents dans les fluides biologiques tels que le sang, le sérum ou le plasma, l'urine, la salive, les larmes ou encore le lait maternel [170]. Parmi eux, les ARN non-codants exprimés ou secrétés dans la circulation sanguine seront nommés ici circulants. Ces ARN circulants ont montré une résistance surprenante face à l'action des RNAse, de la température, de pH extrême ou encore face à des cycles de congélation/décongélation [171,172]. En effet, les molécules ARN sont généralement très sensibles et hautement dégradées par ces différents facteurs, ce qui laisse supposer que les ARN circulants disposent d'un système de protection, d'une résistance mise en place pour leur permettre d'exercer leur fonction dans les fluides biologiques. Cette dernière leur est conférée par leur moyen de transport dans les fluides biologiques, mettant en jeu leur association avec d'autres molécules.

2.5.1. Transport

2.5.1.1. Encapsulation

Les VE représentent la principale source d'ARN circulants dans le plasma [173]. Plusieurs types de VE ont été décrites (**Figure 17)** :

- Les plus petites mesurent entre 30 et 100 nm, ce sont les exosomes. Ils dérivent d'endosomes intracellulaires qui ont passé la membrane plasmique. Ils présentent la protéine transmembranaire CD63 [174].
- Les microvésicules mesurent entre 100 et 1000 nm, ils apparaissent à partir d'un bourgeonnement de la membrane plasmique.
- Les corps apoptotiques mesurent entre 500 et 2000 nm. Ils sont libérés à partir d'un bourgeonnement induit par un détachement localisé du cytosquelette sur la membrane plasmique. Ils sont généralement libérés par les cellules en cours d'apoptose.

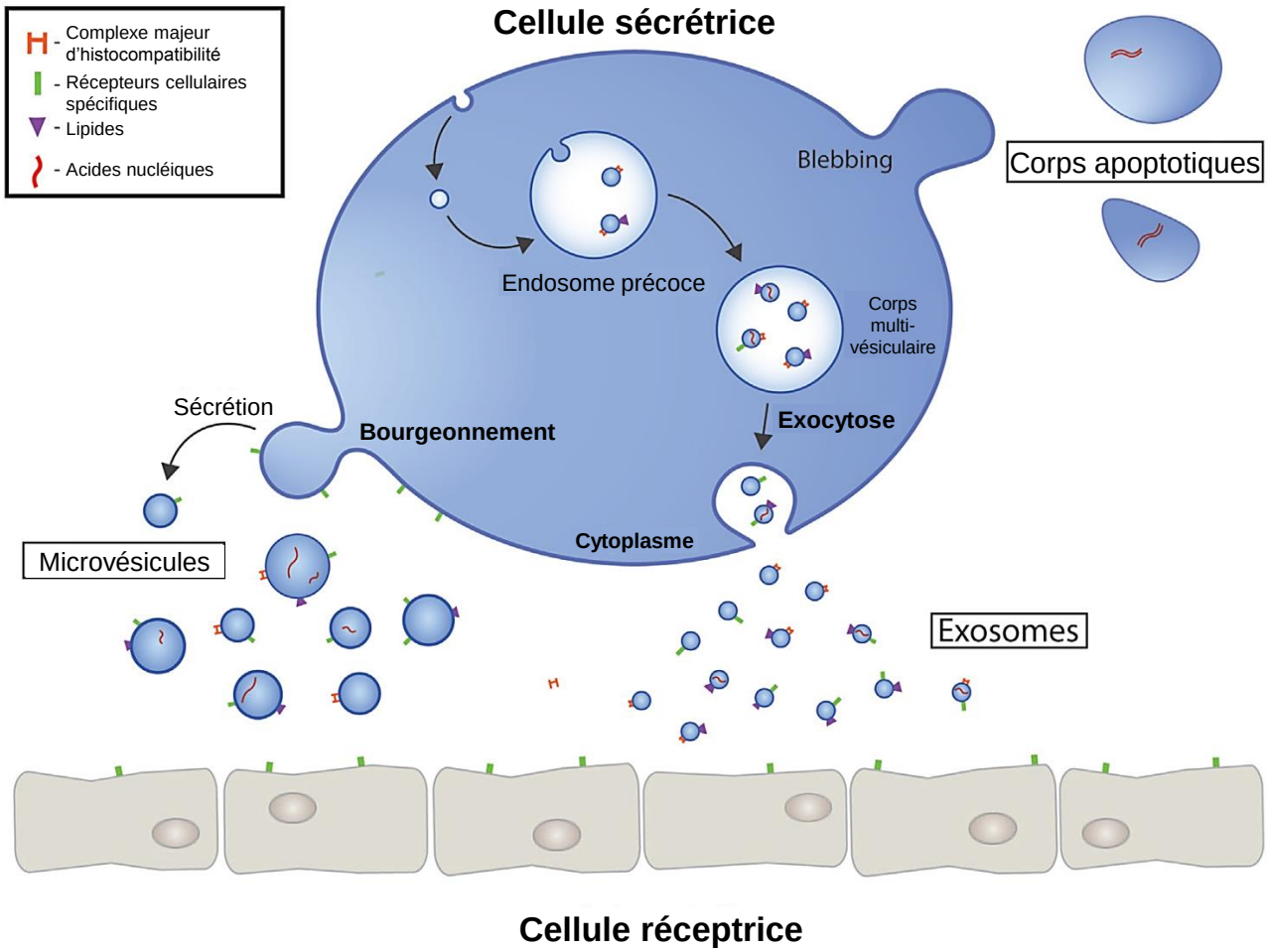


Figure 17: Formation des vésicules extracellulaires porteuses d'ARN circulant. Image traduite depuis Gustafon et al, 2017 [12]

La plupart des types cellulaires peuvent sécréter des VE, contenant de l'ADN, de l'ARN [175] (ARNm, miARN et lncARN) mais également des protéines et des lipides [12]. Les VE peuvent être internalisées par leur cellule cible par endocytose, qui est induite par la liaison entre les protéines de surface des VE et la membrane plasmique de la cellule réceptrice. Cependant, si la façon dont la cargaison des VE est récupérée par la cellule n'est pas encore élucidée [176], il a été montré que le transfert de la cargaison des VE peut induire des modifications sur la cellule cible [13]. De plus, de nombreuses études *in vitro* ont montré que des miARN inclus dans les VE sont capables de cibler leurs gènes cibles après transfert dans la cellule réceptrice [174].

2.5.1.2. Association protéique

Les ARN circulants sont également couplés à des molécules, plus simples et plus petites que les VE et capables de leur conférer une protection dans le milieu extracellulaire :

- Une sécrétion de molécules ARN accompagnée de protéines telles que la nucléophosmine 1 [177] ou Ago2 [178] a été rapportée.
- Les molécules ARN peuvent également se lier avec des lipoprotéines à haute densité [179,180]

Actuellement, les mécanismes responsables de la sortie de la cellule des complexes protéiques-ARN ne sont pas connus. Certaines hypothèses sont toutefois proposées : une sécrétion passive suite à l'apoptose (en particulier pour le complexe miARN-Ago2) [178] ou une implication des canaux cellulaires [134].

2.5.1.3. Fonction

Parmi les ARN circulants, les lncARN présents dans le sang semblent être moins protégés de la dégradation par les RNAse que les miARN [10].

Cependant, les différents types de transport évoqués ci-dessus et la demande d'énergie associée à leur réalisation laissent suggérer que des ARN circulants (et en particulier ceux encapsulés dans des VE) pourraient jouer un rôle de transmetteur dans le cadre d'une communication intercellulaire.

2.5.2. Origine et association avec les MCV

L'origine de ces ARN circulants est difficile à identifier, sauf pour les molécules ARN modulées dans le transcriptome des cellules sanguines. De même, la majorité des miARN circulants proviennent des cellules sanguines, mais également d'autres tissus tels que le cœur, les poumons, le foie et les reins [181]. Le niveau des ARN circulants peut également ne pas être uniforme : il apparait que les niveaux de miARN mesurés dans le sang issu des artères coronaires étaient différents de ceux observés dans le sang périphérique [182].

Le niveau tissulaire des ARN non codants est modulé au cours des MCV [11]. Ainsi l'expression de certains miARN est modulée dans le cœur de patients ayant subi un IM : les miR-1, miR-16, miR-24, miR-92a, miR-103/107, miR-195, miR-208, miR-325, miR-375, miR-494, miR-874 étaient sur-régulés dans les tissus cardiaques infarcis alors que les miR-30b, miR-133a/b, miR-145, miR-188-

3p, miR-214, miR-873, miR-2861 étaient sous-exprimé dans les tissus cardiaques infarcis comparé à des tissus sains [183].

La présence d'une mutation dans le lncARN MIAT (*myocardial infarction associated transcript*), qui est associé à l'IM, conduit à sa sur-expression [184]. De même, la présence de mutations sur le lncARN ANRIL est associée avec la susceptibilité de développer une maladie coronarienne [185].
L'expression de nombreux miARN est modulée dans le tissu aortique anévrismal comparé au tissu sain : telle que celle du miR-1 [186], miR-15a [187], miR-21 [186], miR-22 [187], miR-25 [187], miR-29a [186], miR-30c* [188], miR-133a [186], miR-133b [187], miR-143 [189], miR-145 [189] entre autres [190]. De même, l'expression de 147 lncARN est modulée dans des tissus aortiques thoraciques anévrismaux comparé à des tissus sains [191].

Considérées ensemble, ces informations laissent suggérer qu'une modulation de l'expression du transcriptome au niveau tissulaire pourrait également conduire à la modulation du transcriptome circulant. Le transcriptome circulant, ainsi modifié et peut-être même activement impliqué dans les processus pathologiques des MCV deviendrait ainsi un vivier à biomarqueurs diagnostiques, pronostiques et même thérapeutiques.

C'est pourquoi nous avons focalisé ce travail sur l'étude de la capacité de biomarqueur du transcriptome dans le cadre des MCV.

3. Chapitre 3 : Intérêt du transcriptome comme réservoir de biomarqueurs des maladies cardiovasculaires

3.1. Enjeux des biomarqueurs

3.1.1. Concept de médecine personnalisée

Le concept de médecine personnalisée est émergent depuis plusieurs années. Il correspond à un « modèle médical qui caractérise précisément les individus grâce à leur phénotype et leur génotype (accessibles grâce aux informations cliniques du patient, aux techniques d'imagerie médicale, et à l'ingénierie moléculaire) afin de prévenir une maladie, et/ou de proposer le diagnostic, le traitement le plus adapté aux particularités et aux besoins des individus » [10].

La médecine personnalisée propose de prendre en compte l'individualité du patient : depuis l'individu porteur d'une mutation rare le prédisposant à développer une maladie ou à être intolérant à un traitement, jusqu'à l'individu porteur de nombreuses comorbidités nécessitant une adaptation des traitements pour éviter les interactions néfastes. La médecine personnalisée permet un ajustement fin et précis de la balance bénéfice-risque à l'égard d'un traitement. En effet, en aidant à stratifier les patients (depuis ceux à faible risque jusqu'à ceux à risque élevé), elle permet de limiter les effets indésirables d'un traitement lourd n'apportant pas ou peu de bénéfices chez les patients à faible risque, et d'optimiser un traitement plus agressif (souvent plus lourd et plus coûteux) chez les patients à risque élevé [192].

3.1.2. Définition et qualités des biomarqueurs

Selon l'OMS, un biomarqueur correspond à « toute substance, structure, processus ou son produit dérivé qui peut être mesuré dans le corps, qui influence ou prédit l'incidence d'une maladie, son diagnostic ou son évolution » [193]. La définition du terme biomarqueur peut également inclure sa capacité à évaluer les effets d'un traitement, d'une intervention et ceux d'une exposition à un environnement donné [193]. Selon cette large définition, une mesure clinique telle que la mesure du pouls ou de la température peut être considérée comme un biomarqueur.

Un biomarqueur efficace, attractif doit présenter les qualités suivantes :

- Etre facile à mesurer, idéalement de manière peu ou pas invasive
- Ne pas être influencé ou modifié par des variations physiologiques telles que le rythme circadien ou d'autres facteurs tels que l'âge ou la prise de certains médicaments

- Etre suffisamment sensible pour assurer un taux élevé (idéalement 100%) de personnes malades reconnues malades d'après la valeur du biomarqueur [194]
- Etre hautement spécifique de la condition pathologique recherchée, ce qui correspond à un faible taux (voire nul idéalement) de personnes non-malades reconnues malades selon la valeur du biomarqueur [194].

La spécificité et la sensibilité sont deux qualités complémentaires d'un biomarqueur, conditionnées par l'association entre le biomarqueur et la condition pathologique recherchée. Elles peuvent être mesurées à l'aide d'une courbe ROC (*receiver operating characteristic*), qui oppose la sensibilité et la spécificité sur un graphique. L'aire sous la courbe (AUC ou *area under the curve*) sera alors calculée : plus cette dernière est grande (proche de 1), plus la spécificité et la sensibilité sont élevées et plus le biomarqueur est efficace. La courbe ROC est bien adaptée pour estimer la sensibilité et la spécificité d'un seul biomarqueur.

Un biomarqueur peut être utilisé en compagnie de plusieurs biomarqueurs pour augmenter la force diagnostique ou de prédiction. Toutefois, si les biomarqueurs apportent des indications précieuses au médecin, ils doivent toujours être interprétés avec un ensemble d'examens complémentaires et soumis à l'appréciation expérimentée du praticien. De plus, les indications données par les biomarqueurs peuvent ne pas corréler avec les symptômes ou le ressenti du patient.

Cliniquement, un biomarqueur ne sera pas utilisé seul. Il est donc intéressant d'estimer la capacité de prédiction d'un (ou plusieurs) biomarqueur(s) inclus dans un modèle de prédiction, qui contient d'autres variables déjà identifiées ou soupçonnées comme étant associées à la maladie d'intérêt. La régression logistique multivariée est utilisée pour générer ces modèles. Elle permet d'estimer l'association entre la présence de la maladie (pour un diagnostic) ou la survenue d'un évènement adverse après la maladie (pour le pronostic) et chacune des variables, en prenant en compte les éventuelles interactions pouvant exister entre ces variables. La régression logistique permet de définir un risque relatif (OR ou *odd ratio*) et un intervalle de confiance à 95% (CI 95%) pour chaque variable. L'OR renseigne sur le risque que la variable d'intérêt soit associée à la maladie étudiée ou à un évènement adverse. Il est associé au CI95%, qui représente l'intervalle entre lequel le risque relatif est compris dans 95% des cas. Ainsi, lorsque le nombre 1 est inclus dans le CI 95%, la variable n'est pas associée à la maladie ou à l'évènement adverse d'intérêt. Pour ce genre de modèle, la capacité diagnostique ou pronostique sera évaluée à l'aide du critère d'information d'Akaike (AIC ou *Akaike information criterion*) car il est pénalisé par le nombre de variables utilisées dans le modèle, ce qui

n’est pas le cas de l’AUC. Cela permet d’éviter un sur-ajustement du modèle dû à la multiplication des variables incluses dans le modèle.

Actuellement, le terme biomarqueur est généralement utilisé pour désigner les marqueurs biochimiques, pour lesquels on obtient une valeur quantitative. Ainsi, une valeur seuil objective pourra être définie au-delà de laquelle le diagnostic ou le pronostic seront considérés comme fiables.

Des biomarqueurs biochimiques peuvent être mesurés dans divers fluides biologiques tels que le sang ou l’urine. Les biomarqueurs biochimiques circulants, présents dans la circulation sanguine présentent l’avantage d’être accessibles de manière relativement peu invasive et peuvent refléter les variations internes de tous les organes, à l’inverse des biomarqueurs mesurés dans l’urine qui subissent le filtrage des reins.

3.1.3. Biomarqueurs et MCV

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à la capacité de diagnostic et/ou de prédiction des biomarqueurs dans le contexte des MCV et en particulier de l’IM, l’AAT et l’AC.

Certains biomarqueurs sont au cœur des recommandations et directives associées aux MCV. Ainsi, nous avons déjà présenté les biomarqueurs diagnostiques validés et utilisés pour le diagnostic d’IM ou d’IC, respectivement la c-TnT-us et le BNP ou le NT-proBNP, ou encore l’utilisation de la NSE dans la prédiction de l’évolution de la fonction neurologique après un AC. Ces biomarqueurs sont tous de type protéique et sont libérés par les cellules au cours de leur endommagement, de leur lyse ou de leur réponse à un stimulus. Ces biomarqueurs ont été validés sur de grandes cohortes de patients.

En revanche, si la c-TnT peut améliorer le diagnostic précoce de l’IM (elle augmente dès 3h30 post IM [195]), il a été reconnu que d’autres biomarqueurs, plus sensibles seraient nécessaires pour diminuer la mortalité de l’IM [134] en permettant un diagnostic encore plus précoce. L’amélioration de la mesure, permettant de mesurer la c-TnT-us a également permis une amélioration du diagnostic de l’IM [43]. Toutefois, les niveaux de troponine peuvent être modifiés lors de la survenue d’autres pathologies cardiaques telles que la myocardite [194] ou même chez des patients sans maladie coronarienne [196], attestant un manque de spécificité de ce biomarqueur.

Parallèlement, le NT-proBNP est le meilleur biomarqueur de l’évolution de la fonction cardiaque après un IM [192], toutefois, les niveaux de BNP peuvent également être modulés par des causes non

cardiaques telles que l'âge [52], la dysfonction rénale, l'obésité et certains médicaments [192]. De plus, sa capacité de prédiction est limitée. Il n'y a actuellement pas de preuves que les niveaux de BNP ou de NT-proBNP mesurés en série permettent de prédire la survie ou de réduire le temps d'hospitalisation chez les patients porteurs d'IC [52].

Pour augmenter la valeur diagnostique ou prédictive, plusieurs biomarqueurs pourraient être mesurés ensemble. Actuellement, aucune combinaison de biomarqueurs cardiovasculaires n'a permis d'amélioration notable de leur valeur de prédiction [197]. La découverte de nouveaux biomarqueurs pourrait ainsi permettre une augmentation significative de la valeur de prédiction, utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres biomarqueurs. En parallèle, de nombreuses molécules ont été identifiées comme étant de probables biomarqueurs sur de petites cohortes de patients. Cependant, leur utilisation effective comme biomarqueur n'aura lieu qu'après validation dans de plus grandes études[197].

La majeure partie des biomarqueurs aujourd'hui utilisés en médecine est de type protéique. Toutefois, les biomarqueurs peuvent être de tout type. Ces dernières années, un fort engouement a eu lieu envers les biomarqueurs transcriptomiques, qui comprennent toutes les molécules ARN ayant des capacités de biomarqueur.

3.1.4. Outils de mesure des biomarqueurs transcriptomiques sanguins

Plusieurs techniques existent pour mesurer l'expression des molécules ARN dans les fluides corporels. Voici les plus utilisées en recherche :

- Transcription inverse & polymérisation en chaîne

En recherche, la technique la plus utilisée et la plus sensible est la transcription inverse suivi d'une polymérisation en chaîne (PCR ou *polymerase chain reaction*) quantitative. Elle nécessite une extraction de l'ARN total contenu dans l'échantillon suivie par une transcription inverse. Cette dernière est effectuée par une transcriptase inverse qui transcrit les molécules d'ARN en ADN complémentaire (ADNc). L'ADNc sera amplifié dans une réaction de PCR quantitative. Brièvement, chaque molécule d'ADNc double brin sera ouverte en ADNc simple brin et sera répliquée par une polymérase. Un marqueur fluorescent (de type SYBR Green ou Taqman) est incorporé dans chaque nouveau brin d'ADNc formé. Au final, la PCR quantitative comprend 40 cycles de réplication (ou Ct). La mesure de la fluorescence permet une estimation qualitative de l'expression du transcrit. Un normalisateur spécifique du type d'échantillon est également mesuré. Il s'agit généralement de

l'ARNm d'un gène ou d'un ARN régulateur (snARN ou snoARN) exprimé stablement et fortement dans le tissu examiné, et qui servira de référence stable pour attester qu'une variation observée dans un échantillon est bien associée à la spécificité du patient et non à des biais techniques. La formule du $2^{(\Delta\Delta Ct)}$ (qui correspond à $2^{(Ct\ du\ normalisateur\ -\ Ct\ de\ l'ARN\ cible)}$) est généralement utilisée pour effectuer la normalisation et obtenir ainsi une expression relative. L'utilisation d'une courbe d'étalonnage, contenant une gamme de concentration du transcrit cible peut être utilisée comme référence afin d'obtenir une quantification précise du nombre de transcrits présents par microlitre.

Cette technique est sensible et relativement peu couteuse, toutefois elle consomme du temps (de nombreuses heures s'écoulent entre le prélèvement et le résultat). Elle présente d'autres limites : elle contient de nombreuses étapes susceptibles d'intégrer des biais, la normalisation relative peut rendre les études difficiles à comparer entre elles et nombreuses substances inhibent ou interfèrent avec la transcription inverse et/ou avec la PCR. Ainsi, l'héparine exogène (utilisée cliniquement comme anticoagulant ou dans les tubes de prélèvement sanguin) est associée à une inhibition de la PCR quantitative [198]. Différentes molécules présentes dans le sang telles que l'hémoglobine, ou l'immunoglobuline G [199] interférent également avec la réaction de PCR. Au cours de la première étude présentée dans ce travail, nous nous proposons d'évaluer les effets de l'héparine endogène (à des concentrations semblables à celles trouvé dans le sang en condition physiologiques) sur les réactions de transcription inverse et de PCR quantitative.

- Puces à ARN

Les puces à ARN comportent un grand nombre d'amorces, qui peuvent reconnaître plusieurs milliers de molécules ARN dans un seul échantillon. Plus spécifiquement, il existe des puces à ARNm, à miARN ou encore à lncARN, capables de reconnaître spécifiquement ces différents types de transcrits. Cette technique présente l'avantage d'obtenir l'expression de nombreux transcrits en même temps.

L'ARN total peut être hybridé directement sur ces puces, ce qui limite les biais techniques. Toutefois, les puces à ARN prennent du temps (en général elles nécessitent une hybridation d'une dizaine d'heure), restent coûteuses, ne permettent aucune quantification absolue et sont moins sensibles que la transcription inverse couplée à la PCR. Cette technique nécessite généralement une validation par une autre technique car des différences ont été observées entre des résultats issus de transcription inverse-PCR et ceux obtenus par puces à ARN pour le même échantillon [200].

- Séquençage ARN

Le séquençage ARN et en particulier le séquençage à haut-débit permet de connaître le transcriptome d'un échantillon donné. Cette technique puissante permet de lire directement les séquences de toutes les molécules ARN présentes dans l'échantillon. Elle est cependant très coûteuse, nécessite une grande quantité d'ARN au départ, nécessite du temps et est moins sensible que la transcription inverse couplée à la PCR.

Les limites associées aux techniques listées ci-dessus expliquent leur utilisation faible en clinique, en particulier à cause du temps qu'elles nécessitent pour obtenir un résultat. Elles induisent aussi une limite à l'utilisation des biomarqueurs transcriptomiques en clinique.

3.2. Transcriptome sanguin et potentiel de biomarqueur dans les MCV

Actuellement, à l'exception des 23 transcrits mesurés dans le test *Corus CAD* [14], et de ceux utilisés dans le test *AlloMap*® [15], à notre connaissance, aucun biomarqueur de type transcriptomique n'est cliniquement utilisé pour les MCV. Toutefois, un certain nombre de ces molécules présentent un potentiel de biomarqueur pour identifier les patients ayant un risque de développer un IM, pour aider au diagnostic de l'IM ou pour évaluer l'évolution cardiaque post-IM. Les miARN ont été découverts avant les lncARN, ainsi la littérature concernant les miARN est plus fournie que celle concernant les autres types d'ARN non codants. Les miARN circulants bénéficient d'une plus forte stabilité face aux RNAses que les lncARN, ce qui leur apporte un avantage comme biomarqueur. Toutefois, il est parfois difficile de trouver des miARN spécifiques d'un seul tissu, et cela peut nuire à leur association spécifique avec une maladie donnée. Les molécules ARN reportées comme ayant un potentiel de biomarqueur dans les MCV étudiées au cours de ce travail (IM, AAT et AC) sont présentées ci-dessous.

3.2.1. Risque avant l'IM, diagnostic et évolution de la fonction cardiaque post-IM

3.2.1.1. Patients à risque de subir un IM

La survenue d'un IM est difficile à prévoir, même chez les patients pour lesquels une maladie coronarienne a été identifiée. Quelques études basées sur des cohortes de personnes saines rapportent

une modulation du transcriptome chez les personnes porteuses d'une maladie coronariennes ou ayant subi un IM.

- ARNm

Les personnes souffrant de sténose coronarienne sont une population ayant un risque de subir un IM. Chez 106 patients, l'expression de 14 ARNm codants (pour les gènes *CAPG, MGST1, CSPG2, ALOX5, VSIG4, NS5ATP13T, CD4, IL1RN, HP, CSF3R, CSF2RA, HK3, RNASE2* et *CREB5)* dans les cellules sanguines est corrélée avec la présence et la sévérité de sténose coronarienne. L'expression de ces gènes était aussi capable de distinguer les patients atteints de maladie coronarienne comparé à des personnes saines [201]. Toutefois, cette étude ne précise pas la valeur pronostique de ces 14 gènes ensemble envers l'occurrence d'IM.

De même, l'expression d'un ensemble de 23 transcrits dans les cellules sanguines, traitée par un algorithme, est capable de diagnostiquer les personnes ayant une maladie coronarienne de type obstructive. Ces résultats sont à l'origine d'un test diagnostique actuellement commercialisé aux Etats-Unis, le test *Corus CAD* [14]. L'identification de ces patients ne permet pas de prédire, lesquels parmi eux, auront un IM mais elle permet de détecter la maladie coronarienne et de mettre en place le traitement et la prévention adéquats pour limiter la survenue de complications dramatiques comme un IM.

- MiARN

Au sein d'une population saine suivie pendant 10 ans, une première étude contenant 212 personnes montre que l'inclusion de l'expression sérique d'un ensemble de miARN (miR-106a-5p, miR-424-5p, let-7g-5p, miR-144-3p et miR-660-5p) dans un modèle permettait de prédire de la survenue d'un IM fatal avec une AUC de 0,78. De plus, l'ajout des niveaux d'expressions de ces miARN au score de Framingham permet d'améliorer la prédiction de survenue d'IM fatal [202].

Une seconde étude, qui a également suivi une population saine de 820 personnes pendant 10 ans, rapporte que les patients ayant de faibles taux de miR-223 et miR-197 et de forts taux de miR-126 avaient un fort risque de subir un IM. En particulier, l'expression des miR-126 et miR-223 était associée avec la survenue d'IM fatals [203].

Une autre étude a suivi une cohorte de patients souffrant de maladie coronarienne pendant 4 ans. Chez ces patients, les niveaux sériques des miR-132, miR-140-3p et miR-210 semblent capables de prédire la survenue d'une mort cardiovasculaire avec une AUC respective de 0,74; 0,76 et 0,75 [204]

.

- LncARN

Au sein d'une étude à large échelle (188 patients ayant subi un MI et 752 personnes saines), une sur-régulation du lncARN MIAT provoquée par la présence d'une à plusieurs mutations sur le transcrit est associée avec un risque accru de développer un IM [184]. Depuis, il a été montré que MIAT est pro-fibrotique au niveau cardiaque et qu'il induit la prolifération des fibroblastes cardiaques ainsi que leur production de collagène. Il semble également être capable de se lier au miR-24 [205].

3.2.1.2. Diagnostic de l'IM

Certains biomarqueurs (en particulier les troponines cardiaques) sont actuellement utilisés pour diagnostiquer un IM. Toutefois, ces dernières ont parfois été critiquées car elles ne permettent pas un diagnostic précoce de l'IM (la c-TnT met 3h30 pour être augmentée [195]) et peuvent être modulées par d'autres maladies que l'IM [194,196]. Certains transcrits circulants ou exprimés par les cellules sanguines sont modulés après un IM et pourraient avoir un potentiel de biomarqueurs diagnostiques.

- ARNm

Kim et al ont observé une modification du transcriptome (par puce à ARN) du sang total chez des patients ayant subi un IM [206]. Dans une autre étude, le transcriptome de 28 patients ayant subi un STEMI a été comparé au transcriptome des mêmes patients 6 mois post-IM, après leur stabilisation. Ils ont observé une modulation de l'expression de 24 transcrits exprimés par les cellules mononuclées sanguines périphériques [16].

Dans une étude comprenant 89 patients ayant subi un IM comparé à 65 contrôles sains, un ensemble de 7 transcrits exprimé dans le sang total a été identifié comme capable de déterminer les patients atteints d'IM avec une AUC de 0,86. Toutefois, aucune comparaison n'a été faite avec les marqueurs cardiaques validés [207].

Le transcriptome du sang total est donc modulé après un IM, et ses capacités de biomarqueur diagnostique commencent à être étudiées.

- MiARN

Les changements de niveaux de miARN circulants sont mesurables dès 1h post-IM [208]. Les niveaux plasmatiques [17] et sériques [18] des miR-1, miR-133a, miR-208 et miR-499-5p étaient capables de discriminer efficacement les patients diagnostiqués avec un IM. Dans ces deux études à petite échelle (71 [18] et 25 patients [17]), la valeur diagnostique du miR-1 correspond à une AUC oscillant entre 0,77 [18] et 0,98 [17], celle du miR-133a est associée à des AUC de 0,86 [18] et 0,93 [17], celle du miR-208b entre 0,94 [18] et 1 [17] et finalement entre des valeurs d'AUC de 0,82 [18] et 0,99 [17] pour le miR-499-5p. D'autres études rapportent que les niveaux de miR-208b et miR-499-5p étaient corrélés avec les niveaux de c-TnT [209], de c-TnT-us, de CPK et avec la taille de l'IM [208]. Les niveaux de miR-1 ; miR-133a ; miR-133b et miR-208b étaient associés avec les niveaux de c-TnT-us [210] ; et la capacité diagnostique du miR-499-5p serait équivalente à celle de la c-TnT-us [208].

De nombreuses études rapportent des modulations d'expression des miARN circulants (d'origine cardiaque ou non) suite à un IM. Ainsi, certains sont surexprimés chez les patients porteurs d'un IM : miR-1[209,211] (AUC = 0,81) [212], miR-19a (AUC = 0,99)[213] , miR-19b-3p [214], miR-21[215,216], miR-29b [216], miR-30d [217](AUC= 0,92) [218], miR-34a[219], miR-122-5p [220], miR-125b-5p (AUC = 0,88)[218], miR-133a [209,211,221], miR-133b [211], miR-134-5p[222,214], miR-150 [223], miR-181a (AUC = 0,83)[224], miR-186-5p [214], miR-208b [208,209,212], miR-221-3p (AUC = 0,88)[225], miR-320a [226], miR-328[222], (AUC = 0,81)[221], miR-423 [217], miR-486 [223], miR-499-5p [208,209,211,212], miR-663b [227], miR-1291 [227] dans le sang de patients ayant subi un IM.
D'autres miARN sont, à l'inverse, sous-exprimés chez les patients souffrant d'un IM : le miR-122 [211], miR-223 [209] et miR-375 [211].

Parmi les miARN cités ci-dessus, certains sont exprimés différemment en fonction du type d'IM. Les niveaux de miR-150 [223], miR-208a [210], miR-486 [223] et miR-1291[227] étaient plus élevés chez les patients de type NSTEMI que les STEMI. Inversement, les miR-208b et miR-499-5p étaient plus élevés chez les patients souffrant de STEMI que chez les patients avec NSTEMI [208].

Toutefois, les études rapportées ci-dessus sont généralement des études à petite ou moyenne échelle, et nécessiteraient une validation à grande échelle. De plus, si dans certaines études cité ci-dessus, le niveau des miARN présentés est corrélé avec les marqueurs cardiaques, ces miARN ne surpassent pas la spécificité et la sensibilité de la c-TnT envers le diagnostic de l'IM [192,208].

- LncARN

Le lncARN MYHEART est sur-régulé chez les patients ayant subi un IM, et il est positivement corrélé avec les niveaux de c-TnT [228]. L'expression du lncARN UCA1 est rapidement diminuée après un IM mais augmente 3 jours post-IM. De plus, les niveaux d'UCA1 sont inversement corrélés avec les niveaux de miR-1 (qui lui est rapidement surexprimé après un IM). UCA1 semble être une cible du miR-1 [229].

Au cours d'une étude menée par notre laboratoire, il a été observé que les lncARN aHIF, KCNQ1OT1 et MALAT1 sont sur-régulés, alors que le lncARN ANRIL est sous-régulé dans le sang total prélevé lors de la reperfusion post-IM [19]. L'expression sanguine d'aHIF est également positivement associée aux pourcentages de globules blancs, de neutrophiles, aux niveaux de MMP9 et de TIMP1, mais négativement associée au pourcentage de lymphocytes. A l'inverse, les niveaux d'ANRIL sont positivement associés avec les pourcentages de lymphocytes et monocytes, et sont négativement corrélés avec les niveaux de MMP9, globules blancs, neutrophiles et plaquettes. Ces résultats suggèrent un lien entre ces lncARN et la réponse inflammatoire du compartiment sanguin après un IM [19], qui participe à la mise en place du remodelage ventriculaire.

Toujours dans le sang total, les niveaux de lncARN ZFAS1 sont inférieurs alors que les niveaux de CDR1AS sont supérieurs chez des patients ayant subi un IM [230]. L'utilisation combinée des 2 lncARN permet l'obtention d'une AUC de 0,75 pour le diagnostic de l'IM, montrant leur potentiel de biomarqueur diagnostique. Toutefois, cette étude ne présente pas de comparaison avec d'autres marqueurs cliniques tels que la c-TnT [230].

Le potentiel de biomarqueur diagnostique de l'IM des lncARN est et continuera à être de plus en plus étudié.

3.2.1.3. Pronostic post-IM

Les biomarqueurs actuels ne permettent pas une prédiction efficace de l'évolution cardiaque post-IM. Le potentiel de biomarqueur post-IM du transcriptome a commencé à être évalué.

- ARNm

Plusieurs études effectuées par notre laboratoire, utilisant des puces à ARN (et une validation par PCR quantitative) ont été couplées à des prédictions d'interactions protéines-protéines. Elles ont mené à la découverte de plusieurs ensembles de transcrits codants exprimés dans le sang total collecté 12h post-IM et associés avec une dysfonction ventriculaire à 4 mois post-IM. Le groupe de transcrits

codant pour les gènes *TRAF2, SH3KBP1* et *UBC* est capable de discriminer les patients ayant un risque de développer une dysfonction ventriculaire post-IM avec une AUC de 0,83 [231]. Un autre ensemble de transcrits, codant pour les gènes *TGFBR1, PTK2* et *ITK* peut prédire ce risque avec une AUC de 0,76 (AUC de 0,72 pour le *TGFBR1* seul) [232], alors que les groupes de transcrits codant pour les gènes *VEGFB, TSP1, PGF* [233] ; et *VEGFB, DAXX, TNXB* (ténascine B) et *LTBP4* (protéine latente 4 liée au facteur de croissance transformant beta) [234] prédisaient le risque de dysfonction ventriculaire avec des AUC respectives de 0,76 et 0,75. Enfin, le groupe de deux gènes *LMNB1* (lamine B1) et *TP53RK* prédisaient ce risque avec une AUC de 0,82 [235]. Ces études étaient de taille variable, comprenant entre 32 [232,231] et 127 patients [233]. La valeur pronostique de ces ensembles de transcrits est limité par l'échelle relativement petite de ces études. Une étude à plus grande échelle pourrait infirmer ou confirmer leur valeur prédictive envers l'évolution de la fonction ventriculaire post-IM : cette étude a été effectuée dans le cadre de ce travail, elle correspond à l'étude 2.

- MiARN

La capacité de prédiction de l'évolution cardiaque post-IM des miARN circulants différentiellement exprimés lors d'un IM a été étudiée, en particulier pour les miARN miR-1, miR-133a, miR-208 et miR-499-5p.

Widera et al ont montré, dans une étude comprenant 444 patients, que les niveaux d'expression des miR-1, miR-133b, miR-208a et miR-499-5p n'étaient pas associés avec la survie à 6 mois post-IM[210]. Une autre étude comprenant 510 patients montre que les miR-208b et 499-5p ne prédisaient pas la survie post-IM à court (1 mois), moyen (4 mois) ou long terme (1 an [236], ou même 2 ans pour le miR-208b[226]), bien qu'une corrélation inverse entre les niveaux de miR-208b et miR-499 et la FE ventriculaire à 4 mois post-IM ait été observée dans une autre étude [208]. Gidlof et al ont montré que les niveaux circulants de miR-208b et miR-499-5p semblaient associés au risque de développer une IC ou de mourir à 30 jours post-IM. Cette association disparait après ajustement avec les niveaux de c-TnT, confirmant les résultats des autres études citées ci-dessus [237].

Les niveaux plasmatiques des miR-208b et miR-34a utilisés ensembles étaient capables de prédire le développement d'une IC ou la mort post IM avec une AUC de 0,74. Par comparaison, l'AUC du NT-proBNP dans cette étude, contenant 359 patients, était de 0,67 et l'ajout des miR-208b et miR-34a dans le modèle de prédiction augmentait la valeur prédictive de ce dernier [219].

Les niveaux circulants des miR-133a et miR-208b étaient associés avec toutes les causes de mortalité à 6 mois post-IM. Toutefois, cette association disparait après ajustement avec la c-TnT-us [210], et ces deux miARN n'améliorent pas la capacité de prédiction de la c-TnT-us [210].
Enfin, dans une étude à petite échelle (21 patients), Alavi-Moghaddam et al rapportent une association entre les niveaux de miR-208b et la survie à 6 mois post-IM[238]. La valeur prédictive du miR-208b semble donc assez inconstante.
Une autre étude, incluant 216 patients, rapporte que les niveaux circulants de miR-133a étaient corrélés avec la taille de l'IM. De plus, des niveaux élevés de miR-133a étaient associés (de manière univariée) avec un risque accru d'évènement majeur cardiovasculaire (défini comme un nouveau IM ou l'apparition d'une IC) dans les 6 mois post-IM [239].

Zile et al, rapportent dans une étude de petite échelle (12 patients vs 12 contrôles), que les niveaux circulants des miR-1 ; miR-21 ; miR-29a ; miR-133a et miR-208 sont associés avec le remodelage ventriculaire. Toutefois, les niveaux de ces miARN ont subi des variations importantes entre 2 et 90 jours post-IM [240]. Une seconde étude à petite échelle (44 patients vs 18 contrôles), rapporte une surexpression plasmatique des miR-1, miR-21 et miR-29b à 9 jours post-IM. De plus, les niveaux de miR-1 et miR-29b étaient corrélés avec les changements de volume d'infarctus et le miR-29b était associé avec les modifications de volume de fin de diastole du ventricule gauche entre 4 jours et 6 mois post-IM [216].

Une étude à petite échelle (26 patients et 28 contrôles), rapporte que les niveaux de miR-155 et miR-380 sont augmentés chez les patients ayant succombé à une mort d'origine cardiaque dans l'année suivant la survenue de leur IM. La valeur pronostique de ces miARN n'a pas été définie [241].

Une étude menée par notre laboratoire montre que des niveaux plasmatiques réduits de miR-150 sont associés avec un remodelage ventriculaire délétère, et le miR-150 est capable de prédire la variation du volume ventriculaire de fin de diastole obtenue 4 mois post-IM, avec une valeur prédictive plus élevée que le NT-proBNP. De plus, un modèle qui contient les niveaux de miR-150 et de NT-proBNP a une valeur prédictive augmentée comparé au modèle contenant les niveaux de NT-proBNP seuls [242].

Un panel comprenant les miR-16, miR-27a, miR-101 et miR-150 améliore la valeur pronostique du NT-proBNP sur une cohorte de 150 patients [243]. De faibles niveaux de miR-150 et miR-101 et des

niveaux élevés de miR-16 et miR-27a sont associés à des risques plus élevés de dysfonction de la contraction ventriculaire post-IM pour les patients [243].

Dans une étude comprenant 359 patients, les niveaux de miR-328 et miR-134 élevés permettaient de prédire la dysfonction ventriculaire à 6 mois post-IM (marquée par une mort de cause cardiaque, l'apparition d'une IC ou une FE < 40%), de manière plus spécifique que la c-TnT-us [222].

Dans une cohorte de 99 patients, le miR-30a-5p était plus exprimé dans le sérum et le plasma de patients ayant eu un IM que chez les contrôles, qui souffraient de maladie coronarienne stable. Il est également associé avec le développement d'une dysfonction cardiaque, caractérisée par une FE <50 et NT-proBNP > 150pg/ml à 6 mois post IM (AUC = 0,75) [244].

Cortez-Diaz et al ont montré dans une étude incluant 160 patients que les niveaux sériques de miR-122-5p en combinaison avec miR-133b aident à stratifier correctement les patients STEMI ayant un risque de mort (toutes causes confondues), de récurrence d'IM ou de survenue d'un nouvel évènement cardiovasculaire (comprenant la mort, un IM, une angine de poitrine, un AVC, une hospitalisation pour IC [220]).

Au sein d'une étude de 237 patients, les niveaux plasmatiques de miR-146a, miR-21 étaient des prédicteurs indépendants du remodelage ventriculaire délétère observé à 1 an post-IM, avec des AUC respectives de 0,82 et 0,72 [245].

Les niveaux sériques de miR-192, miR-194 et miR-34a mesurés à 18 jours post-IM étaient augmentés chez les patients qui ont développé une IC à un an post-IM. De plus, les niveaux des miR-194 et miR-34a étaient corrélés avec les dimensions du ventricule gauche en fin de diastole. Cette étude ne contient pas d'évaluation de la capacité pronostique de ces miARN [246].

- LncARN et circARN

Il a été démontré par séquençage ARN que l'expression de plusieurs centaines de lncARN est modulée dans le cœur après un IM, et qu'ils pourraient être associés avec le remodelage ventriculaire délétère [247].

Kumarswamy et al ont démontré que l'expression plasmatique du lncARN LIPCAR ou *Long intergenic noncoding RNA predicting cardiac remodeling* augmente à partir du troisième mois post-

IM, est plus élevée chez les patients ayant une IC et est associée avec la mortalité cardiovasculaire des patients post-IM.

De plus, l'expression des lncARN ANRIL et KCNQ1OT1 dans le sang total peut prédire la dysfonction ventriculaire à 4 mois post-IM dans une cohorte de 414 patients, avec des AUC respectives de 0,67 et de 0,68. L'ajout de l'expression d'ANRIL et KCNQ1OT1 dans un modèle contenant les paramètres cliniques, démographiques et les biomarqueurs cardiaques a permis une amélioration de la capacité de prédiction de ce modèle[19].

La fonction des ARN circulaires reste actuellement méconnue. Toutefois, une étude menée par notre laboratoire a montré que l'ARN circulaire MICRA (*Myocardial Infarction-associated Circular RnA*) était surexprimé dans le sang total de 875 patients ayant subi un IM, et qu'il était un prédicteur indépendant de la FE ventriculaire à 4 mois post-IM. De plus, MICRA était capable d'augmenter la valeur prédictive des biomarqueurs cardiaques [248].

3.2.2. Risque de développer un AAT et de dissection aortique

L'incidence de l'AAT (ou des complications qu'elle engendre) est moins importante que celle de l'IM ou de l'AC. Ainsi, des études de petites échelles sont plus souvent menées dans le contexte de l'AAT que pour d'autres MCV.

3.2.2.1. Patients à risque de développer un AAT

A notre connaissance, le risque de développer un AAT est peu étudié et cela pour plusieurs raisons. Dans le cas des AAT de formes familiales ou syndromiques, les patients à risque sont généralement identifiés grâce au conseil génétique fourni à toute la famille lors de la découverte de l'AAT ou du syndrome chez l'un des membres. De plus, l'AAT en soi n'est pas dangereux, ce sont les complications qu'il engendre qui le sont, ainsi plus d'efforts sont portés sur le diagnostic d'un AAT présent plutôt que sur la prévention de sa formation. Toutefois, prévenir la formation d'un AAT et être capable de ralentir ou même bloquer son extension représenterait une amélioration du confort de vie des patients, car si une aorte réparée permet la survie, elle modifie la qualité de vie et peut être associée à des modifications.

3.2.2.2. Diagnostic de l'AAT

L'AAT est une maladie silencieuse, asymptomatique, ce qui la rend difficile à diagnostiquer. L'utilisation de biomarqueurs sanguins faciliterait son diagnostic. Cependant, il n'existe actuellement

pas de biomarqueurs diagnostiques associés à cette maladie et peu d'études ont évalué l'association entre le transcriptome sanguin et le développement d'un AAT.

Dans une étude à petite échelle (42 patients avec AAT, 21 avec BAV, 21 avec valve aortique tricuspide et 10 contrôles sains), les miR-21, miR-29a, miR-143 et miR-145 étaient moins exprimés dans le plasma de patients porteurs d'un AAT que dans celui des personnes saines. Inversement, les niveaux plasmatiques de miR-133a étaient plus élevés chez les patients porteurs d'AAT. De plus, une combinaison des niveaux plasmatiques de miR-133a, miR-143 et de MMP-8 étaient capables de déterminer quels patients avaient un AAT avec une AUC de 0,97. Parmi les patients porteurs d'un AAT, une combinaison de l'expression plasmatique de MMP-2, TIMP-2, miR-143, miR-145 et miR-133a permettait de distinguer les patients porteurs d'une BAV avec une AUC de 0,98. Enfin, l'expression de MMP-2, du miR-143 et de MMP-8 dans le plasma étaient associés avec un AAT et une valve aortique normale avec une AUC de 0,96 [20].

Une autre étude a récupéré des échantillons de plasma chez 11 patients porteurs d'AAT, avant et après leur chirurgie réparatrice de l'aorte. L'expression des miR-24-3p, miR-29a-3p, miR-223-3p, miR-193a, miR-145-5p, miR-133a-5p, miR-143-3p, miR-30a-5p et miR-30b-5p a été mesurée dans ces échantillons. Tous ces miARN apparaissent légèrement surexprimés dans le plasma prélevé après l'opération, mais pas de manière significative sauf pour le miR-193a. Ces miARN avaient été choisis car déjà observés dérégulés dans les tissus aortiques et plasmas de patients porteurs d'AAT. Toutefois, la très petite taille de cette étude rend toute validation difficile à conclure [21].

Le lncARN HIF1α-AS1 a été trouvé surexprimé dans le sérum de patients souffrant d'un anévrisme aortique thoraco-abdominal comparé aux personnes saines [249].

Au cours de l'étude 3, nous nous proposons d'identifier des miARN à la fois différentiellement exprimés dans le tissu anévrismal comparé au tissu aortique sain mais également différentiellement exprimé dans le plasma des patients comparé à des personnes saines. De tels miARN seraient ainsi à la fois des biomarqueurs diagnostiques potentiels de l'AAT, mais également probablement impliqués dans la pathogénèse de la maladie.

3.2.2.3. Prédiction du risque de dissection aortique

L'AAT est associé à la dissection aortique, qui est elle-même associée à un fort taux de mortalité. Peu d'études se sont intéressées à l'implication du transcriptome sanguin dans la dissection aortique.

Toutefois, quelques études ont évalué le profil d'expression des miARN circulants dans le contexte de la dissection aortique.

Wang et al ont observé que 33 miARN étaient sur-régulés et que 60 étaient sous-régulés dans le plasma de 20 patients avec dissection aortique vs 20 personnes saines [250]. Parmi eux, les miR-4313, miR-933, miR-1281 et miR-1238 étaient surexprimés dans le plasma mais également dans le tissu aortique provenant de patients ayant une dissection aortique. La valeur pronostique de ces miARN concernant la survenue d'une dissection aortique n'a pas été étudiée ici [250].

Une étude à grande échelle impliquant 104 patients avec une dissection aortique aigue et 103 contrôles sans dissection aortique appariés selon leur âge a également pris en compte l'effet de l'hypertension. Les miR-25, miR-29a, miR-155 étaient sur-régulés et le miR-26b était sous-régulé dans le sérum de patients souffrant de dissection aortique, indépendamment de l'hypertension, comparé aux contrôles sains. De plus, l'expression sérique des 4 miARN pouvait déterminer quels patients étaient porteurs d'une dissection aortique : miR-25 avec une AUC de 0,86, miR-29a avec une AUC de 0,97, miR-155 avec une AUC de 0,87 et miR-26b avec une AUC de 0,80. La combinaison de l'expression de ces 4 miARN permettait d'améliorer l'AUC jusqu'à 0,98 [251].

Une autre étude s'est intéressée à l'association entre la signature de miARN circulant et la présence d'une BAV. La BAV est un facteur associé à la survenue de l'AAT et également par extension à celle de la dissection aortique [252]. Les niveaux plasmatiques de miR-122, miR-130a et miR-486 étaient modulés entre les patients porteurs de BAV et ceux porteurs d'une valve aortique tricuspide. En revanche, le niveau plasmatique de miR-718 était augmenté chez les patients présentant un AAT (indépendamment du type de valve aortique) et était inversement corrélé avec la taille du diamètre aortique, suggérant un potentiel de biomarqueur prédictif de la survenue d'une dissection aortique [252].

Dong et al ont observé que le miR-15a était plus exprimé dans le plasma de patients ayant eu une dissection aortique que chez les personnes saines [253]. La capacité du miR-15a à diagnostiquer la dissection aortique était associée à une AUC de 0,76. La capacité diagnostique d'autres miARN a été étudiée bien que ces derniers ne soient pas différentiellement exprimés chez les patients porteurs de dissection aortique. Le miR-let-7b avait une AUC de 0,73 et le miR-23a avait une AUC de 0,73 [253].

En utilisant des puces à miARN, une autre étude a identifié 9 miARN surexprimés et 12 miARN sous-exprimés dans le plasma de patients ayant subi une dissection aortique. Parmi eux, le miR-4787-5p et le miR-4306 étaient également surexprimés dans les tissus aortiques des patients ayant subi une dissection aortique. Ces miARN étaient capables de diagnostiquer la dissection aortique avec des AUC respectives de 0,90 et 0,87 respectivement. Le miR-4306 est capable de se lier au transcrit codant pour le gène *TGFβ1*, suggérant une régulation de la voie du TGFβ (très altérée dans l'AAT) par ce miARN [254].

3.2.3. Risque de subir un AC, évolution neurologique et survie post-AC

La prédiction de la survenue d'un AC et de l'évolution neurologique post-AC reste difficile si ce n'est impossible, démontrant un réel besoin de biomarqueurs pronostiques. En revanche, le diagnostic de l'AC est simple, très rapide et indolore grâce à l'utilisation de l'ECG et la recherche de biomarqueurs diagnostiques de l'AC ne semble pas très utile.

3.2.3.1. Patients à risque de subir un AC

Les troubles du rythme, provoqués par des modifications structurelles ou fonctionnelles du cœur ou encore par une anormalité des canaux (calciques, potassiques etc) des cardiomyocytes sont une cause d'AC. Chez ces patients, la détection de la maladie peut être difficile car ces arythmies peuvent être ponctuelles et ne pas être détectées lors des consultations chez le praticien.

Actuellement, il n'y a pas de biomarqueur capable de prédire la survenue d'arythmies dangereuses [108]. De même, à notre connaissance, il n'existe aucune étude de l'implication ou de l'association du transcriptome avec la survenue d'un AC.

En revanche, quelques études ont observé une modulation des niveaux de miARN circulants chez des patients souffrant de troubles de rythme tels que la FV, la TV ou encore la fibrillation atriale. En particulier, le miR-133a est plus exprimé dans le plasma d'enfants souffrant de TV [255] et le miR-1 est diminué dans le plasma d'enfants souffrant de tachycardie supra-ventriculaire [255], et dans le plasma d'adultes atteints de fibrillation auriculaire [256]. En outre, les miR-21 et miR-150 étaient sous-exprimés dans le plasma de 19 patients avec fibrillation auriculaire comparé à 12 contrôles sains. De plus, les niveaux d'expression de ces miARN ont été augmentés après ablation chirurgicale des voies électriques accessoires [257]. Quatre autres études rapportent également une sous-expression du miR-150 dans le plasma de patients porteurs de fibrillation auriculaire [258].

Les niveaux plasmatiques des miR-144-3p, miR-145-5p, miR-185-5p et miR-494 étaient surexprimés chez des patients souffrant d'arythmie ventriculaire. De plus, le miR-494 semble capable de prédire la récurrence d'arythmie ventriculaire avec une AUC de 0,83[259].

Ces résultats laissent suggérer que parmi ces miARN modulés par les troubles du rythme, certains pourraient avoir une valeur pronostique quant à la survenue d'un AC chez les patients souffrant de troubles du rythme.

3.2.3.2. Prédiction de l'évolution neurologique et de la survie

Actuellement, peu d'études se sont intéressées au transcriptome sanguin des patients après un AC et à son association avec l'évolution neurologique et la survie.

- ARNm

Dans une étude comprenant 22 patients ayant survécu après un AC, Eun et al ont observé que 237 transcrits étaient sur-régulés et 150 étaient sous-régulés dans le sang total des patients ayant une mauvaise évolution cérébrale (CPC 4 à 5) à 6 mois post-AC. Parmi eux, le potentiel prédictif de 3 transcrits concernant l'évolution neurologique post-AC a été évalué : les transcrits codants pour les gènes *AKT1* et *MAPK3* étaient sur-régulés et respectivement associés à une AUC de 0,77 et 0,87 alors que le transcrit codant pour *BCL2* était sous-régulé et associé à une AUC de 0,80 [22].

- miARN

Quelques études ont évalué le potentiel pronostique de plusieurs miARN. Parmi elles, une étude à petite échelle (28 patients) menée par notre laboratoire a montré que les niveaux circulants de miR-21-5p et miR-122-5p étaient élevés à 48h post-AC. De plus, ces miARN étaient surexprimés chez les patients ayant une mauvaise évolution neurologique post-AC et pouvaient prédire l'évolution neurologique avec une AUC de 0,73 pour le miR-122-5p et de 0,77 pour le miR-21. Toutefois, la valeur prédictive de la NSE était plus élevée, avec une AUC=0,98 [260]. Une autre étude a ensuite montré que les niveaux de miR-122-5p augmentaient fortement à l'admission puis diminuaient à partir de 72h post-AC. Dans cette étude comprenant 177 patients, les niveaux de miR-122-5p n'étaient pas associés avec la survenue d'un choc lors de l'admission ni avec les différentes causes de mortalité [261].

Une autre étude à petite échelle menée sur 65 patients a démontré une surexpression du miR-124-3p circulant chez les patients ayant subi un AC comparé à des contrôles sains. De plus, parmi les patients

ayant survécu à un AC, l'expression du miR-124-3p était augmentée chez les patients victimes d'une mauvaise évolution neurologique comparé aux patients avec une bonne évolution neurologique à 6 mois post-AC. Le miR-124-3p était capable de prédire l'évolution neurologique post-AC avec une AUC de 0,89 [23]. La valeur pronostique du miR-124-3p envers l'évolution neurologique à 6 mois post-AC a été validée dans une cohorte de 579 patients par notre laboratoire (AUC = 0,77) [262].

Wander et al ont utilisé des puces à miARN dans une population de patients avec AC et FV. Ils ont observé que les niveaux plasmatiques de miR-133b, miR-208b, miR-499-5p, miR-206, miR-122, miR-34a, miR-205, miR-10a, miR-16, miR-183, miR-200a, miR-210, miR-29c, miR-451, miR-663b étaient plus élevés chez 45 patients ayant subi un AC comparé à 15 personnes saines. A l'inverse, les miR-221, miR-330-3p et miR-9-5p étaient moins exprimés dans le plasma provenant de patients ayant subi un AC que dans celui issu des personnes saines. Les patients décédés à l'hôpital avaient des niveaux de miR-9-3p et miR-135 plus élevés que les patients vivants au moment de leur sortie de l'hôpital [263]. Cette étude n'a toutefois pas évalué le potentiel pronostique de ces miARN.

Des miARN présentent ainsi des potentiels intéressants de biomarqueurs pronostiques post-AC, sans toutefois surpasser la NSE. D'autres études devraient approfondir la valeur pronostique de ces miARN dans des cohortes à grande échelle et conduire également à l'identification de nouveaux miARN avec des capacités de biomarqueurs. De telles études seront présentées dans ce travail, les études 4 et 5.

- lncARN

A notre connaissance, l'expression de lncARN dans le sang ou dans des tissus cérébraux n'a pas encore été observée ou rapportée chez l'homme avec un AC.

Toutefois, une étude a exploré le profil d'expression des lncARN dans le cerveau de rats ayant subi un AC induit par un courant électrique trans-thoracique. Grâce à l'utilisation de puces à ARN, 37 lncARN étaient sur-régulés et 21 lncARN étaient sous-régulés dans le cerveau des rats ayant subi un AC comparé aux contrôles [264].

MATERIELS & METHODES

1. Cohortes de patients

Les différentes cohortes de patients présentées ci-dessous ont été approuvées par leur comité d'éthique local et sont conformes à la déclaration d'Helsinki [265].

Tous les patients ont signé un formulaire de consentement, à l'exception des donneurs d'organes inclus dans la cohorte tissu AAT Paris, pour lesquels l'accord fut donné par l'Agence de Biomédecine française.

1.1. Cohorte LUCKY

La cohorte LUCKY (*Luxembourg Acute Myocardial Infarction Registry*) est un registre de 960 patients créé à l'Institut National de Chirurgie Cardiaque et de Cardiologie et par le département de Cardiologie du Centre Hospitalier de Luxembourg, ouvert en 2006 jusque fin 2012.

Les données de suivi et les échantillons sanguins étaient disponibles pour 449 patients : ils constituent la sous-cohorte PAMI et ont été utilisés dans l'étude 2. Tous les patients ont été diagnostiqués avec un IM aigu et ont été traités avec une ICP. Le diagnostic d'IM était basé sur : la présence d'une douleur à la poitrine pendant moins de 12 heures, une modification significative des segments ST à l'ECG et une élévation des niveaux des enzymes cardiaques.

Parmi eux, 352 patients ont été diagnostiqués avec un STEMI, et 97 patients avec un NSTEMI.

Le diagnostic STEMI reposait sur la présence de : 1) une élévation significative du segment ST (> 1 mm) ; 2) l'occlusion d'une artère coronaire majeure (aucun débit dans l'artère antérieure gauche descendante, circonflexe ou droite) ; 3) un pic d'activité de CPK > 600U/L (3 fois supérieure à la limite supérieure de l'intervalle de référence).

Le diagnostic NSTEMI était caractérisé par 1) pas d'élévation significative du segment ST mais une dépression ST significative (> 1mm) ; 2) une lésion significative dans une artère coronaire majeure nécessitant une ICP ; et 3) une concentration de c-TnT après 24h > 0.03µg/L. La majeure partie des

patients avec NSTEMI avaient une lésion sévère ou sub-occlusive dans l'artère antérieure gauche, l'artère circonflexe ou l'artère coronaire droite.

Après la reperfusion, un échantillon de sang total artériel a été prélevé via un tube ARN PAXgene™ (BD Biosciences, Erembodegem, Belgique). L'expression des ARNm codants pour les gènes *TGFBR1, TNXB, LTPB4, LMNB1* et *MMP9* a été mesurée dans ces échantillons de sang totaux. La fonction cardiaque à moyen terme a été évaluée grâce à la mesure de la FE ventriculaire gauche à environ 4 mois post IM par échocardiographie. 79 patients présentaient une fonction cardiaque réduite (FE <40%) et 370 patients avaient une FE préservée (>40%).

Les caractéristiques démographiques et cliniques sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1. Caractéristiques de la sous-cohorte PAMI

	FE ≤ 40% **(n = 79)**	**FE > 40%** **(n = 370)**	**Valeur de p (FE ≤ 40% vs. FE > 40%)**
Age, médiane (intervalle)	65 (37-89)	60 (30-91)	**0,011**
Sexe, masculin, n (%)	59 (74)	280 (80)	0,28
IMC, médiane (intervalle)	28 (19-51)	27 (18-47)	0,55
GB, médiane (range), x10^9/L	12 (4,8-29)	10,4 (1,11-29)	**<0,001**
Biomarqueurs, médiane (intervalle)			
CPK, U/L	3163 (34-12096)	1344 (76-13028)	**<0,001**
cTnT, µg/L	6,99 (0,03-26,93)	3,44 (0,01-25,66)	**<0,001**
Nt-proBNP, pg/mL	676 (5-13977)	169 (10,55-35000)	**<0,001**
Temps ischémique, 1 = 24h, médiane (intervalle)	0,15 (0,04-0,62)	0,15 (0,03-0,94)	0,58
Type IM, 1 = antérieur, n (%)	66 (83)	282 (76)	0,68
FE à 4 mois, médiane (intervalle)	39 (15-40)	50 (42-89)	**<0,001**
Antécédants médicaux, n (%)			
Antécédents d'IM	11 (14)	40 (11)	0,56
Diabète	26 (33)	72 (20)	**0,025**
Hypertension	41 (52)	176 (50)	0,80
Hypercholestérolémie	33 (41)	166 (47)	0,38
Tabagisme	33 (41)	172 (49)	0,26
Traitement pré-admission, n (%)			
Statines	18 (22)	71 (20)	0,64
Aspirine	13 (16)	72 (20)	0,53
β-bloquants	17 (21)	77 (22)	1
Inhibiteurs de l'angiotensine	10 (12)	41 (11)	0,84
Inhibiteurs d'ECA	14 (17)	42 (12)	0,19
Clopidogrel	4 (5)	20 (5)	1
Nitrates	3 (4)	15 (4)	1
Antagonistes du calcium	2 (2)	13 (3)	1
Diurétiques	3 (4)	10 (3)	0,7
Traitement post-admission, n (%)			
Statines	61 (77)	330 (89)	**0,008**
Aspirine	64 (81)	357 (96)	**<0,001**
β-bloquants	66 (83)	330 (89)	0,178
Inhibiteurs de l'angiotensine	6 (7)	26 (7)	0,811
Inhibiteurs d'ECA	47 (59)	234 (63)	0,525
Clopidogrel	59 (74)	340 (91)	**<0,001**
Nitrates	3 (4)	28 (7)	0,32
Antagonistes du calcium	1 (1)	15 (4)	0,326
Diurétiques	27 (34)	60 (16)	**<0,001**
Classification NYHA, n (%)			
Classe I	46 (58)	275 (74)	**0,005**
Classe II	19 (24)	67 (18)	0,269
Classe III	3 (4)	2 (0,5)	**0,04**
Classe IV	0	0	-

CPK : créatines phosphokinase, c-TnT : troponines cardiaques, ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine, FE : fraction d'éjection, GB : globules blancs, IM : infarctus du myocarde, IMC : indice de masse corporelle, NYHA : New York heart association.

1.2. Les cohortes anévrisme aortique

1.2.1. La cohorte tissu AAT-Paris

La Bio-banque de tissus cardiovasculaires de l'unité LVTS 1148 est un registre de personnes saines (donneuses d'organes) et de patients ayant un AAT, enregistré sous le numéro d'identification BRIF-BB-0033-00029 [24]. Ce registre est toujours en cours, depuis son ouverture en 2006.

Dans ce registre, des échantillons de tissus aortiques sont récupérés. Au cours de la récupération des tissus, l'absence d'AAT a été vérifiée visuellement chez les donneurs d'organes alors que la présence d'AAT (au niveau de l'aorte ascendante) a été confirmée visuellement chez les patients. Les tissus aortiques ont été récupérés en dessous de la courbe extérieure, à l'endroit le plus dilaté de l'aorte. La media aortique a été rapidement récupérée puis congelée à -80°C.

Les contrôles sains étant des donneurs d'organes, l'accès à leurs données cliniques était limité.

Parmi ce registre, 20 personnes saines et 20 patients avec TAA ont été sélectionnés par hasard mais appariés en fonction du genre et de l'âge. Dans l'étude 3, les échantillons de 19 personnes saines et 19 patients ont été utilisés à cause d'un problème technique sur un couple d'échantillon appariés. Les données démographiques et cliniques des patients sont reportées dans le tableau 2.

Tableau 2. Caractéristiques de la cohorte tissu AAT-Paris.

	Contrôles (n=19)	**AAT (n=19)**	**Valeur de p (Contrôles vs. AAT)**
Age, médiane (intervalle)	56 (36-76)	57 (35-77)	0,96
Genre, masculin, n (%)	13 (74)	13 (74)	0,727
Diamètre aortique en mm, médiane (intervalle)	N/A	52 (33-64)	
Dissection aortique, n (%)	N/A	2 (10,5)	
Etiologie de l'anévrisme aortique, n (%)			
Syndrome de Marfan	N/A	2 (10,5)	
Dégénérative	N/A	2 (10,5)	
Valve aortique bicuspide	N/A	9 (47,4)	
Syndrome d'Ehler-Danlos (type IV)	N/A	0 (0)	
Inconnue	N/A	4 (21,1)	
Tabagisme			
Jamais	N/A	1 (5,3)	
Arrêté	N/A	3 (15,8)	
En cours	N/A	5 (26,3)	
Non renseigné	N/A	10 (52,6)	
Traitement			
Aspirine	N/A	1 (5,3)	
Bloqueurs des récepteurs à l'angiotensine II	N/A	3 (15,8)	
Statines	N/A	3 (15,8)	
Bétabloquants	N/A	4 (21,1)	
Inhibiteurs de l'enzyme de conversion	N/A	2 (10,5)	
Non renseigné	N/A	11 (58)	

AAT : anévrisme de l'aorte thoracique; N/A: non renseigné.

1.2.2. Cohorte sérum AAT-Liège

Cette cohorte contient 32 patients porteurs d'un AAT recrutées à l'hôpital de Liège entre Septembre 2009 et Novembre 2015, et 20 personnes saines, recrutées en 2016. Le diagnostic d'AAT a été validé par la mesure du diamètre aortique par imagerie médicale tomographie à émission de position. L'absence d'AAT chez les patients sains a été vérifiée par imagerie médicale (échographie ou scanner).

Sur les 32 patients porteurs d'un AAT, 2 patients ont été exclus car ils présentaient un anévrisme de l'aorte descendante, et 2 autres patients ont été exclus à cause de données cliniques manquantes. Ainsi, 28 patients porteurs d'un anévrisme de l'aorte ascendante ont été utilisés dans l'étude 3.

Les données cliniques et démographiques des contrôles sains et des patients sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3. Caractéristiques de la cohorte sérum AAT-Liège

	Contrôle (n=20)	**AAT (n=28)**	**Valeur de p (Contrôle vs, AAT)**
Age, médiane (intervalle)	75 (67-85)	61 (32-84)	**<0,001**
Genre, masculin, n (%)	16 (80)	21 (75)	0,741
Diamètre aortique en mm, médiane (intervalle)	N/A	48 (35-74)	
Dissection aortique, n (%)	N/A	3 (10,7)	
Etiologie de l'anévrisme aortique, n (%)			
Syndrome de Marfan	N/A	0 (0)	
Dégénérative	N/A	0 (0)	
Valve aortique bicuspide	N/A	6 (21,4)	
Syndrome d'Ehler-Danlos (type IV)	N/A	1 (3,6)	
Inconnue	N/A	18 (64,3)	
Hyperlipidémie, n (%)	4 (20)	15 (53,6)	**0,041**
Tabagisme			**0,036**
Jamais	14 (70)	11 (39,3)	
Arrêté	6 (30)	8 (28,6)	
En cours	0 (0)	8 (28,6)	
Non renseigné	0 (0)	1 (3,5)	
Traitement			
Aspirine	9 (45)	13 (46,4)	0,845
Clopidrogrel	1 (5)	1 (3,6)	0,625
Statines	9 (45)	15 (53,6)	0,770
Beta-bloquants	9 (45)	13 (46,4)	0,226
Inhibiteurs de l'enzyme de conversion	4 (20)	2 (7,1)	0,218
Aucun	4 (20)	5 (17,9)	0,851

AAT : anévrisme de l'aorte thoracique; N/A: non renseigné.

1.3. Cohorte TTM & sous-cohortes sérum et plasma

La cohorte TTM est un registre multi-centrique impliquant 36 centres de recrutement entre Novembre 2010 et Juillet 2013. Elle comprend 939 adultes inconscients admis en unité de soins intensifs après avoir subi un AC hors hôpital. Le registre est accessible ci-contre : https://www.clinicaltrials.gov/ (NCT01020916). Le design, le protocole, ainsi que des résultats et interprétations obtenus avec cette cohorte ont été publiés précédemment [120,266,267].

Des échantillons de plasma et/ou de sérum ont été prélevés par 29 sites sur les 36 impliqués dans le registre. Les échantillons sont stockés à la Biobanque intégrée de Luxembourg, en accord avec les Bonnes pratiques des registres biologiques et environnementaux et avec l'Organisation internationale des standards (ISO 9001:2008, 17025:2005 and NF S96-900:2011).

Sur les 939 patients de l'étude TTM, les échantillons de sérum et les informations cliniques étaient disponibles pour 590 patients, utilisés pour la mesure du miR-122-5p. Parallèlement, les échantillons de plasma et informations cliniques étaient disponibles pour 590 patients, utilisés pour la mesure du miR-574-5p.

L'évolution neurologique des patients a été évaluée 6 mois post-AC grâce à l'échelle CPC. Un score CPC 1 ou 2 correspondait à une bonne évolution neurologique post-AC, alors qu'un score CPC 3, 4 ou 5 correspondait à une mauvaise évolution, un mauvais pronostique neurologique post-AC (**Figure 18**).

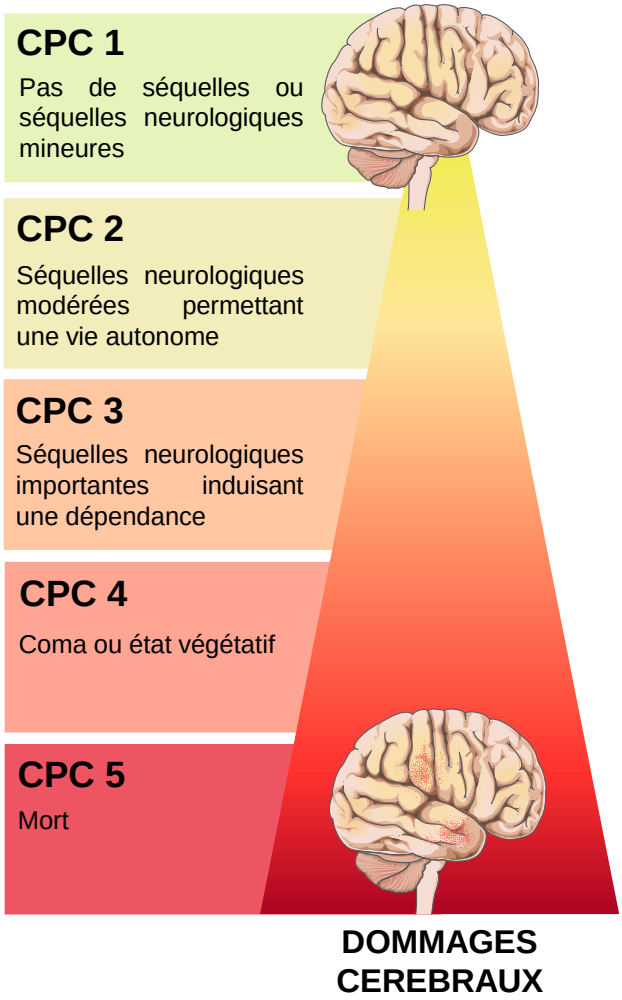


Figure 18: La classification CPC

Image modifiée à partir de la banque d'image Servier Medical Art ®

La survie était reportée à la fin de l'étude.

Les caractéristiques démographiques et cliniques de la cohorte TTM et des sous-cohortes sérum et plasma sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4. Caractéristiques de la cohorte TTM et des sous-cohortes sérum et plasma

Caractéristiques	**Cohorte TTM** (n= 939)	**Cohorte sérum miR-122-5p** (n= 590)	**Cohorte plasma miR-574-5p** (n= 590)	**Valeur de p**
Age, années	65 (20-94)	64 (20-94)	65 (20-94)	0,625
Genre, masculin	761 (81%)	473 (80%)	481 (81,5%)	0,833
Evolution neurologique				
Bonne évolution (CPC 1-2)	446 (47,5%)	307 (52,1%)	299 (50,8%)	0,189
Comorbidités				
Hypertension	374 (40%)	233 (39%)	240 (41%)	0,911
Diabète	141 (15%)	83 (14%)	86 (15%)	0,877
CI connue	260 (28%)	154 (26%)	163 (28%)	0,769
Antécédents d'IM	193 (21%)	109 (18%)	118 (20%)	0,606
Insuffisance cardiaque	61 (6%)	33 (6%)	36 (6%)	0,773
BPCO	97 (10%)	48 (8%)	55 (9%)	0,358
Insuffisance rénale	6 (1%)	5 (1%)	5 (1%)	0,859
Antécédents d'AVC	73 (8%)	47 (8%)	50 (8%)	0,885
Alcoolisme	37 (4%)	17 (3%)	11 (2%)	0,069
Premier rythme enregistré				0,914
FV or TV sans perfusion	729 (78%)	475 (80%)	467 (79%)	
Asystolie or AEB	178 (19%)	97 (16%)	104 (18%)	
RASC après défibrillation par témoin	13 (1%)	8 (2%)	7 (1%)	
Non renseigné	19 (2%)	10 (2%)	12 (2%)	
Arrêt en présence de témoin	838 (89%)	525 (89%)	529 (90%)	0,930
RCP par témoin	683 (73%)	431 (73%)	433 (73%)	0,961
Temps entre AC et RASC, min	25 (0-170)	25 (0-170)	25 (0-170)	0,440
Lactate sérique initial (mmol/L)	6,0 (0,5-25)	5,7 (0,5-25)	6,1 (0,5-25)	0,491
Etat de choc à l'admission	137 (15%)	72 (12%)	76 (13%)	0,368

Pour les caractéristiques continues la médiane, (l'intervalle) sont indiqués. Pour les caractéristiques qualitatives, le nombre, (la fréquence) sont indiqués. AC: arrêt cardiaque ; AEB : activité électrique sans battement ; BPCO: broncho-pneumopathie chronique obstructive ; AVC : accident vasculaire cérébral ; CI : cardiopathie ischémique ; CPC: catégorie de performance cérébrale ; FV: fibrillation ventriculaire ; IM : infarctus du myocarde ; RASC : retour à la circulation spontanée ; RCP : réanimation cardiopulmonaire ; TV : tachycardie ventriculaire. Informations manquantes, pour la cohorte TTM: statut CPC pour 6 patients, hypertension pour 4 patients, diabète pour 7 patients, statut CI pour 3 patients, antécédents d'IM pour 2 patients, insuffisance cardiaque pour 3 patients, BPCO pour 1 patient, insuffisance rénale pour 1 patient, antécédents d'AVC pour 4 patients, alcoolisme pour 2 patients, AC en présence de témoin pour 1 patient, RCP par témoin pour 2 patients, temps entre AC et RASC pour 1 patient, lactate sérique initial pour 62 patients et choc à l'admission pour 1 patient.

2. Protocoles expérimentaux

2.1. Traitement des souris

Les expériences menées sur les souris ont été effectuées au Centre de Recherche Cardiovasculaire du *Massachussetts General Hospital*, à Boston, Etats-Unis. Toutes les souris ont été prises en charge en conformité avec le comité de protection des animaux de l'Institut et en accord avec la régulation du Service de santé publique des Etats-Unis et le département de l'Agriculture des Etats-Unis. Les souris $Fbn1^{C1039G/+}$ proviennent des laboratoires Jackson (souche B6.129-Fbn1tm1Hcd/J, #01885), et présentent une mutation sur le gène codant pour la FBN1, afin de mimer le phénotype du syndrome de Marfan [268].

2.1.1. Mesure du diamètre aortique

Des ultrasons ont été utilisés pour observer la morphologie de l'aorte chez les souris sauvages (Wt ou *wild type*) et $Fbn1^{C1039G/+}$. Le jour de la mesure, les poils des souris ont été retirés grâce à l'utilisation d'une crème dépilatoire Nair. Les mesures d'ultrasons ont été effectuées sur des souris éveillées, non sédatées à l'aide du système d'imagerie Visualsonics Vevo660 (Fujifilm, Toronto, Canada) et d'une sonde à haute fréquence 30MHz. L'aorte a été observée via une vue de long axe standard para-sternal.

Pour chaque animal, les diamètres obtenus pour les différentes parties de l'aorte correspondent à la moyenne des mesures effectuées sur des images fixes (obtenues lors de la systole) par un cardiologue ne connaissant pas le génotype des souris. Les diamètres de l'anneau de la valve aortique (diamètre interne maximal), des sinus aortiques, de la jonction sino-tubulaire ou de l'aorte ascendante) ont été mesurés. D'après les mesures obtenues pour les contrôles, le diamètre moyen des souris Wt âgées de 6 mois est de 1,75 ± 0,2mm alors que celui des souris $Fbn1^{C1039G/+}$ est de 2,2 ± 0,3 mm.

Une étude statistique a été réalisée pour estimer le nombre d'animaux nécessaires : pour détecter une augmentation de la moyenne du diamètre aortique de 0,34mm (soit 57% par rapport à une moyenne de 2,2mm améliorée), environ 10 animaux par groupe étaient nécessaires pour obtenir une puissance (1-β) de 0,8 et un taux d'erreur de Type I (α) de 5%.

2.1.2. Récupération des tissus, plasma et VEs

Avant la récupération des tissus, les souris ont été euthanasiées par inhalation d'isoflurane (Sigma, Saint-Louis, Etats-Unis). Toutes les expériences impliquant la récupération de tissus ont été effectuées sur des souris âgées de 6 mois.

Pour récupérer les organes et les tissus, du latex a été injecté avec une faible pression dans l'apex du ventricule gauche des souris, jusqu'à apparaître dans l'artère fémorale. Les souris ont ensuite été fixées dans 10% de formol pendant 24h, puis ont été transférées dans de l'éthanol à 70% pour être disséquées et stockées. L'aorte, le cœur, les poumons, les reins et le foie ont alors été récupérés à partir de l'animal ou disséqués *in situ* pour être photographiés avant d'être inclus dans de la paraffine et découpés en sections de 10µM. Les section obtenues ont été placées sur lame et marquées avec des marquages standards ou de l'hybridation *in situ* fluorescente.

Pour récupérer le plasma, le sang périphérique a été prélevé sur des souris Wt et $Fbn1^{C1039G/+}$, puis centrifugé à 1500g pendant 15 minutes pour séparer le plasma. Le plasma a ensuite été congelé à -80°C jusqu'à l'extraction d'ARN.

Pour isoler les VE, la méthode d'ultracentrifugation en gradient de densité amortie décrite par Li et al [269] a été utilisée, à partir du plasma. Le plasma de plusieurs souris Wt et de plusieurs souris $Fbn1^{C1039G/+}$ a été regroupé, par groupe Wt ou $Fbn1^{C1039G/+}$, respectivement. Environ 1mL de plasma de chaque groupe a été dilué avec du tampon phosphate salin (ou *phosphate buffered saline* PBS) jusqu'à obtenir un volume de 8mL, qui a été ajouté à 2mL de solution de 60% d'iodixanol (Millipore Sigma, Bedford, Etats-Unis). Le mélange a été centrifugé à 110 000xg (facteur k de 124) pendant 2h à 4°C dans une centrifugeuse SWA1Ti à rotor libre (Beckman Coulter, Danvers, Etats-Unis). Après cette étape, les premiers 7mL ont été aspirés précautionneusement et éliminés alors que les 3mL restants (qui contiennent les VE) ont été transférés dans un nouveau tube.

Pour la seconde étape d'ultracentrifugation en gradient de densité, les 3mL précédemment récupérés ont été mélangés vigoureusement, et ont été recouverts de trois couches de 3mL de solutions respectivement concentrées à 20%, 10% et 5% d'iodixanol. Le mélange a été centrifugé à 110 00xg pendant 18h à 4°C. Ensuite, 12 fractions de 1mL ont été récupérées pour chaque échantillon, depuis la surface jusqu'à la base du tube. Les fractions 6 à 10 contenaient des protéines spécifiques des VE (TGS101 et Alix, détectées par Western Blot). Elles étaient donc enrichies en VE et ont ainsi été

regroupées ensemble. Dans ces fractions, l'iodixanol a été enlevé grâce à une étape de dialyse effectuée avec du PBS filtré (0,22µm) et grâce à un appareil de dialyse (100kD Float-A-Lyzer G2 Dialysis, Spectrum Lab, Rancho Dominguez, Etats-Unis). Pour cela, l'échantillon a été chargé dans le tube de dialyse, qui a ensuite été placé dans du PBS filtré à 0,22µm. La dialyse a été effectuée et l'échantillon purifié a été récupéré depuis le tube de dialyse.

2.2. Culture et traitement des CML

2.2.1. Isolation et culture

Les CML aortiques de souris ont été isolées à partir d'explants de la section ascendante d'aortes provenant de souris Wt et $Fbn1^{C1039G/+}$.

L'identité des CML a été vérifiée par le marquage par immunofluorescence de plusieurs marqueurs contractiles : la transgéline (Abcam ab14106), la calponine-1 (Abcam, ab46794), la smootheline (Santa-Cruz sc-73042) et la vinculine (Abcam ab18058). Les expériences ont été effectuées entre les passages 1 et 5 pour éviter la dédifférenciation des cellules. Les cellules étaient cultivées avec du milieu de croissance pour CML de chez Cell Application Inc, San Diego, Etats-Unis.

2.2.2. Traitement

Les CML issues de l'aorte ascendante de souris Wt ont été incubées avec 3 à 4 millions de VE, provenant du plasma de souris Wt ou $Fbn1^{C1039G/+}$.

Brièvement, les VE provenant des souris ont été re-suspendues dans du milieu de culture Opti-MEM (ne contenant pas de VE au préalable), puis incubées sur les cellules pendant 48h. Les CML ont ensuite été incubées avec du milieu de croissance sans VE pendant 24h supplémentaires.

3. Analyses biochimiques

3.1. Comptage des VE

Le système NanoSight LM10 (Malvern Panalyticla, Malvern, Royaume-Uni) a été utilisé pour mesurer la concentration et la taille des VE isolées. Les échantillons contenant les VE ont été dilués 20 fois avec du PBS filtré à 0,22µm afin d'obtenir la gamme optimale de concentration de particules pour l'appareil. A la fin de chaque mesure, la pompe a été nettoyée plusieurs fois avec du PBS pour

éviter toute contamination entre les échantillons. Les paramètres de la caméra ont été ajustés selon les instructions du fournisseur et pour chaque échantillon, 3 mesures répétitives de 20 secondes ont été effectuées. Le programme NanoSight NTA 2,3 a été utilisé pour analyser les données.

3.2. Hybridation in situ en fluorescence et marquages immunochimiques

Au cours de l'étude 3, la composition en élastine de la paroi aortique des souris Wt et Fbn1$^{C1039G/+}$ a été étudiée par un marquage de Verhoeff-Van Gieson (Thermo Fisher Scientific, Merelbeke, Belgique), afin de vérifier le phénotype des souris Fbn1$^{C1039G/+}$ et de le comparer à celui des souris Wt. Brièvement, les coupes de tissu aortique ont été déparaffinées et hydratées, puis colorées avec une solution contenant de l'hématoxyline alcoolique, du chlorure ferrique et une solution iodée de Weigert. Les coupes ont ensuite été rincées, placées dans une solution de thiosulfate de sodium pendant 1 minute et rincées de nouveau. Les coupes ont ensuite été colorées dans une solution de Van Gieson pendant 1 minute, puis déshydratées successivement avec de l'alcool à 70%, 80% puis 90% (changé 2 fois, appliqué 1 minute à chaque fois). Finalement, les coupes ont été éclaircies grâce à un agent clarifiant (changé 3 fois, appliqué 1 minute à chaque fois) puis montées sur lame.

La localisation du miR-574-5p a été étudiée par FISH dans les tissus aortiques, cardiaques, rénaux, pulmonaires, hépatiques des souris Wt et Fbn1$^{C1039G/+}$, ainsi que dans les CML issues de souris Wt . Pour cela, l'amorce *miRCURY-FISH* qui reconnait la version murine du miR-574-5p, a été marquée par les fluorophores 5'-FAM et 3'-FAM (Qiagen, Venlo, Pays-Bas). Cette amorce a ensuite été hybridée sur les sections de tissus ou de CML pendant 4 heures à 65°C. Les tissus ont été incubés avec un anticorps anti F-actine conjugué avec un fluorophore ActinGreen 488 (Thermo Fisher Scientific), du 4',6-diamidino-2-phénylindole pour marquer les noyaux. Les CML ont été incubées avec les mêmes anticorps que les tissus et avec un anticorps anti-CD63 (BD biosciences, Fraklin Lakes, Etats-Unis) pour marquer les VE.

Pour tous les marquages, les images ont été prises en deux dimensions et lumière blanche avec le microscope confocal *Leica TCS SP8* et le programme *Leica Application Suite X* (Leica, Wetzlar, Allemagne). Les images ont ensuite été analysées et quantifiées à l'aide du programme Image J (*National Institute of Health*, Etats-Unis).

3.3. Mesure de l'héparine

Les concentrations d'héparine dans le sérum ont été mesurées à l'aide du kit *Coatest Heparin* (Chromogenix, Werfen, Royaume-Uni). Ce test colorimétrique repose sur un principe de compétition : l'échantillon est d'abord mis en contact avec un excès d'antithrombine qui va permettre la formation d'un complexe héparine-antithrombine.

Ensuite, l'échantillon est mis en contact avec un excès de facteur Xa, qui va réagir avec le complexe héparine-antithrombine pour former un complexe héparine-antithrombine-facteur Xa. Le surplus éventuel de facteur Xa sera alors libre et va pouvoir transformer le substrat S-2222 en para-nitro-aniline, qui a une couleur jaune et absorbe à 405nm.

Après reconstitution des solutions, une gamme étalon comprenant différentes concentrations d'héparine (B Braun, Melsungen, Allemagne) a été préparée : entre 0,05 et 0,5 IU/mL, diluée dans du plasma normal (fourni dans le kit).

Pour chaque échantillon, 50µl de plasma ou sérum ont été utilisés. Ils ont été dilués avec 50µL d'antithrombine et 400µL de solution tampon.

Pour les étapes suivantes, 200µL d'échantillon dilué ont été utilisés et incubés à 37°C pendant 3 à 4 minutes. Puis 100µL de facteur Xa ont été ajoutés par échantillon. Chaque échantillon a ensuite été mélangé et incubé à 37°C pendant 30 secondes. 200µL de substrat S-2222 ont ensuite été ajoutés par échantillon, puis chaque échantillon a été mélangé et incubé à 37°C pendant exactement 3 minutes.

La réaction colorimétrique a été stoppée par l'ajout de 300µL d'acide acétique à 20% (Merk Millipore, Gand, Belgique) puis 100µL de chaque échantillon a été rapidement placé dans une plaque transparente de 96 puits à fond plat pour permettre la mesure de l'absorbance à 405nm par grâce au lecteur d'absorbance POLARstar OPTIMA (BMG Labtech, Paris, France).

La conversion des résultats d'absorbance obtenus en concentration d'IU/mL d'héparine a été effectuée grâce à la mesure de la gamme étalon.

4. Analyses moléculaires

4.1. Extraction d'ARN total

Différents kit d'extractions ont été utilisés au cours de ce travail, en fonction de la nature des échantillons utilisés. Toutefois, tous les kits utilisés reposent sur le même principe : une première étape permet la lyse des membranes des cellules ou des vésicules, puis une séparation organique permet de séparer puis récupérer la fraction contenant les ARN. Ensuite, l'ARN est précipité sur une membrane incluse dans une colonne (variable en fonction du kit) grâce à l'ajout d'éthanol à 100%. Des successions de lavages avec des solutions contenant des concentrations d'éthanol décroissantes visent à éluer tous les composants du lysat retenus par la membrane sauf l'ARN. Finalement, après les différents lavages, l'ARN total est élué dans de l'eau sans RNase ni DNase (ou une solution tampon en fonction du kit) et est dénaturé à 65°C pendant 5 minutes, puis placé sur glace.

4.1.1. A partir de sérum ou de plasma

L'extraction d'ARN total à partir de sérum ou de plasma (humain ou murin) a été réalisée avec le kit *miRNeasy Serum/Plasma* (Qiagen). Les consignes du fournisseur ont été suivies.

L'échantillon de plasma ou sérum a été décongelé doucement sur glace, puis l'extraction a été effectuée à partir de 200µL de sérum ou de plasma maximum. Un volume équivalent au volume de sérum/plasma de *QIAzol* a été ajouté, le lysat a été mélangé puis laissé à température ambiante pendant 5 minutes. Ensuite, 1.6 x 10^8 copies du miARN synthétique cel-miR-39 ont été ajoutées à chaque échantillon, pour pouvoir servir de normalisateur et de contrôle de la qualité de l'extraction. Un volume équivalent au volume de départ de chloroforme a été ajouté au lysat qui a été laissé à température ambiante pendant 2 à 3 minutes, puis une phase de centrifugation a eu lieu de 20 minutes à 12 000g à 4°C. Cela a permis la séparation du lysat en plusieurs phases : la phase aqueuse contenait l'ARN et a été récupérée puis placée dans un nouveau tube.

A partir de cette étape, toutes les centrifugations ont été effectuées à température ambiante et l'extraction a pu être continuée manuellement ou achevée de manière automatisée par le QIAcube (Qiagen). Ces deux techniques incluent la précipitation de l'ARN total par de l'éthanol à 100% sur une colonne contenant une membrane en silice. Ensuite, une suite de lavages avec des solutions contenant des concentrations décroissantes d'éthanol a été effectuée sur la colonne. Finalement, la

colonne a été séchée par centrifugation (5 minutes, 10 000g) puis l'ARN total a été élué par 18µL d'eau sans RNAse ni DNAse sur la colonne et une étape de centrifugation d'une minute à 10 000g. L'extraction automatisée par QIAcube a été utilisée pour l'extraction ARN des cohortes AAT Liège (dans l'étude 3) et sous-cohortes TTM sérum et plasma (dans les études 4 et 5).

Au cours des différentes études, plusieurs paramètres ont légèrement varié dans ce protocole : au cours de l'étude 1, l'extraction ARN a été effectuée à partir de 200µL de sérum ou de plasma. Au cours de l'étude 3, l'extraction ARN de la cohorte sérum AAT Liège a été faite à partir de 90µL de sérum et 100µL de PBS ; alors que l'extraction ARN des plasmas murins a été effectuée à partir de 50µL de plasma. Enfin, au cours des études 4 et 5, l'extraction ARN a été effectuée à partir de 200µL de sérum (étude 4) ou de plasma (étude 5).

4.1.2. A partir de sang total : tubes PAXgene™

L'extraction ARN à partir de sang total récupéré en tubes PAXgene® a été effectuée avec le kit *PAXgene Blood RNA* (Qiagen).

Pour cela, les tubes PAXgene™ ont été décongelés à température ambiante pendant 2h avant le début de l'extraction, afin de finaliser la lyse des cellules. Les échantillons ont ensuite été mélangés doucement, puis centrifugés pendant 13 minutes à température ambiante à 5 000g.

Pour chaque échantillon, le surnageant a été éliminé. Le culot, contenant l'ARN et toujours présent dans le tube, a été lavé avec 4mL d'eau sans RNase, puis chaque tube a été vortexé vigoureusement pour détacher le culot. Chaque tube a ensuite été centrifugé pendant 10 minutes, à température ambiante à 5 000g. Le surnageant obtenu a été éliminé puis 350µL de *tampon BR1* ont été ajoutés, afin de re-suspendre et de récupérer le culot, qui a ensuite été placé dans un nouveau tube. 300µL de *tampon BR2* puis 40µl de *Protéinase K* ont été ajoutés par échantillon. Chaque échantillon a ensuite été mélangé et incubé pendant 10 minutes, à 1 400 rpm, à 55°C.

Le lysat a été transféré sur une colonne *PAXgene Shreeder* puis centrifugé pendant 3 minutes à 12 000g à 25°C. L'éluant obtenu après le passage dans la colonne a été récupéré et transféré dans un nouveau tube, puis 350µL d'éthanol à 96-100% ont ensuite été ajouté par échantillon. Chaque échantillon a ensuite été placé sur une colonne *PAXgene RNA* spin puis centrifugé à 12 000g pendant 1 minute à 25°C. Cette étape permet la précipitation de l'ARN sur la colonne. L'éluat de la colonne a été éliminé puis des lavages successifs avec des solutions (*tampons BR3* et *BR4*) ont été effectués.

Au milieu de ces étapes de lavage, une étape a été ajoutée. Il s'agit d'un traitement à la DNase I (Qiagen) qui vise à éliminer l'ADN génomique présent dans les échantillons. Il consiste en l'ajout de DNase I et de tampon RDD (Qiagen) sur la colonne pendant 15 minutes à température ambiante.

Après les différentes étapes de lavage et de traitement DNAse, l'ARN total a été élué dans 80µL (2 fois 40µL) de *tampon BR5*. Une étape de désalage de l'ARN a été menée à l'aide du kit *MinElute* (Qiagen), comme ceci : de l'eau sans RNase et 350µL de *tampon RLT* ont été ajoutés par échantillon. Ensuite, 250µL d'éthanol ont été ajoutés par échantillon pour diluer l'ARN. Chaque échantillon a ensuite été passé sur une colonne *MinElute*, puis centrifugé pendant 15 secondes à 12 000g, 25°C. Deux étapes de lavage de la colonne ont ensuite été effectuées : une avec 500µL de *tampon RPE* et l'autre avec 500µL d'éthanol à 80%. Finalement, la membrane de la colonne a été séchée par une centrifugation de 5 minutes à 12 000g, 25°C et tubes ouverts, puis l'ARN a été élué dans 14µL de *tampon BR5* grâce à une centrifugation d'1 minute à 12 000g.

4.1.3. A partir de de tissu murin ou de VE

L'ARN total a été extrait à l'aide du kit *miRNeasy mini* (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

Brièvement, pour chaque échantillon, le tissu murin ou l'extrait de VE a été lysé avec 700µL de *QIAzol* puis mélangé et laissé 5 minutes à température ambiante.

140µL de chloroforme ont été ajoutés par échantillon, qui ont ensuite été vortexés et laissés 2 à 3 minutes à température ambiante. Ensuite, une étape de centrifugation de 15 minutes à 12 000g à 4°C a permis la séparation des phases. La phase aqueuse contenant les ARN a été récupérée, puis mélangée doucement avec de l'éthanol à 100%. Le mélange a été passé sur une colonne, suivi par plusieurs lavages successifs (avec le *tampon RWT*, puis le *tampon RPE* et de l'éthanol à 80%). Enfin, l'ARN total a été élué avec de l'eau sans RNAse ni DNAse.

4.1.4. A partir de tissu humain

L'ARN total a été extrait depuis les tissus aortiques de la cohorte AAT tissue Paris avec le kit *mirVana isolation* (Life Technologies, Merelbeke, Belgique) selon les recommandations du fournisseur. Toutes les centrifugations ont été effectuées à température ambiante.

Pour chaque échantillon, environ 45mg de tissu aortique congelé a été prélevé sur glace pour limiter la décongélation et rapidement broyé dans 600µL de *Lysis binding buffer* grâce au Polytron, (Kinematica, Lucerne, Suisse). Le broyat obtenu a alors été congelé très rapidement par snap-freezing à -80°C.

Les broyats ont été décongelés doucement sur glace, puis 60µL de *miRNA homogenate additive* ont été ajoutés par échantillon pour stabiliser l'ARN, qui ont ensuite été laissés 10 minutes sur glace. Ensuite, 1mL d'acide phénol-chloroforme ont été ajoutés par échantillon. Après une étape de centrifugation pendant 5 minutes à 10 000g, la phase aqueuse (contenant l'ARN) a été récupérée et placée dans un nouveau tube. 1.25 volumes d'éthanol à 100% ont été ajoutés par échantillon. Chaque échantillon a été mélangé avant d'être passé sur une colonne qui contient une membrane. L'ARN a été ainsi précipité sur cette colonne, qui a ensuite subi des lavages successifs. La colonne a ensuite été centrifugée pendant 1 minute à 10 000g, pour éliminer tout liquide éventuellement restant sur la membrane, puis l'ARN total présent sur la membrane a été élué avec 50µL d'eau sans RNAse ni DNAse chauffée à 95°C.

4.2. Analyse quantitative et qualitative de l'ARN

Les concentrations d'ARN total issu du sang total (étude 2) et des tissus aortiques (étude 3) ont été mesurées à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). La mesure permet d'obtenir l'absorbance à 230, 260 et 280nm qui sont respectivement les absorbances d'éventuels contaminants (sels), des acides nucléiques et des protéines. Différents ratios entre ces absorbances permettent d'évaluer la pureté de l'échantillon.

L'ARN total issu de sérum ou de plasma est généralement trop peu concentré (moins de 25ng/µL) pour être mesuré avec fiabilité par le Nanodrop 1000 et n'a donc pas été mesuré au cours de ce travail.

4.3. Ajout d'héparine et traitement de l'ARN avec héparinase

Au cours de l'étude 1, différentes concentrations d'héparine stérile (B Braun) ont été ajoutées dans les échantillons de sérum ou de plasma issu de volontaires sains pour obtenir une gamme de sérum

ou de plasma contenant 0.02U/mL à 20U/mL d'héparine. Chaque échantillon de la gamme a été préparé en duplicat : un de ces duplicats sera traité avec de l'héparinase, l'autre non.

L'ARN a été extrait à partir de cette gamme comme décrit ci-dessus. Ensuite, un traitement à l'héparinase I a été appliqué sur un seul des duplicats de la gamme. Ce traitement consiste à mélanger 13µL d'ARN total avec de l'inhibiteur de RNAse (à 40U/µL, Invitrogen Merelbeke, Belgique), du tampon *HiFlex* du kit miScript (Qiagen), du $MgCl_2$ à 25mM (Sigma), de l'eau sans RNAse ni DNAse et enfin 0,898U d'héparinase I de *Flavobacterium heparinum* (Sigma) pour obtenir un volume final de 30 µL.

Les échantillons non traités par héparinase ont été préparés exactement de la même manière que les échantillons traités avec de l'héparinase, à la différence que l'héparinase I a été remplacée par de l'eau sans RNAse ni DNAse.

Tous les échantillons ont ensuite été incubés à 25°C pendant 1h pour permettre à l'héparinase I d'agir, puis gardés sur glace jusqu'à la transcription inverse.

4.4. Puces à miRNA

L'ARN total issu des 40 tissus aortiques de la cohorte tissu AAT Paris a été utilisé sur 8 puces à miARN *Agilent G3 Human* (Agilent, Diegem, Belgique), chacune contenant 5893 amorces reconnaissant 2549 miARN (d'après la version 21 de miRBase) au cours de l'étude 3.

L'hybridation de l'ARN sur les puces a été effectuée à l'aide du kit *Microarray system with complete labeling and hyb* d'Agilent.

Pour chaque échantillon, 100ng d'ARN a été successivement dé-phosphorylé, dénaturé et ligué avec un fluorophore cynanine 3. Ensuite, l'ARN a été séché grâce à un Speedvac (Eppendorf, Rotselaar, Belgique) puis hybridé sur les puces à miARN pendant toute la nuit à 55°C. Les puces ont ensuite été lavées plusieurs fois, séchées puis scannées avec le scanner à haute résolution G2565C d'Agilent (**Figure 19**).

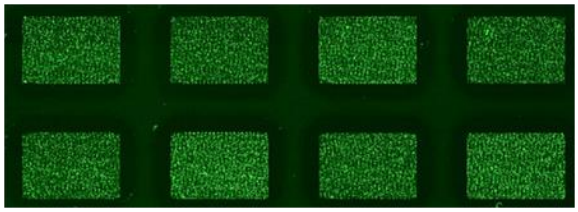


Figure 19: Scan d'une puce à miARN contenant huit échantillons

Les valeurs quantifiables des puces ont été extraites grâce au logiciel d'Agilent. Sur les 40 échantillons, 2 échantillons appariés ont été exclus pour cause de mauvaise qualité. Les données d'expression des miARN ont été calculées et normalisées grâce à la méthode « *Robust microarray average* » intégrée dans le package R AgiMicroRNA.

Les données obtenues ont été déposées dans le répertoire GEO sous le numéro d'accès GSE110527. L'expression différentielle des miARN a été obtenue après ajustement dans un modèle linéaire et en appliquant la méthode empirique de Bayes présente dans le package Limma pour R. Enfin, une « heatmap » montrant l'expression des miARN a été générée en utilisant Clucter3 [270] et Java TreeView [271].

4.5. Transcription inverse et PCR quantitative en temps réel

4.5.1. Etape de transcription inverse

La conversion des transcrits ARN en ADNc par transcription inverse est nécessaire pour mesurer leur niveau d'expression par PCR quantitative. Un contrôle sans ARN et un contrôle sans transcriptase sont toujours présents dans les réactions de transcription inverse pour vérifier l'absence d'ADN génomique ou de réplication des amorces entre elles lors de la PCR.

4.5.1.1. Transcription inverse par système *Superscript II*

Au cours de l'étude 2, 1µg d'ARN total ont été rétro-transcrits en ADNc à l'aide du kit *Superscript II* (Life technologies). Ce dernier permet de rétro transcrire les ARN longs uniquement et comprend une transcriptase inverse *Superscript II,* un tampon de transcripton, des amorces aléatoires, du dithiothréitol et un mélange des quatre désoxyribonuclétides. Le volume final était de 20µL et la transcription inverse a été effectuée pendant 42°C pendant 50 minutes, puis 15 minutes à 70°C ont inactivé la transcriptase inverse.

4.5.1.2. Transcription inverse par système *miScript II*

Le kit *miScript II (*Qiagen) permet de rétro transcrire soit les tous les ARN (longs et courts) grâce à l'utilisation du tampon *HiFlex*, soit uniquement les ARN courts grâce à l'utilisation du tampon *HiSpec*. Ce contient kit également un mélange des quatre désoxyribonuclétides, d'ATP, une transcriptase inverse, des amorces oligo-dT et une poly-A polymérase qui ajoute une queue poly-A à l'extrémité 5' de tous les transcrits (**Figure 20**). La présence de la queue poly-A et de l'amorce oligo-dT permettent la transcription inverse d'ARN courts (< 200 paire de bases), normalement trop courts pour être rétro transcrits par un système classique tel que le kit *Superscript II*.

Le mélange de tous les réactifs permet l'obtention d'un volume final de 20µL. La réaction se produit grâce à une exposition à 37°C pendant 60 minutes, puis une étape à 95°C pendant 5 minutes inactive la transcriptase inverse.

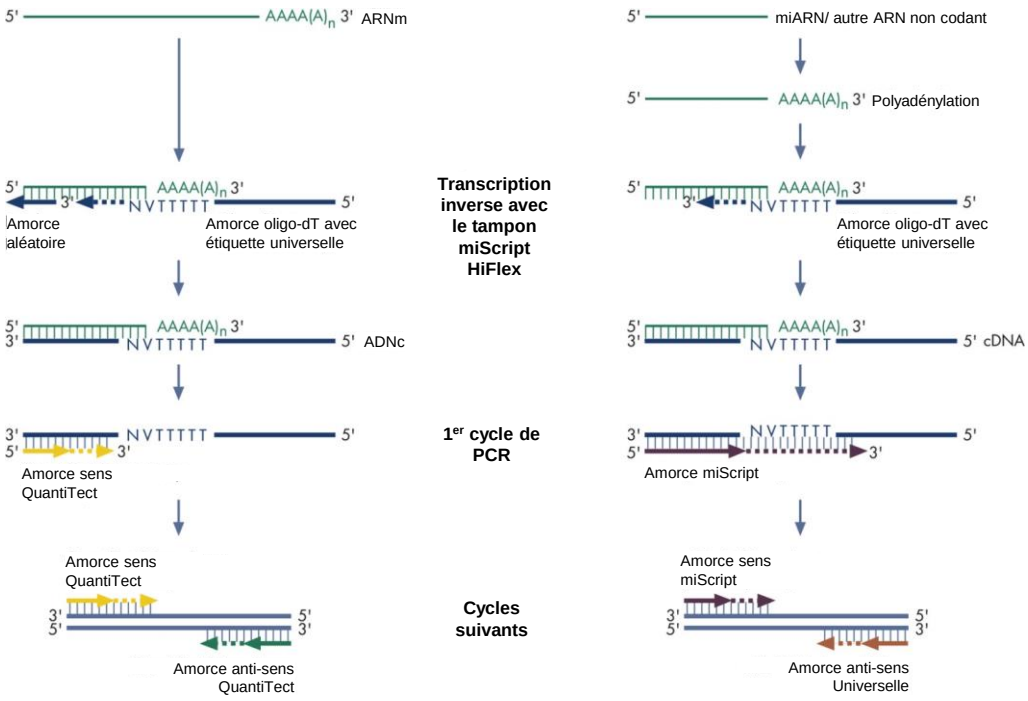


Figure 20: Transcription inverse et PCR quantitative d'ARNm et d'ARN non-codants courts grâce au système miScript PCR system de Qiagen

Image traduite depuis https://www.qiagen.com/us/shop/pcr/real-time-pcr-enzymes-and-kits/two-step-qrt-pcr/miscript-ii-rt-kit/#productdetails

Au cours de l'étude 1, 30µL d'ARN issu de sérum ou de plasma, traités avec ou sans héparinase ont été rétro transcrits à l'aide du kit *miScript II* et du tampon *HiFlex*.

Pour l'étude 3, les ARN courts ont été rétro-transcrits par le kit *miScript II* et l'utilisation du tampon *HiSpec* avec 12µL d'ARN total issu de l'extraction de sérum (humain) ou de plasma (murin). Toujours pour l'étude 3, 500ng d'ARN issu de tissus aortiques humains ont été rétro transcrits avec le kit *miScript II* et le tampon *HiFlex*.

12µL d'ARN issu de sérum (humain) ont été rétro transcrits à l'aide du kit *miScript II* et du tampon *HiFlex* pour l'étude 4 alors que 12µL d'ARN issu de plasma (humain) ont été rétro transcrits à l'aide du kit *miScript II* et du tampon *HiSpec* pour l'étude 5.

4.5.1.3. Transcription inverse par système *TaqMan advanced miARN cDNA*

Enfin, une partie des expériences présentées dans l'étude 3 a été menée par nos collaborateurs de Boston. Ils ont utilisé le kit de synthèse *TaqMan advanced miARN cDNA* (Thermo Fisher scientific) pour effectuer la transcription inverse sur les ARN courts.

Comme pour le système proposé par Qiagen, ce système permet une élongation des ARN courts, ici effectuée grâce à une poly-adénylation à l'extrémité 3' et une ligation avec une séquence adaptatrice à l'extrémité 5' des transcrits. En premier lieu, la polyadénylation est effectuée à l'aide du buffer poly-A, de la polymérase, d'ATP et d'eau sans RNAse et de 2µL d'ARN, pour un volume total de 5µL placé pendant 45 minutes à 37°C, puis pendant 10 minutes à 65°C pour inactiver la polymérase.

Deuxièmement, la ligature entre les transcrits et la séquence adaptatrice en 5' est effectuée : le tampon de ligature, 50% de PEG 800, la séquence adaptatrice, la ligase ARN et de l'eau sans RNAse sont ajoutés aux 5µL obtenus à la fin de l'étape de ligature, pour obtenir ici un volume final de 15µL. La ligature est effectuée à 16°C pendant 60 minutes.

Troisièmement, la transcription inverse à lieu, avec l'ajout d'un tampon de transcription inverse, d'un mélange des quatre désoxyribonuclétides, d'amorces aléatoires universelles, de la transcriptase inverse et d'eau sans RNAse aux 15µL d'échantillons obtenus à la fin de la ligature, pour obtenir un volume final de 30µL. La transcription inverse nécessite seulement 15 minutes à 42°C, puis l'action de la transcriptase inverse est bloquée grâce à une étape de 5 minutes à 85°C.

4.5.2. PCR quantitative

Le principe de la PCR quantitative repose sur la réplication successive d'une molécule ADN par une polymérase. A chaque réplication, un agent intercalant fluorescent (SYBR Green ou Taqman)

s'intercale entre le brin d'ADN mère et le brin nouvellement formé. La réplication du fragment d'ADN est initiée grâce à la présence d'amorces spécifiques de ce dernier.

4.5.2.1. Système *IQ™ SYBR® Green Supermix*

Pour les ARN longs, les PCR quantitatives ont été effectuées à l'aide de l'ADNc dilué 10 fois, d'amorces spécifiques (**Tableau 5**) du transcrit étudié et du *IQ™ SYBR® Green Supermix* (BioRad, Nazareth, Belgique) qui contient une polymérase, un mélange des quatre désoxyribonuclétides et de l'intercalant SYBR® Green. Les séquences des amorces de PCR ont été élaborées avec le programme Beacon Designer (Premier Biosoft, Etats-Unis). L'efficacité des amorces a été identifiée au préalable. Le gène SF3A1 a été utilisé comme normalisateur pour les échantillons de sang total (étude 2). La réaction de PCR a été effectuée dans un thermocycleur CFX96 (BioRad) selon les étapes suivantes :

- Une étape de 3 minutes à 95°C pour activer la polymérase
- 40 cycles chacun composé des étapes suivantes :
  - Une étape de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes
  - Une étape d'hybridation et d'extension à la température adéquate pour les amorces (température d'hybridation) pendant 1 minute
- Finalement, une exposition à 95°C pendant 10 secondes, puis 55°C pendant 5 secondes et de nouveau 95°C achève la réaction et inactive la polymérase

Les caractéristiques des amorces utilisées pour mesurer l'expression des ARNm sont présentées dans le **Tableau 5**.

Tableau 5: Caractéristiques des amorces utilisées pour mesurer l'expression des ARNm par PCR quantitative

Gène	Amorce sens	Amorce antisens	Température
LMNB1	AAGCCGCATGAGAATTGAGAG	TTGATCCCTTATTTCCGCCATC	56°C
LTPB4	GCTGCCTCCCCGCTGTGC	GGTGCGTGGGTGCGAATCC	58°C
MMP9	AACTACGACACCGACGAC	CAGGCGGAGTAGGATTGG	62°C
TGFBR1	CTTATTATGATCTTGTACCTTCTG	GGCATACCAACATTCTCT	58°C
TNXB	GTGGACCATCAGGGAGTGAG	CTGGGGAGCGAAAGTTTCTT	56°C
SFa31	GATTGGCCCCAGCAAGCC	TGCGGAGACAACTGTAGTACG	60°C
SMAD2	GGGTGGGGAGCAGAATAC	GCATGTCATAAAGCTTCACCA	58°C
SMAD4	AGTTGGAATGTAAAGGTGAAG	GATTTGCGTCAGTGTCAT	58°C

4.5.2.2. Système *miScript SYBR Green PCR System*

Au sein de notre laboratoire, le kit *miScript SYBR Green PCR System* (Qiagen) est utilisé pour mesurer l'expression des ARN courts, à la suite d'une transcription inverse effectuée avec le kit *miScript II*. Ce kit contient une polymérase ADN (*HotStarTaq*), un mélange des quatre désoxyribonuclétides et de l'intercalant SYBR® Green. L'ADNc dilué 10 fois et une paire d'amorce spécifique du transcrit ont été ajoutés aux différents composants de ce kit pour obtenir un volume final de 20µL. Les amorces pour miARN ont été conçues par Qiagen : une amorce est spécifique du miARN et la seconde est une amorce universelle, complémentaire de la séquence accolée à la queue poly-A ajoutée sur les transcrits courts lors de la transcription inverse (**Figure 18**).

Le *cel-miR-39* a servi de normalisateur pour les miARN mesurés dans le sérum ou le plasma (études 1, 3, 4 et 5), alors que le snoARN SNORD68 (*Small Nucleolar RNA, C/D Box 68*) a été utilisé comme normalisateur pour les miARN mesurés dans les tissus aortiques humains (étude 3).

Les étapes suivantes, effectuées dans un thermocycleur, sont nécessaires à la réaction de PCR quantitative:

- Une étape de 15 minutes à 95°C pour activer la polymérase
- 40 cycles chacun composé des étapes suivantes :
  - Une étape de dénaturation à 94°C pendant 15 secondes
  - Une étape d'hybridation à 55°C pendant 30 secondes
  - Une étape d'extension à 70°C pendant 30 secondes

4.5.2.3. Système *TaqMan advanced miARN cDNA*

Pour les PCR quantitatives sur ARN courts, nos collaborateurs de Boston ont utilisé le kit de synthèse *TaqMan advanced miARN cDNA* (Thermo Fisher scientific), au cours de l'étude 3.

Avant de procéder à la PCR quantitative, ce système propose une pré-amplification des miARN. Cette étape consiste en une PCR qui amplifie spécifiquement les miARN. Elle nécessite 5µl d'ADNc précédemment rétro-transcrit, un mélange d'amplification contenant une polymérase et des amorces spécifiques de la queue-poly A et de la séquence adaptatrice. Le volume de réaction final est de 50µL et nécessite les conditions de températures suivantes, effectuées dans un thermocycleur :

- Une étape de 5 minutes à 95°C pour activer la polymérase
- 14 cycles chacun composé des étapes suivantes :
  - Une étape de dénaturation à 95°C pendant 3 secondes

- Une étape d'hybridation et d'extension à 60°C pendant 30 secondes

❖ Finalement, une exposition à 99°C pendant 10 minutes achève la réaction et inactive la polymérase.

L'ADNc pré-amplifié a été dilué 10 fois dans du tampon tris éthylènediaminetétraacétique, et il a ensuite été utilisé dans une réaction de PCR quantitative « classique », comme ceci : du *TaqMan® Fast Advanced Master Mix*, du *TaqMan® Advanced miRNA Assay Mix* (contenant des amorces spécifiques au transcrit) et de l'eau sans RNAse ont été ajoutés aux 5µl d'ADNc dilués pour obtenir un volume final de 20µL. Les amorces utilisées ont été élaborées par Thermo Fisher.
La réaction de PCR est effectuée dans un thermocycleur :

❖ Une première étape d'activation de l'enzyme à 90°C pendant 20 secondes

❖ 40 cycles comprenant les étapes :

- De dénaturation à 95°C pendant 1 seconde (ou 3 secondes en fonction de l'appareil utilisé)
- D'hybridation et d'élongation à 60°C pendant 30 secondes.

Le snARN U6b a été utilisé comme normalisateur pour les tissus aortiques murins. Le miR-191-5p a été sélectionné comme normalisateur pour les VE pour sa stabilité dans tous les échantillons et car actuellement, aucun miARN de référence n'a été défini dans les VE (étude 3).

4.5.2.4. Expression relative

Au sein de notre laboratoire, toutes les réactions de PCR quantitatives ont été effectuées dans des plaques 96 puits opaques blanches et un thermocycleur CF96 (BioRad). Un calibrateur a été utilisé sur toutes les plaques de PCR, pour corriger les variations entre les plaques. Les niveaux d'expression des gènes ont été calculés par la méthode relative du ΔΔCt à l'aide du programme CFX Manager 3.1 (BioRad) qui prend en compte l'efficacité des amorces utilisées, déterminée au préalable.

Pour nos collaborateurs de Boston, le thermocycleur *QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR* (Thermo Fisher Scientific) et le programme associé *QuantStudio™ 12K Flex v1.2.2* ont été utilisés.

L'efficacité des amorces utilisées pour les miARN est toujours considérée égale à 100% et les niveaux d'expression des miARN peuvent également être calculés manuellement.

4.5.2.5. Quantification absolue

Au cours des études 4 et 5, l'expression relative obtenue par PCR quantitative a été convertie en nombre de copies/µL, permettant ainsi une quantification absolue.

Pour cela, une version synthétique de chacun des miARN d'intérêt (miR-122-5p pour l'étude 4 et miR-574-5p pour l'étude 5, Qiagen) a été utilisée pour générer une gamme d'étalonnage comprenant des solutions entre 10^{10} copies/µL et 10^{2} copies/µL. Les dilutions ont été effectuées avec de l'eau sans RNAse ni DNAse.

La gamme d'étalonnage a ensuite été rétro-transcrite à l'aide du kit *miScript II* et du tampon *HiFlex* pour l'étude 4 et *HiSpec* pour l'étude 5. Le contrôle négatif de transcription inverse était 50ng d'ARN vecteur (Qiagen). L'ADNc obtenu a été dilué 10 fois et amplifié par PCR quantitative grâce au système *miScript SYBR Green PCR System*. Pour chaque miARN, le logiciel CFX Manager 3.1 a permis la détermination de la pente de la courbe standard (b) et de son point de croisement avec l'axe de l'ordonnée (m). Ainsi, les quantités de miR-122-5p et miR-574-5p par puits de plaque PCR étaient déterminées par la formule suivante : $10^{((Ct\ miARN\text{-}b)/m)}$. La quantité de miARN par échantillon était ensuite déterminée en multipliant la quantité de miARN par puits de plaque PCR avec un facteur de correction de 75 (pour prendre en compte les dilutions présentes pendant le processus). Enfin, cette valeur était divisée par le volume de sérum ou plasma utilisé au départ (200µL) pour obtenir le nombre de copies de miARN par µl de sérum ou plasma.

Pour normaliser le nombre de copies de miARN par µL de sérum ou plasma, un facteur de normalisation a été utilisé. Pour chaque échantillon de sérum ou de plasma, ce facteur a été déterminé selon la formule suivante : $1/[2^{(\text{valeur médiane de Ct de cel-miR-39})-(\text{valeur de Ct de cel-miR-39 Cq de l'échantillon})}]$, dans laquelle la valeur médiane de Ct de cel-miR-39 a été calculée à partir de la médiane des valeurs de Ct de cel-miR-39 de tous les échantillons à comparer.

Au final, pour obtenir la valeur normalisée des miARN à partir du nombre de copies de miARN/µL de sérum ou plasma, la formule suivante a été utilisée :

$10^{((Ct\ miARN\text{-}b)/m)}$ x facteur de dilution x facteur de normalisation;

dans laquelle le facteur de dilution est égal à 75/200

et le facteur de normalisation est $1/[2^{(\text{valeur médiane de Ct de cel-miR-39})-(\text{valeur de Ct de cel-miR-39 Cq de l'échantillon})}]$.

5. Analyses bio-informatiques

Au cours de l'étude 3, afin d'identifier les gènes connus comme étant associés avec la pathogénèse de l'AAT, les mots clés suivants ont été entrés dans la base de données des gènes du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI): (Thoracic AND aortic AND aneurysm) OR (Destructive AND "extracellular matrix" AND remodeling AND aorta) OR (Elastin AND fragmentation AND aorta AND media) OR (("Vascular smooth muscle cells" OR "Vascular smooth muscle cell") AND (proliferation OR secretion OR migration OR apoptosis)) OR ("Extracellular matrix" AND (homeostasis OR structure)) OR (Inflammation AND "extracellular matrix" AND aorta AND media) OR (Elastogenesis AND aorta AND media) OR (Aorta AND vasculogenesis).

De plus, les 12 gènes suivants avaient été identifiés dans la littérature comme étant impliqués dans les formes monogéniques d'AAT ou de dissection aortique et ont aussi été sélectionnés : *FBN1; EFEMP2; COL3A1; TGFBR1; TGFBR2; SLC2A10; NOTCH1; JAG1; SMAD3; ACTA2; MYH11; FLNA* [61].

Les bases de données targetScan [272], miRDB [273] et DIANA microT-CDS [274] ont été utilisées pour identifier les interactions prédites entre les miARN différentiellement exprimés d'après les puces à miARN et les gènes associés à l'AAT. De plus, la base de données IntAct [275] a permis l'identification des interactions protéines-protéines entre les gènes associés à l'AAT. Un réseau d'interactions entre les miARN et les gènes a été généré en utilisant le PolarMapper [276]. Les voies de signalisation et les processus biologiques contenant ces interactions ont été analysées avec la base de données pour l'annotation, la visualisation et la découverte intégrée DAVID [277].

6. Analyses statistiques

Pour tous les tests statistiques utilisés au cours de ce travail, une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme significative.

Les tests de Mann-Whitney et t-test ont été utilisés pour comparer deux groupes de variables continues suivant respectivement une distribution non-gaussienne ou gaussienne (préalablement définie par un test de Shapiro-Wilk). Les tests exact de Fisher et du Khi-carré ont été utilisés pour

l'analyse des variables qualitatives. Ces tests ont été utilisés dans toutes les études décrites dans ce travail.

Le test rho de Spearman a été utilisé pour les corrélations entre deux variables continues : pour corréler les niveaux de miR-574-5p avec les diamètres des différentes parties de l'aorte dans l'étude 2 ; pour corréler les niveaux de miR-122-5p avec l'âge des patients dans l'étude 4 et pour corréler les niveaux de miR-574-5p avec l'âge des patients ou leurs niveaux de NSE dans l'étude 5.

Au cours des études 3 et 4, la courbe ROC a été utilisée pour définir la capacité d'un miARN à discriminer les patients en fonction de la maladie dont ils sont atteints (AAT, discrimination diagnostique du miR-574-5p pour l'étude 3), ou de leur évolution neurologique post-AC (discrimination pronostique du miR-122-5p, étude 4).

Des analyses de prédiction univariées et multivariées avec régression logistique ont été menées dans les études 2, 4 et 5. Pour toutes ces études, les variables cliniques manquantes ont été remplacées par une imputation multiple. Dans l'étude 2, les analyses de prédiction visaient à évaluer la capacité des transcrits à prédire la dysfonction ventriculaire gauche, soit seuls ou en combinaison avec des paramètres démographiques et cliniques. L'expression des ARNm d'intérêt a été transformée par log10 et mise à l'échelle (moyenne = 0 et écart type = 1). Dans les études 4 et 5, les analyses de prédiction visaient à estimer la capacité des miR-122-5p (étude 4) et miR-574-5p (étude 5) à prédire l'évolution neurologique à 6 mois post-AC. Cette dernière était dichotomisée selon l'échelle CPC : un score de CPC de 1 ou 2 était considéré comme une bonne évolution neurologique (converti en valeur = 0) et un score de CPC de 3, 4 ou 5 était considéré comme une mauvaise évolution neurologique (converti en valeur = 1). Les variables continues (y compris l'expression des miARN d'intérêt) ont été transformées par log10 et mises à l'échelle (moyenne = 0 et écart type = 1).

Dans ces 3 études, les valeurs manquantes ont été remplacées par une imputation multiple avec 100 itérations. Les variables continues ont été mises à l'échelle comme ceci : moyenne = 0 et déviation standard = 1. L'expression des transcrits a été transformée par une transformation logarithmique de base 10. Les OR et les (CI 95%) ont été calculés. Le test de Wald khi-carré a été utilisé pour mesurer la différence statistique entre les modèles. Le rapport de vraisemblance (ou *Likelihood ratio test*) a été utilisé pour comparer deux modèles. L'AIC a été utilisé pour estimer la valeur de prédiction des modèles multivariés : une faible valeur d'AIC indique un meilleur ajustement du modèle. Le rapport de vraisemblance a été utilisé pour comparer 2 valeurs d'AIC. L'AIC est pénalisé par le nombre de

variables incluses dans le modèle (alors que l'AUC n'est pas pénalisée de la même manière) et permet ainsi d'éviter un sur-ajustement du modèle par multiplication des variables incluses dans le modèle. La performance des modèles est évaluée grâce au calcul de l'index de la reclassification nette (NRI ou *net reclassification index*) et le critère d'amélioration intégré (IDI ou *integrated discrimination improvment*). L'IDI permet de comparer les capacités de discrimination de deux modèles. Le NRI est un indicateur de la capacité de reclassification des modèles. Une augmentation de la capacité prédictive d'un modèle (générée par exemple par l'ajout d'une ou plusieurs variables) est associée à une augmentation de l'IDI et du NRI [278].

Dans l'étude 2, la validation interne par bootstrap a été utilisée pour tester la robustesse des modèles. Pour chaque échantillon de bootstrap, la sélection du modèle tout entier était effectuée pour sélectionner le meilleur modèle selon l'AIC.

Dans les études 4 et 5, la régression logistique a été utilisée pour évaluer l'association entre les niveaux de miARN et les variables cliniques dans le modèle de prédiction.

Dans les études 4 et 5, l'association entre les niveaux de miARN et la survie post-AC a été estimée grâce à la régression de Cox et aux courbes de Kaplan Meier. Les données manquantes parmi les variables cliniques ont été remplacées par imputation multiple. Les données continues ont été transformées par log10 et mises à l'échelle (moyenne = 0 et écart type = 1). Les ratios de risque (HR) ont été calculés pour la régression de Cox : ils renseignent sur le risque que la variable d'intérêt soit associée à la mort du patient. Pour les courbes de Kaplan-Meier, les niveaux de de miR-122-5p ont été divisés en quartiles (étude 4) alors que les niveaux de miR-574-5p ont été divisés en tertiles (étude 5).

Au cours de ce travail, la version 12,5 du programme SigmaPlot (SigmaPlot) a été utilisée pour les analyses statistiques concernant les résultats descriptifs comme les caractéristiques démographiques et cliniques des patients, la comparaison entre des groupes de patients, les corrélations, les régressions logistiques, les courbes ROC et les courbes de Kaplan-Meier. Les programmes R et RStudio ont été utilisés avec les packages PredictABEL, rms, lmtest, bootStepAIC, matrixStats et survival pour effectuer les analyses univariées et multivariées ainsi que la régression de Cox.

RESULTATS

1. Etude n°1: Interférence de l'héparine endogène avec la transcription inverse et la PCR quantitative

L'héparine exogène, administrée pour ses qualités anticoagulantes dans le contexte de diverses maladies est capable d'interférer avec les réactions de transcription inverse et de PCR [279,280]. L'héparine est également présente de manière endogène dans la circulation sanguine à des concentrations variant entre 0,10 et 0,24 IU/mL [281], et est secrétée de manière physiologique par les mastocytes [282]. Certaines maladies modifient la production de l'héparine, telles que les chocs hémorragiques, les infections, l'hypothermie ou encore les transplantations d'organes [283]. En revanche, il n'a pas été rapporté que l'AAT pourrait être associé à une modification des taux d'héparine endogène.

Au cours d'une étude parallèle effectuée au laboratoire, la mesure de l'expression de miARN circulants dans le contexte de l'AAT dans le sérum de patients fut impossible à cause d'une inhibition totale de la réverse transcription et de la PCR quantitative. Cette inhibition semblait correspondre à celle induite par de forts niveaux d'héparine exogène. Toutefois, les patients n'avaient pas été traités avec de l'héparine et les échantillons de sérum avaient été récupérés dans des tubes sans héparine. L'inhibition de la réverse transcription et de la PCR quantitative fut supprimée après un traitement à l'héparinase I, permettant ainsi la mesure du cel-miR-39 (ARN normalisateur externe ajouté au cours du processus d'extraction d'ARN) et du miR-451a (connu pour être fortement exprimé dans le plasma). L'héparine présente de manière endogène dans la circulation semblait ainsi pouvoir inhiber les réactions de transcription réverse et de PCR. La concentration endogène d'héparine moyenne mesurée dans cinq échantillons était de 0,17 (±0,05) IU/mL, soit une concentration similaire à celles reportées précédemment [281].

Cette étude a eu pour objectif de déterminer si de faibles quantités d'héparine, à des concentrations équivalentes aux taux d'héparine endogène, étaient capables d'interférer avec les réactions de transcription inverse et de PCR.

Trois échantillons de plasma ont été prélevés chez des volontaires sains. Pour éliminer toute héparine endogène présente dans les échantillons, ces derniers ont été laissés à température ambiante. La

déplétion en héparine a été vérifiée à l'aide du kit *COATEST* de Chromogenix. La concentration mesurée était inférieure à 0,05 IU/mL, qui correspond au seuil de détection du kit. Des concentrations croissantes d'héparine (de 0,002 IU/mL à 2 IU/mL) ont été ajoutées aux trois échantillons de plasma, suivi du traitement habituel des échantillons (ajout d'ARN de référence, extraction d'ARN). L'ARN obtenu a été traité ou non avec de l'héparinase, puis rétro transcrit en ADNc qui a été utilisé pour mesurer l'expression de miARN fortement exprimés (miR-451a, miR-21-5p, miR-126-3p) et du cel-miR-39 dans le sérum par PCR quantitative.

Nous avons observé que :

- Une concentration d'héparine de 0,02 IU/mL est suffisante pour inhiber partiellement l'expression du cel-miR-39, miARN artificiel ajouté comme normalisateur dans les échantillons, mais ne modifie pas l'expression du miARN endogène miR-451a, dans le sérum et dans le plasma.
- Une concentration de 0,1 IU/mL d'héparine suffit pour empêcher la mesure de l'expression du cel-miR-39 et du miR-451a dans le sérum et dans le plasma. Le traitement avec l'héparinase permet d'annuler totalement cette inhibition pour le cel-miR-39, mais pas pour le miR-451a.
- Des résultats similaires ont été obtenus pour la mesure d'autres miARN : miR-21-5p, miR-126-3p, dans le plasma ou dans le sérum.

Ces résultats montrent que la présence d'héparine endogène dans les échantillons sanguins, à des niveaux similaires à ceux trouvés dans la circulation sanguine, peut inhiber les réactions de transcription inverse et de PCR quantitative.

Papers in Press. Published February 26, 2018 as doi:10.1373/clinchem.2017.284653
The latest version is at http://hwmaint.clinchem.aaccjnls.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2017.284653

Clinical Chemistry 64:5
000–000 (2018)

Letters to the Editor

Endogenous Heparin Interferes with Quantification of MicroRNAs by RT-qPCR

To the Editor:

MicroRNAs (miRNAs)[1] are small noncoding RNAs that regulate the expression of target genes, thereby contributing to disease development. The discovery of their presence in the bloodstream has stimulated extensive characterization of their potential as disease biomarkers. Reverse transcription followed by quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) is the most widely used technique to quantify the expression of miRNAs, both in body fluids and tissue samples.

In an ongoing study, we aimed to address the biomarker potential of circulating miRNAs for thoracic aortic aneurysm (TAA) using RT-qPCR. Surprisingly, a complete inhibition of RT-qPCR prevented the measurement of miRNAs in serum samples from many patients. We first hypothesized that this inhibition might be caused by exogenous heparin, which is well known to interfere with RT-qPCR assessment of miRNAs *(1)*. However, the patients were not receiving heparin therapy and blood samples were not collected in tubes containing heparin. In addition, TAA is not known to modify endogenous heparin level, in contrast with hemorrhagic shock, infection, hypothermia, or organ transplantation *(2)*. To check whether endogenous heparin was responsible for the RT-qPCR inhibition, we treated 5 serum samples from TAA patients with heparinase I and observed a recovery of the RT-qPCR signal for cel-miR-39 and miR-451a (not shown). The rationale for measuring these 2 miRNAs is that the former is the most widely used spike-in control and miR-451a is highly expressed in blood. Of note, the average concentration of heparin in the 5 samples was mean (SD) 0.17 (0.05) IU/mL (COATEST heparin assay; Chromogenix), which is within the physiological range of concentrations of heparin reported in the blood of healthy individuals: 0.10–0.24 IU/mL *(3)*. Together, these elements suggested that not only exogenous but also endogenous heparin is able to inhibit RT-qPCR and prevent detection of miRNAs. However, we cannot exclude the possibility that other factors present in blood (e.g., bile salt) may also contribute to this inhibition.

To further test this possibility, we used plasma samples collected in citrate tubes from 3 healthy donors. These samples were depleted of endogenous heparin by an incubation at room temperature, with heparin being rapidly degraded and neutralized when not kept on ice. The depletion was checked by measuring heparin levels in the samples, which were below 0.05 IU/mL (detection limit of the COATEST heparin assay; Chromogenix). Then, increasing concentrations of exogenous heparin (from 0.002 IU/mL to 2 IU/mL; B. Braun) were added to the 3 heparin-depleted plasma samples. Cel-miR-39 was spiked-in, RNA was extracted and treated with heparinase, and expression levels of cel-miR-39 and miR-451a were assessed by RT-qPCR. As shown in Fig. 1, a concentration of 0.02 IU/mL of heparin partially inhibited the detection of cel-miR-39 and did not affect the detection of miR-451a. This observation is consistent with previous data showing that spike-in controls are more sensitive to heparin than endogenous miRNAs, casting some doubts about the reliability of normalizing miRNA measurements with spike-in controls *(1)*. Concentrations as low as 0.1 IU/mL prevented the detection of both miRNAs, an effect fully reverted by heparinase treatment for cel-miR-39 and only partly for miR-451a (Fig. 1). Similar results were obtained in serum samples and for other miRNAs (e.g., miR-21–5p and miR-126–3p). These data show that physiological concentrations of endogenous heparin may prevent RT-qPCR assessment of circulating miRNAs.

We report here important limitations of the use of RT-qPCR for the assessment of circulating levels of miRNAs. Heparin is widely used in the hospital for its anticoagulant activity, both in patients and in blood collection tubes for plasma preparation. Inhibition of RT-qPCR by high levels of exogenous heparin was widely known, and we now show that even low levels of endogenous heparin (within physiological range) interfere with the measurement of miRNAs by RT-qPCR.

As shown for miR-451a (Fig. 1), heparinase treatment of RNA samples may not be able to completely prevent the inhibition of RT-qPCR by heparin. Thus, heparinase treatment of RNA samples may add a supplementary bias in the quantification of miRNAs and should not be recommended. Instead, in addition to avoiding the use of heparin for blood collection, we recommend that heparin concentration should be measured before miRNA measurement by RT-qPCR and only samples with $<$0.02 IU/mL of heparin should be processed. Alternatively, technologies without an amplification step, such as those using fluorescence probes, may be favored. Finally, our recommendation can be extrapolated to any other quantification of gene expression levels by RT-qPCR in samples potentially

© 2018 American Association for Clinical Chemistry

[1] Nonstandard abbreviations: MiRNA, microRNA; RT-qPCR, reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction; TAA, thoracic aortic aneurysm.

Copyright (C) 2018 by The American Association for Clinical Chemistry

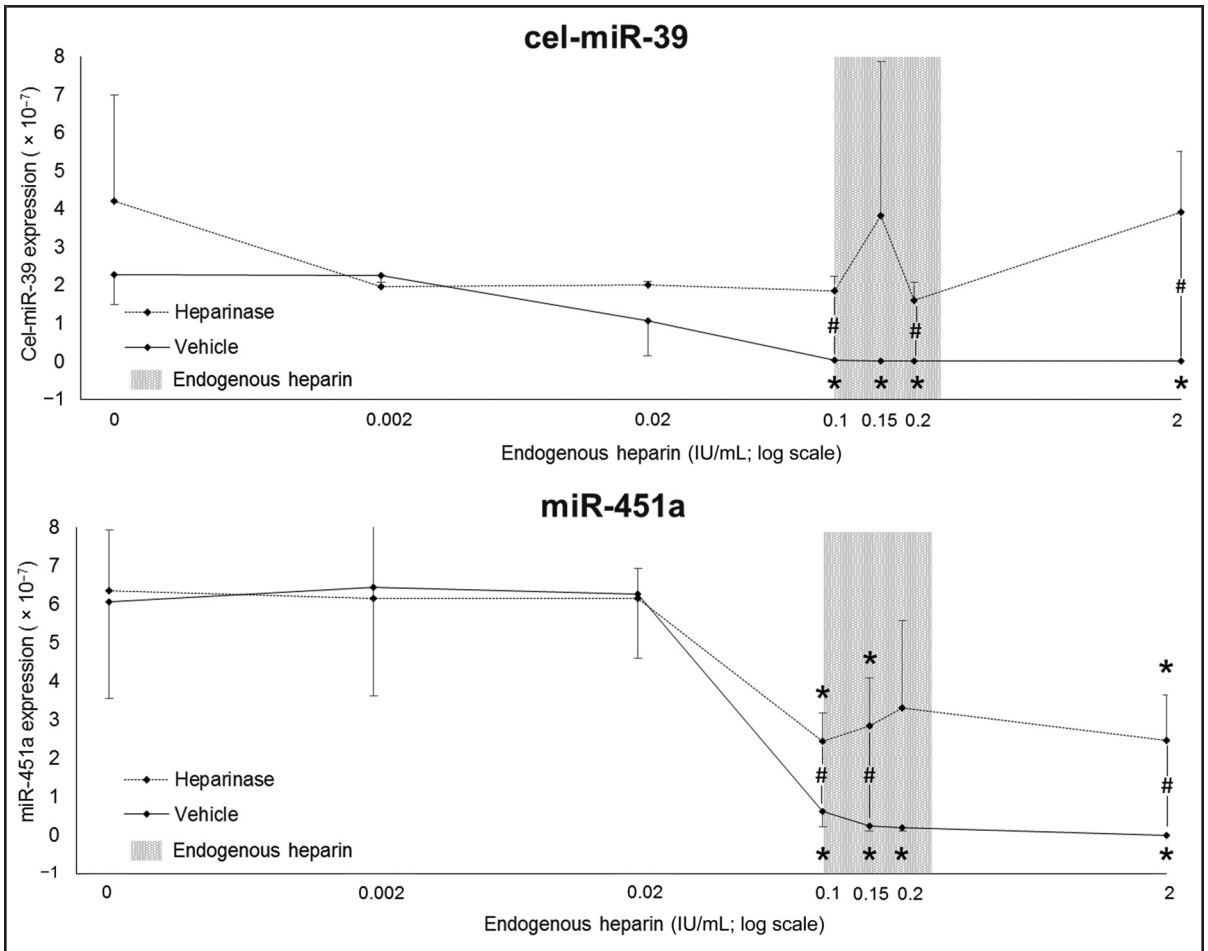


Fig. 1. Endogenous levels of heparin inhibit detection of miRNAs by RT-qPCR.

200 μL of plasma samples collected in citrate tubes from 3 healthy donors were depleted of endogenous heparin before addition of exogenous heparin. RNA was extracted as described *(4)* and treated with 0.89 U heparinase I or vehicle for 1 h at 25 °C *(5)* before RT-qPCR for cel-miR-39 and miR-451a using the miScript system (Qiagen) *(4)*. Expression levels were calculated using the 2^{-Cq} formula. Gray zone: healthy range of endogenous levels of heparin. Values are mean (SD). * $P < 0.05$ vs no heparin; # $P < 0.05$ vs heparinase vehicle (2-tailed *t*-test).

containing even low levels of heparin.

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

Authors' Disclosures or Potential Conflicts of Interest: *Upon manuscript submission, all authors completed the author disclosure form. Disclosures and/or potential conflicts of interest:*

Employment or Leadership: None declared.

Consultant or Advisory Role: None declared.

Stock Ownership: None declared.

Honoraria: None declared.

Research Funding: A. Boileau, the National Research Fund of Luxembourg (grant # AFR 8832104); C.L. Lino Cardenas, the Fredman Fellowship, the Toomey Fund for Aortic Dissection Research, the Hassenfeld Fellowship; M.E. Lindsay, the National Institutes of Health (grant #HL130113), the Toomey Fund for Aortic Dissection Research; Y. Devaux, the National Research Fund and the Ministry of Higher Education and Research of Luxembourg.

Expert Testimony: None declared.

Patents: None declared.

References

1. Kaudewitz D, Lee R, Willeit P, McGregor R, Markus HS, Kiechl S, et al. Impact of intravenous heparin on quantification of circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. Thromb Haemost 2013;110:609–15.
2. Shankar VK, Handa A, Hands L. Endogenous heparin activity is decreased in peripheral arterial occlusive disease. J Vasc Surg 2008;47:1033–8.
3. Engelberg H. Plasma heparin levels in normal man. Circulation 1961;23:578–81.
4. Devaux Y, Dankiewicz J, Salgado-Somoza A, Stammet P, Collignon O, Gilje P, et al. Association of circulating microRNA-124–3p levels with outcomes after out-of-hospital cardiac arrest: a substudy of a randomized clinical trial. JAMA Cardiol 2016;1:305–13.
5. Johnson ML, Navanukraw C, Grazul-Bilska AT, Reynolds LP, Redmer DA. Heparinase treatment of RNA before quantitative real-time RT-PCR. Biotechniques 2003;35:1140–2, 1144.

Adeline Boileau[2]
Christian L. Lino Cardenas[3]
Mark E. Lindsay[3]
Yvan Devaux[2]*
On behalf of the Cardiolinc™ network (www.cardiolinc.org)

[2] *Cardiovascular Research Unit*
Luxembourg Institute of Health
Strassen, Luxembourg
[3] *Cardiovascular Research Center*
Department of Medicine
Massachusetts General Hospital
Harvard Medical School
Boston, MA

*Address correspondence to this author at:
Cardiovascular Research Unit
Luxembourg Institute of Health
84 Val Fleuri, L1526 Luxembourg
Fax +352-26970396
E-mail yvan.devaux@lih.lu

Previously published online at
DOI: 10.1373/clinchem.2017.284653

2. Etude n°2 : Trois transcrits sanguins prédicteurs de la fonction cardiaque après un infarctus du myocarde

Après la survenue d'un IM, l'évolution de la fonction cardiaque à court et à long terme dépend du remodelage ventriculaire. Lorsque celui-ci est délétère, il est associé à une diminution de la fonction cardiaque, pouvant mener jusqu'à l'IC.

L'identification des patients ayant un risque de développer un remodelage ventriculaire délétère permettrait une adaptation plus précise et individuelle de la prise en charge médicale. Toutefois, il n'existe actuellement pas d'outil permettant de prévoir l'évolution de la fonction ventriculaire après la survenue d'un IM. La mesure du BNP est actuellement recommandée mais peu utilisée : elle reflète la fonction cardiaque actuelle et aide au diagnostic d'IC, mais elle ne peut pas prédire la survie ou le temps d'hospitalisation [52].

Des travaux antérieurs, menés par notre équipe dans des sous-groupes de patients du registre LUCKY [231-235,284], suggèrent que le transcriptome des cellules sanguines et en particulier, les transcrits codants pour les protéines LMNB1, MMP9, TGFBR1, LTBP4 et TNXB, pourraient aider à prédire l'évolution de la fonction cardiaque à moyen terme après un IM.

Le but de cette étude a été de confirmer à plus grande échelle l'association entre l'expression des transcrits des cinq gènes *LMNB1, MMP9, TGFBR1, LTBP4* et *TNXB* dans le sang et l'évolution de la fonction ventriculaire après un IM.

Pour cela, nous avons mesuré l'expression de ces 5 transcrits dans des échantillons de sang total de 449 patients ayant subi un IM en utilisant la transcription inverse et la PCR quantitative. Ces patients font partie de la cohorte LUCKY, basée à Luxembourg. Tous les patients ont reçu une ICP, 352 patients avaient un IM STEMI et 97 avaient un IM NSTEMI.

La fonction cardiaque a été évaluée environ 4 mois après la survenue de l'IM par mesure de la FE ventriculaire par échocardiographie. Cette mesure a été utilisée comme référence pour l'évolution de la fonction cardiaque à moyen terme après un IM et a permis de classer les patients en deux groupes : les patients ayant une faible FE (<40%) ont été considérés comme ayant une mauvaise évolution de la fonction cardiaque et les patients ayant une FE normale ou préservée (>40%) ont été considérés comme ayant une bonne évolution de la fonction cardiaque.

Les résultats suivants ont été obtenus :

- Les transcrits codants pour les gènes *LMNB1, MMP9, TGFBR1* étaient surexprimés chez les patients avec une mauvaise évolution de la fonction cardiaque (FE<40%) comparés aux patients avec une bonne évolution de la fonction cardiaque. Inversement, le transcrit codant pour le gène *LTBP4* était sous-exprimé chez les patients ayant une mauvaise évolution de la fonction cardiaque. Le transcrit codant pour le gène *TNXB* était similairement exprimé entre les deux groupes de patients.
- Les cinq transcrits étaient des prédicteurs univariés de l'évolution de la fonction cardiaque post-IM. Les transcrits *LMNB1* (OR [95% CI]: 1,40 [1,12-1,74]); *MMP9* (OR [95% CI]: 1,35 [1,07-1,69]); *TGFBR1* (OR [95% CI]: 1,43 [1,15-1,79]) et *TNXB* (OR [95% CI]: 1,26 [1,02-1,57]) étaient tous associés positivement avec la dysfonction ventriculaire. A l'inverse, le transcrit *LTBP4* (OR [95% CI]: 0,75 [0,57-0,98]); était négativement associé avec la dysfonction ventriculaire.
- Les transcrits codants pour les gènes *LTBP4, TGFBR1* et *TNXB* étaient des prédicteurs indépendants de la fonction cardiaque après un IM. En particulier, les transcrits pour les gènes *TGFBR1* (OR [95% CI]: 1,68 [1,11-2,53]) et *TNXB* (OR [95% CI]: 1,41 [1,04-1,90]) étaient positivement associés à la dysfonction ventriculaire alors que le transcrit *LTBP4* (OR [95% CI]: 0,66 [0,47-0,93]) était négativement associé avec la dysfonction ventriculaire post-IM.
- Le modèle de prédiction clinique contenant les variables connues comme associées à l'évolution de la fonction cardiaque (l'âge, le genre, l'IMC, le diabète, l'hypertension, l'hypercholestérolémie, la concentration sanguine de globules blancs, le type d'IM, le tabagisme, un IM antérieur, le temps d'ischémie, les niveaux de c-TnT, de CPK et de NT-proBNP) peut prédire la dysfonction ventriculaire post-IM avec un AIC de 398. Lorsque les niveaux d'expression des trois transcrits *LTBP4, TGFBR1* et *TNXB* sont ajoutés à ce modèle clinique, l'AIC obtenu est alors de 383. La différence de prédiction des deux modèles est significative, avec un NRI de 0,45 [0,22-0,69], p= 0,0002 et un IDI de 0,05 [0,02-0,08], p = 0,003 et une valeur de p < 0,001 pour le rapport de vraisemblance. L'ajout des trois transcrits dans le modèle permet ainsi une augmentation de la prédiction de la dysfonction ventriculaire post-IM.

Ces résultats suggèrent que les niveaux d'expression des transcrits codants pour les gènes *LTBP4, TGFBR1* et *TNXB* dans le sang total au moment de l'IM pourraient améliorer la prédiction de la fonction cardiaque après un IM.

International Journal of Cardiology 254 (2018) 28–35

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Cardiology

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

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 Cardiolinc 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) ≤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; ΔΔCt, relative quantification method; TGFBR1, transforming growth factor beta receptor I; 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.devaux@lih.lu (Y. Devaux).

https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.10.109
0167-5273/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

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 μg/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 (ΔΔCt) 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, lmtest 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 ≤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 ≤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 ≤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).

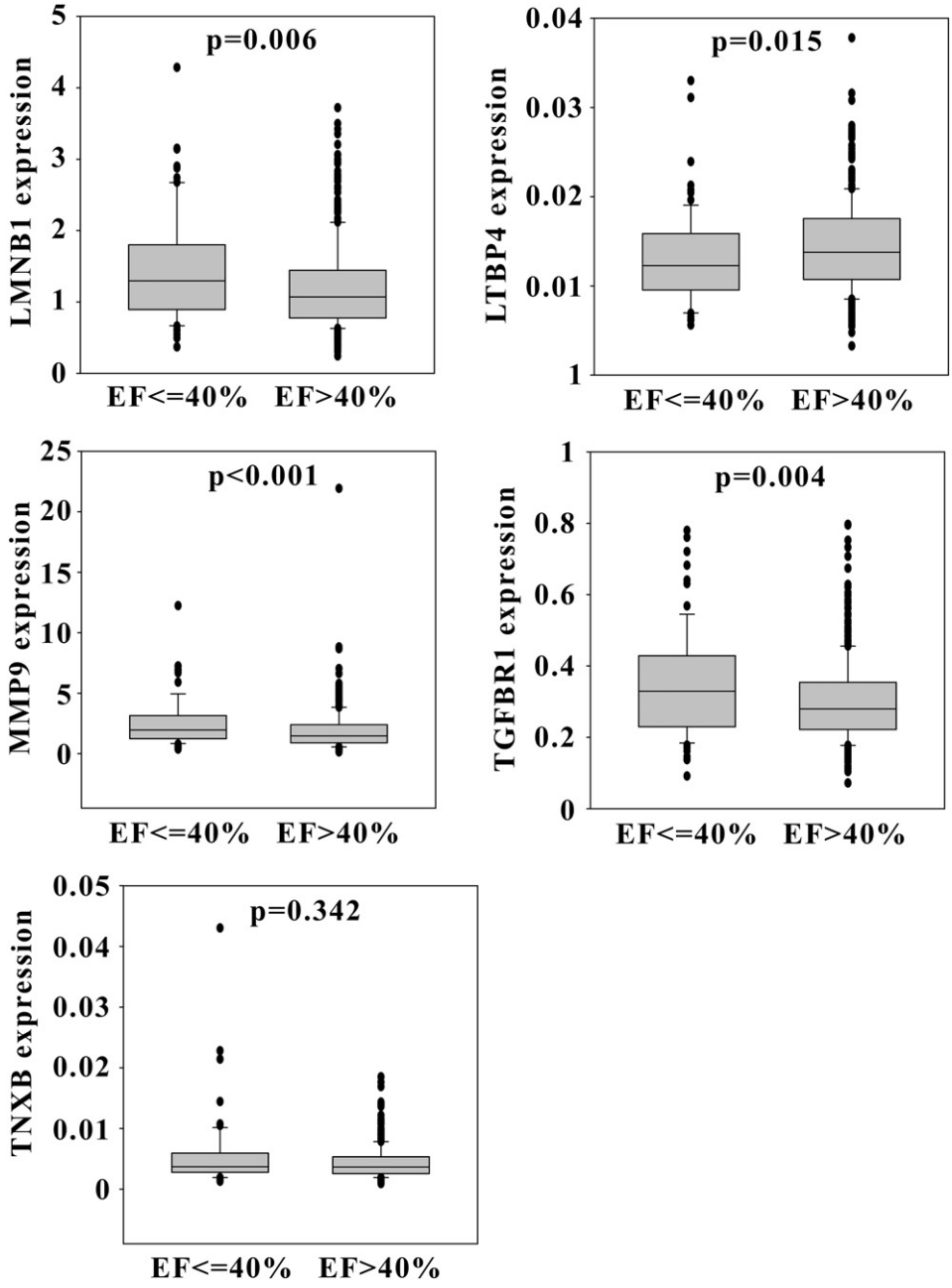


Fig. 1. Expression levels of 5 genes in 449 acute MI patients. Expression levels of LMNB1, MMP9, TGFBR1, TNXB and LTBP4 were assessed using quantitative PCR in whole blood samples obtained at reperfusion in 449 acute MI patients. Box-plots show the expression levels according to the EF at 4-month follow-up, 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

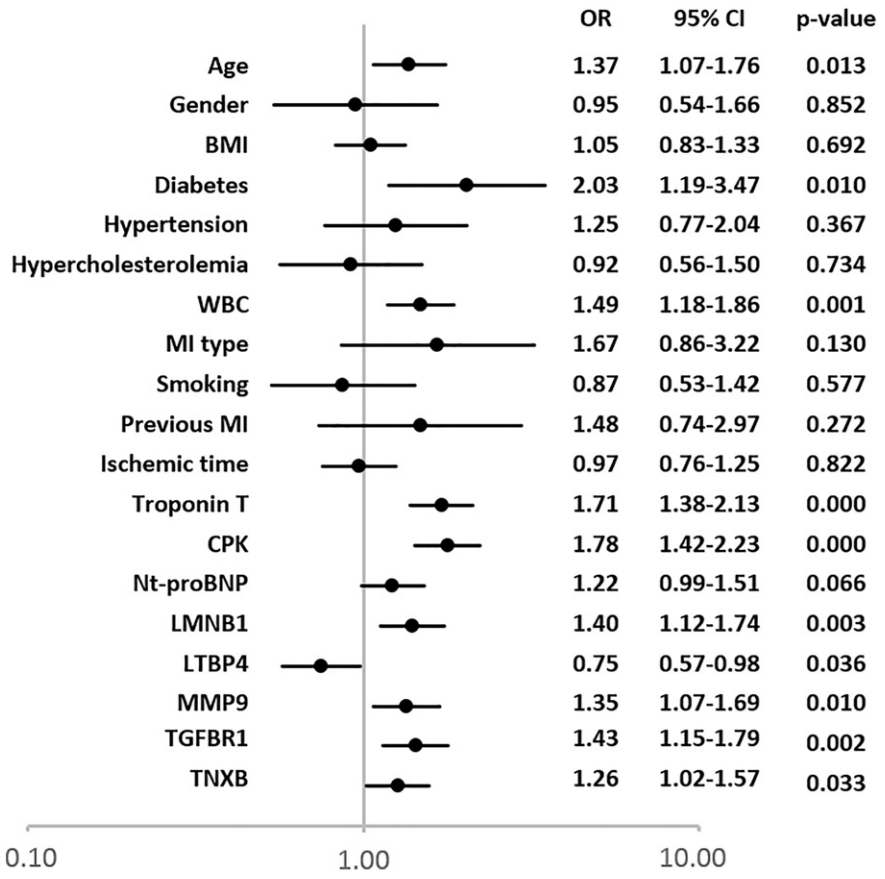


Fig. 2. Univariate analyses. The ability of 5 genes to predict LV dysfunction (4-month EF ≤40%) was determined using univariate logistic regression in 449 acute MI patients. Odds ratios with 95% confidence intervals are shown. X axis is in log scale.

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 TGFB1 and activation of the TGFB1-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 TGFβ protein (LTBP) 4 which belongs to LTBP/fibrillin glycoproteins family [28] and is mainly expressed in the heart, skeletal and smooth muscles. LTBP4 controls TGFβ signaling by sequestrating TGFβ 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 TGFβ and subsequently to the induction of the related-cell signaling pathways. In addition, LTBPs contribute to the assembly and secretion of TGFβ [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].

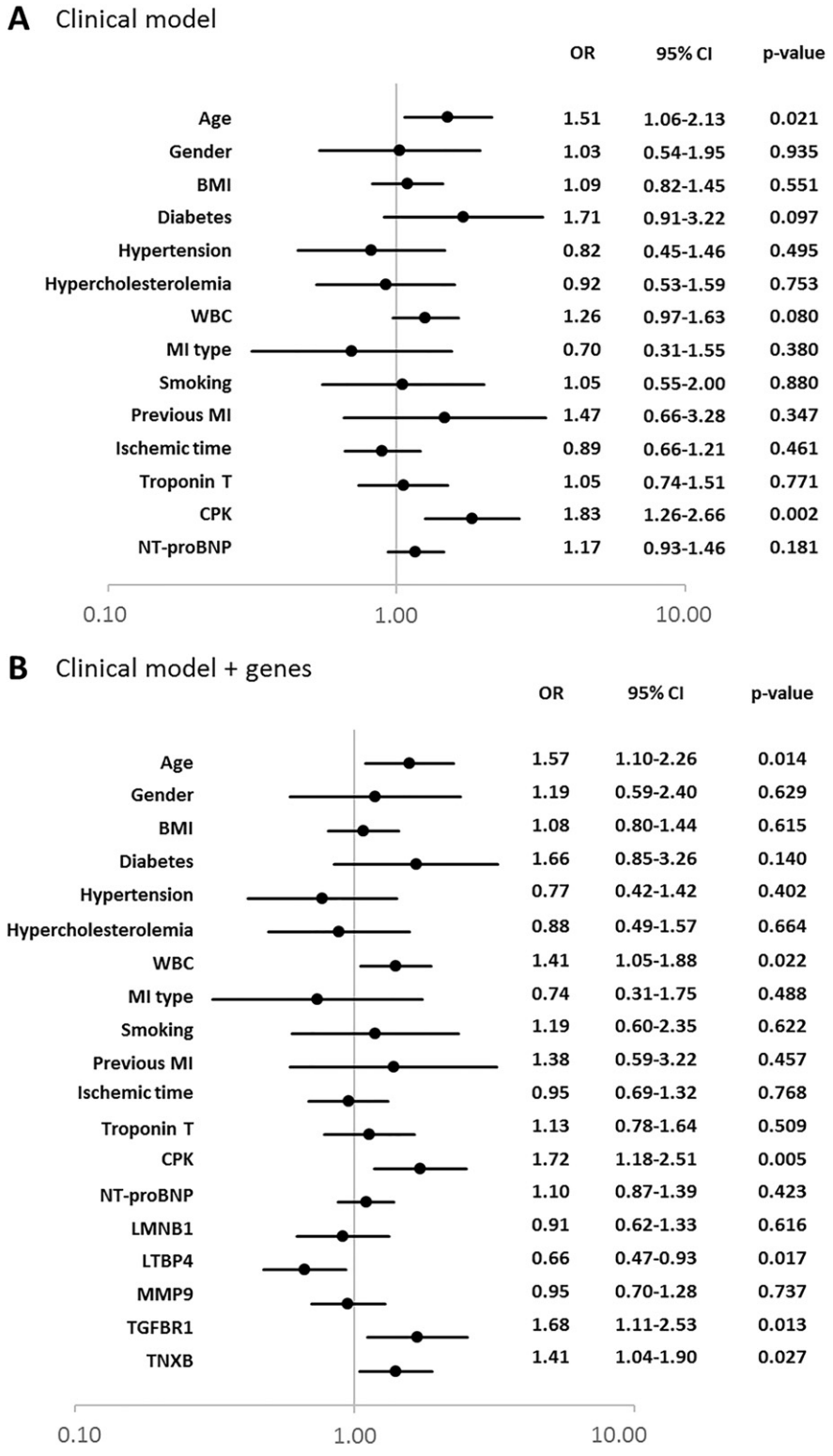


Fig. 3. Multivariable analyses. Multiple logistic regression was conducted to address the association of clinical variables and genes with LV dysfunction (4-month EF ≤40%). A. Multivariate clinical model including clinical parameters and cardiac biomarkers. B. Multivariate model with clinical parameters 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

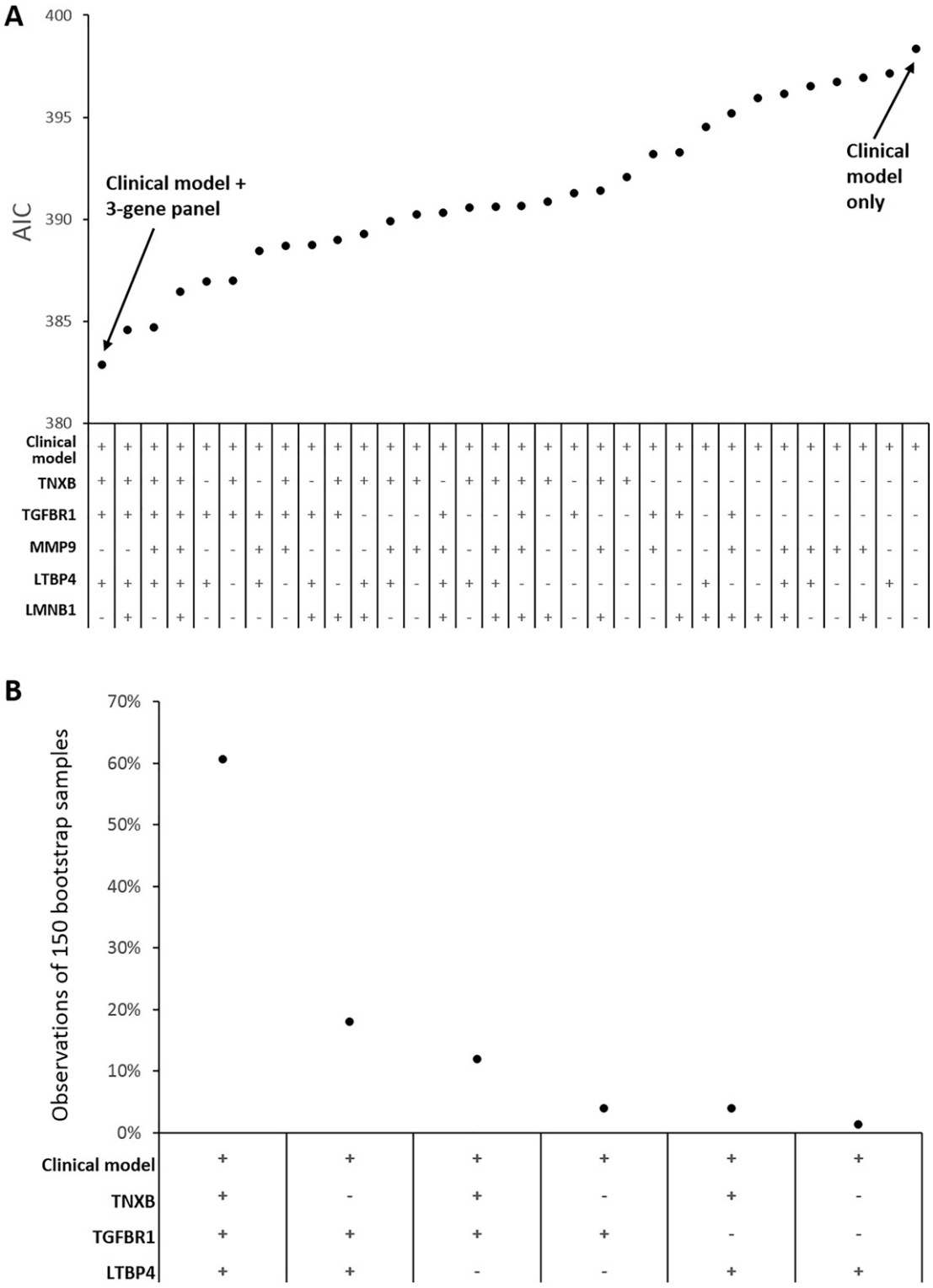


Fig. 4. Selection of the optimal gene panel. Multiple logistic regression was conducted to address the association of clinical variables and genes with LV dysfunction (4-month EF ≤40%). A. The Akaike Information Criteria (AIC) was calculated for the clinical model only and after adding each combination 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

[1] 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.
[2] C.M. Dewey, K.M. Spitler, 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.
[3] 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.
[4] 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.
[5] 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.
[6] 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.
[7] 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.
[8] F. Azuaje, Y. Devaux, D.R. Wagner, Integrative pathway-centric modeling of ventricular dysfunction after myocardial infarction, PLoS One 5 (3) (2010), e9661.
[9] 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.
[10] Y. Devaux, Transcriptome of blood cells as a reservoir of cardiovascular biomarkers, Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res. 1864 (1) (2017) 209–216.
[11] 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.
[12] 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.
[13] R.A. Frieler, R.M. Mortensen, Immune cell and other noncardiomyocyte regulation of cardiac hypertrophy and remodeling, Circulation 131 (11) (2015) 1019–1030.
[14] 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.
[15] 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.
[16] 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.
[17] D.R. Wagner, Y. Devaux, O. Collignon, Door-to-balloon time and mortality, N. Engl. J. Med. 370 (2) (2014) 178–182.
[18] M. Vausort, D.R. Wagner, Y. Devaux, Long noncoding RNAs in patients with acute myocardial infarction, Circ. Res. 115 (7) (2014) 668–677.
[19] 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.
[20] 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.
[21] 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.
[22] K. Manju, B. Muralikrishna, V.K. Parnaik, Expression of disease-causing lamin A mutants impairs the formation of DNA repair foci, J. Cell Sci. 119 (Pt 13) (2006) 2704–2714.
[23] 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.
[24] 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.
[25] 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.
[26] 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.
[27] 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.
[28] 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.
[29] 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. Hacot, 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.

3. Etude n°3 : Le miR-574-5p : biomarqueur diagnostique potentiel de l'anévrisme de l'aorte thoracique

L'AAT est une dilatation asymptomatique de l'aorte dans sa partie thoracique. Il est associé à la dissection aortique, qui est une affection sévère de l'aorte [56]. Cependant, le diamètre aortique reste un faible prédicteur de la survenue de la dissection aortique [285]. L'implication des miARN (tissulaires et circulants) dans les MCV est bien connue. Des profils d'expression de miARN dans des tissus aortiques sains et anévrismaux ont été mesurés [186-188], et l'association entre des miARN circulants et la dissection aortique a été rapportée [251]. Ces études confortent l'idée que des miARN pourraient être à la fois impliqués dans la pathogénèse de l'AAT et utilisés comme biomarqueurs diagnostiques de l'AAT.

Cette étude a eu pour objectif d'identifier des miARN associés à l'AAT et qui pourraient avoir un potentiel de biomarqueur diagnostique ou pronostique.

Pour cela, notre étude a été divisée en plusieurs étapes :

- Une phase de découverte a d'abord été menée sur des biopsies de media aortique (19 contrôles vs 19 AAT) grâce à l'utilisation de puces à miARN. Ensuite, des analyses de prédictions informatiques ont permis d'identifier un miARN candidat, à la fois différentiellement exprimé entre les patients avec AAT et les contrôles mais également prédit comme ciblant des gènes identifiés comme associés à l'AAT. L'expression du miARN candidat miR-574-5p a été confirmée par PCR quantitative dans les biopsies aortiques.
- L'expression du miR-574-5p dans le sérum provenant de 20 personnes saines et 28 personnes ayant un AAT et son association avec le diamètre aortique des patients a été étudiée.
- L'expression du miR-574-5p a été également étudiée dans un modèle de souris $Fbn1^{C1039G/+}$, qui développent des anévrismes aortiques spontanés. Son expression a été mesurée par PCR quantitative dans des biopsies de tissu aortique (4 souris saines vs 4 souris $Fbn1^{C1039G/+}$) et de plasma (6 souris saines vs 10 souris $Fbn1^{C1039G/+}$). La localisation tissulaire du miR-574-5p a été étudiée dans des biopsies d'aorte, cœur, foie, rein et poumon par FISH. L'étude des VE a permis de caractériser son expression dans le sang.
- L'interaction entre le miR-574-5p, les VE et les CML a également été étudiée.

Cette étude nous a fourni les résultats suivants :

- 232 miARN étaient différentiellement exprimés entre les 19 tissus aortiques sains et les 19 tissus aortiques anévrismaux : 162 étaient surexprimés et 70 étaient sous-exprimés dans les tissus aortiques AAT.
- La base de données *NCBI Gene database* a permis l'identification de 690 gènes associés à l'AAT. Les bases de données targetScan, miRDB et DIANA microT-CDS ont permis d'identifier 5510 interactions entre les 232 miARN différentiellement exprimés dans les biopsies aortiques anévrismales et les 690 gènes associés à l'AAT. De plus, 1072 interactions protéine-protéine ont été identifiées entre les gènes associés à l'AAT grâce à la base de données IntAct database. La totalité de ces interactions prédites a été compilée dans un réseau, lui-même divisé en modules. Parmi eux, le module 6 a été sélectionné car il était enrichi en processus biologiques associés à la biologie vasculaire. Au sein du module 6, le miR-574-5p a été choisi car il était le miARN qui avait le plus grand nombre d'interactions prédites avec les gènes et qui était le plus fortement différentiellement exprimé.
- Le miR-574-5p était sous-exprimé dans le tissu aortique de patients avec AAT comparé aux contrôles, avec les puces à miARN et par PCR quantitative.
- Le miR-574-5p était surexprimé dans le sérum de patients avec un AAT comparé au sérum provenant de personnes saines. De plus, les niveaux circulants de miR-574-5p ont permis d'identifier les patients avec AAT avec une AUC de 0,87, spécificité de 85% et sensibilité de 78,6%.
- Le miR-574-5p était sous-exprimé dans le tissu aortique de souris $Fbn1^{C1039G/+}$ comparé aux souris saines, en FISH et par PCR quantitative.
- Les souris $Fbn1^{C1039G/+}$ présentaient plus de VE dans leur plasma que les souris saines. De plus, les VE de souris $Fbn1^{C1039G/+}$ contenaient plus de miR-574-5p que les VE provenant de souris saines.
- Le miR-574-5p était fortement exprimé dans les reins et faiblement exprimé dans les poumons des souris. De plus, le miR-574-5p semblait moins exprimé dans le cœur, les poumons et le foie des souris $Fbn1^{C1039G/+}$ comparé aux souris saines, mais était plus exprimé dans les reins des souris $Fbn1^{C1039G/+}$ (résultats obtenus par FISH).
- Le traitement de CML aortiques saines avec des VE issues de souris saines provoquait une légère augmentation de l'expression du miR-574-5p et du nombre de VE comparé aux cellules non traitées. Le traitement de CML aortiques saines avec des VE issues de souris $Fbn1^{C1039G/+}$ provoquait une forte augmentation de l'expression du miR-574-5p et du nombre de VE.

- Le miR-574-5p était surexprimé dans le plasma de souris Fbn1$^{C1039G/+}$ comparé aux souris saines. De plus, son expression était positivement corrélée avec le diamètre aortique des souris (saines et Fbn1$^{C1039G/+}$ regroupées ensemble).

Le miR-574-5p est associé avec l'AAT et pourrait être un biomarqueur diagnostique potentiel de cette maladie. De plus, il semble être transporté dans le sang via des VE, ce qui suggère son potentiel rôle de médiateur paracrine dans la pathogénèse de l'AAT.

MicroRNA-574-5p: A Circulating Marker of Thoracic Aortic Aneurysm

Adeline Boileau, MSc[1], Christian L. Lino Cardenas, PharmD MSc PhD[2], Audrey Courtois, PhD[3]; Lu Zhang, MSc[1]; Rodosthenis S. Rodosthenous, ScD[2], Saumya Das MD, PhD[2], Natzi Sakalihasan MD, PhD[3], Jean-Baptiste Michel, MD, PhD[4]; Mark E. Lindsay MD, PhD[2]; Yvan Devaux, PhD[1]

From the [1.]Cardiovascular Research Unit, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg; [2.] Cardiovascular Research Center, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, MA, USA; [3.] Surgical Research Center, Department of Cardiovascular and Thoracic Surgery, University Hospital of Liege, Liege, Belgium, [4.]UMR1148 INSERM and University Paris Diderot Paris, France.

On behalf of the Cardiolinc™ network (www.cardiolinc.org).

Running title: MicroRNA-574-5p: A Marker of Aortic Aneurysm

Address correspondence to Yvan Devaux, Cardiovascular Research Unit, Luxembourg Institute of Health, 1A-B rue Edison, L-1445 Strassen, Luxembourg. Tel: +352 26970300. Fax: +352 26970396.
Email: yvan.devaux@lih.lu

Key Words: circulating microRNAs, thoracic aortic aneurysm, biomarker

Subject code: Aneurysm
Word count: 8448
Number of figures: 6
Number of supplementary figures: 3

Number of tables: 3
Number of supplementary tables: 4

TOC category: Translational
TOC subcategory: Vascular Biology

Abstract

Thoracic aortic aneurysm (TAA), or enlargement of the aorta above the heart can be associated with fatal complications such as aortic dissection. Noninvasive imaging is the mainstay of clinical surveillance, however aneurysm dimension only poorly predicts dissection risk. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs which may be useful for diagnosis or risk prediction in cardiovascular disease.

Objective

Identify miRNAs associated with TAA pathogenesis and with the potential to improve TAA diagnosis.

Approach and Results

In this case-control study, miRNA microarray experiments of aortic media tissue samples from 19 TAA patients and 19 controls allowed to identify 232 differentially expressed miRNAs. Using interaction networks between these miRNAs and 690 genes known to be associated with TAA, we identified miR-574-5p as a potential contributor of TAA pathogenesis. In microarray assays, miR-574-5p was down-regulated in TAA tissue compared to controls (adjusted p=2.79E-06). This difference was confirmed by quantitative PCR ($p<0.001$). Interestingly, miR-574-5p was up-regulated in serum samples from a separate group of 28 TAA patients compared to 20 controls (3-fold, $p<0.001$). Serum levels of miR-574-5p discriminated TAA patients from controls with an area under the receiver operating characteristic curve of 0.87, a specificity of 85% and a sensitivity of 78.6%. In the *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mouse model, miR-574-5p was down-regulated in aortic tissue compared to wild-type (0.87-fold, $p<0.05$), and up-regulated in plasma samples within plasma extracellular vesicles from *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice compared to wild-type mice (3-fold, $p<0.05$).

Conclusions

MiR-574-5p is associated with TAA pathogenesis and may help in diagnosing this life-threatening disease.

Abbreviations

EV: extracellular vesicle

Fbn1: Fibrillin 1

FISH: fluorescence in situ hybridization

MiRNA: microRNA

PBS: phosphate-buffered saline

TAA: thoracic aortic aneurysm

VSMC: vascular smooth muscle cell

Wt: wild-type

I. Introduction

Thoracic aortic aneurysm (TAA) is a life-threatening disease with an incidence of approximately 10/100 000 population[1]. TAA is characterized by an asymptomatic enlargement of the thoracic aorta. Patients with TAA are at higher risk to develop severe aortic complications as intramural hematoma, dissection, or rupture of the aorta[2]. To prevent such complications, patients require regular follow-up and sometimes prophylactic aortic surgery[3]. TAA is a silent disease often fortuitously diagnosed through medical imaging tests prescribed in the context of another disease or during routine cardiovascular exams, thus novel targeted diagnostic tools are needed to identify high-risk patients who will benefit from tailored healthcare[4].

TAAs have different etiologies. Whereas monogenic etiologies are often observed in young patients[5] as for instance Marfan syndrome caused by mutation of *FBN1* gene coding for fibrillin-1 (fbn1)[6] or Loeys-Dietz syndrome, due to mutations in TGF-β related genes such as *TGFBR1* or *TGFBR2* amongst others. Older patients may show a degenerative form of aneurysm and the presence of a bicuspid aortic valve also promotes TAA[7]. Regardless of the etiology, similar histological features are observed in the aneurysmal aortic wall: disorganization of extracellular matrix[8] and loss and phenotypic modification of vascular smooth muscle cells (VSMCs)[9,10]. In TAA, VSMCs are subject to a phenotypic switch, from contractile to secretory phenotype characterized by an increase of their secretory, migratory and proliferation capacities, and a decreased contractility[11,12]. Although numerous gene alterations have been identified to induce or foster TAA formation in monogenic etiology, no pathogenic variant was identified for 70% of patients with a familial form of TAA[13]. To decipher TAA mechanisms, several animal models were developed, harboring mutations responsible for familial or syndromic forms of TAA, such as the *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice model that mimics Marfan syndrome[14]. However, the high number of genes involved and the numerous mechanisms thought to be involved in TAA formation and progression support the complexity of this disease, which is yet to be fully understood[15].

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules, between 18 and 22 nucleotides of length. Through their seed sequence, miRNAs bind to the 3' untranslated region of target messenger RNAs, thereby inhibiting their translation into proteins[16]. A single miRNA can target several messenger RNAs, and miRNAs are considered as post-transcriptional regulators that are able to actively participate in physiological and pathological processes[17]. In the context of TAA, expression profiles of miRNAs are altered in the aortic media of patients[18-20] and in aorta from *Fbn1*$^{C1039G/+}$

mice[21], suggesting a possible involvement in TAA pathogenesis. MiRNAs are also implicated in specific features of TAA. For instance, miR-143 and miR-145 induce VSMC differentiation towards a muscular phenotype[22]. In addition, miR-29 family promotes VSMC migration[23] and represses the expression of extracellular matrix proteins such as fbn1[24].

MiRNAs have also been shown to be present in the blood (termed circulating or extracellular miRNAs), are relatively stable and easily accessible, thereby conferring potential as diagnostic or prognostic biomarkers. The presence of miRNAs in the blood can be attributed either to a passive leakage from damaged cells or to active secretion[25]. In the latter case, miRNAs are associated with RNA-binding proteins[26], high-density lipoproteins[27]; or are encapsulated in extracellular vesicles (EVs)[28]. The association between circulating miRNAs and acute aortic dissection has recently been reported[29]. Furthermore, signatures of circulating miRNAs have been identified in bicuspid aortic valve disease[30]. These reports support the use of circulating miRNAs as diagnostic biomarkers of TAA, a possibility that we addressed in the present study using both tissue and liquid biopsies from TAA patients and *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice.

II. Materials and Methods

Microarray data have been made publicly available at the Gene Expression Omnibus under the accession number GSE110527 and can be accessed at https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi. Other data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Following a case-control design, we used two different cohorts of patients, a "tissue cohort" and a "serum cohort".

1. Human aortic tissue samples – "tissue cohort"

Aortic tissues samples were obtained from a patient cohort conducted at Bichat Hospital in Paris, France, within the Cardiovascular Biobank, BRIF: BB-0033-00029 identification number[31]. The clinical research protocol was approved by the local Ethics Committee (CPP 05 04 32, April 2005; updated in March 2008). Aneurysmal ascending aortic specimens were collected during aortic surgery which allowed a visual assessment of the presence of TAA in the ascending aorta, from 2006 onwards. Normal ascending aortas were obtained from deceased organ transplant donors with the authorization of the French Biomedicine Agency (PFS09-007) and in accordance with the Declaration of Helsinki, recovered from 2006 onwards. Deceased organ transplant donors were used as controls after verification of the absence of TAA by observation of the aorta during organ recovery. Aneurysmal tissues were sampled in the outer curvature, the most dilated part of the ascending aorta. Aortic tissue preparation consisted of an immediate dissection to separate medial and adventitial layers followed by freezing. This methodology allowed us to focus on VSMCs only present in the aortic media. All protocols were performed in accordance with the principle of the Declaration of Helsinki and informed consents were obtained from all patients. Recovery of patient information was performed at the time of sampling or retrospectively from the hospital in charge of the patient. Of this patient cohort, 20 patients with TAA were randomly selected, and were matched by age and gender with 20 healthy controls to be used in the present study.

2. Human serum samples – "serum cohort"

Blood samples were collected in dry tubes with gel from 32 TAA patients treated at the University Hospital of Liège from September 2009 to November 2015, and from 20 healthy individuals. Serum was separated by centrifugation for 10 min at 3000g within 30 min after blood collection. The protocol was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Liège. The participants gave written informed consent. TAA diagnosis was validated by the measurement of

the aortic diameter at the aneurysm site using positron emission tomography–computed tomography. Controls did not have TAA as certified by echocardiography or scanner. Recovery of patient information was performed at the time of sampling or retrospectively from the hospital in charge of the patient. Among the 32 TAA patients, 2 were excluded because of a TAA in the descending aorta, and 2 were excluded because of incomplete patient information.

3. Mice

All mice were cared for under strict compliance with the Partners Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC), regulated by the United States Public Health Service (USPHS) and the United States Department of Agriculture (USDA). Marfan (*Fbn1*$^{C1039G/+}$) mice were acquired from Jackson laboratories (B6.129-Fbn1tm1Hcd/J, #01885), please see the Major Resources Table in the Supplemental Material.

For tissue analysis, animals were euthanized through inhalational isoflurane (Sigma, St, Louis, USA) prior to tissue collection. All tissue experiments were performed after sacrifice at 6 months. For ultrasounds, please see Supplemental Material.

Dissected tissue was prepared for histology and staining as reported previously by Lino Cardenas et al.[32,33]. Peripheral blood was collected from Wt and *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice. Samples were centrifuged at 1500 × g for 15 min to separate the plasma, and were frozen at -80°C until RNA extraction.

4. Plasma collection and isolation of intact EVs

Plasma samples were obtained from peripheral blood of Wt and *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice as described above, isolation of intact EVs is indicated in Supplemental Material[34].

5. Numbers and size distribution of EVs by Nanoparticle Tracking Analysis

To measure the concentration and size distribution of isolated EVs we used a NanoSight LM10 system (Malvern Panalytical, Malvern, UK). In brief, we diluted EV samples 1:20 with filtered (0.22μm) 1x PBS to achieve the instrument's optimal particles per frame range. At the end of each measurement, the pump was washed several times with filtered 1x PBS to avoid cross-sample contamination. The camera settings were adjusted per the manufacturer's instructions, samples were recorded in 3 repeats of 20 seconds, and data were analyzed using the NanoSight NTA 2.3 software.

6. Primary VSMCs isolation and culture

Mouse aortic SMCs were isolated by standard explant of the ascending section of the aortas from Wt or *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice as previously described [33], please see added information in the Major

Resources Table in the Supplemental Material. Briefly, SMC identity was assessed by immunofluorescence staining of contractile markers, including SM22α, calponin-1, smoothelin, and vinculin. In order to preserve cell identity, all experiments were carried out at passages 1–5. Murine SMCs were grown with SMC growth medium from Cell Applications Inc., San Diego, USA (catalog 311-500).

7. RNA extraction

For human aortic tissues samples, RNA extraction was performed with mirVana isolation kit (Life Technologies, Carlsbad, USA). MiRNeasy serum/plasma kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used for human serum and murine plasma samples, and for mice aortic and EVs samples, RNA extraction was done using miRNeasy kit (Qiagen). For detailed procedure, please see Supplemental Material.

8. Microarrays

Agilent G3 Human miRNA microarrays containing 5893 probes corresponding to 2549 miRNAs from miRBase release 21 were used, with the miRNA complete labeling and hybridization kit (Agilent, Santa Clara, USA), according to manufacturer' recommendations. Please see Supplemental Material for further details[35],[36].

9. Bioinformatics analyses

To identify genes known to be associated with TAA pathogenesis, we used the following keywords in the NCBI gene database: (Thoracic AND aortic AND aneurysm) OR (Destructive AND "extracellular matrix" AND remodeling AND aorta) OR (Elastin AND fragmentation AND aorta AND media) OR (("Vascular smooth muscle cells" OR "Vascular smooth muscle cell") AND (proliferation OR secretion OR migration OR apoptosis)) OR ("Extracellular matrix" AND (homeostasis OR structure)) OR (Inflammation AND "extracellular matrix" AND aorta AND media) OR (Elastogenesis AND aorta AND media) OR (Aorta AND vasculogenesis). The following 12 genes known to be involved in monogenic TAA or dissection were also selected: *FBN1; EFEMP2; COL3A1; TGFBR1; TGFBR2; SLC2A10; NOTCH1; JAG1; SMAD3; ACTA2; MYH11; FLNA* [15]. Predicted interactions between differentially expressed miRNAs and TAA-associated genes were obtained using targetScan[37], miRDB[38] and DIANA microT-CDS[39]. Protein-protein interactions between TAA-associated genes were obtained from IntAct database[40]. The interaction network of miRNAs and genes was generated using Polar Mapper[41]. Enriched biological processes and pathways were analyzed with DAVID, the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery[42].

10. Reverse transcription and quantitative PCR

Human aortic tissues and serum samples, as well as murine plasma samples were reverse-transcribed using miScript II reverse transcription kit (Qiagen) according to provider instructions. PCR were run on the CFX96 thermocycler (Bio-Rad, Hercules, USA) with the miScript SYBR Green PCR system (Qiagen). Please see Supplemental Material for further details.

For mice aortic tissues and EVs, miRNA cDNA synthesis was prepared using the TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermofisher scientific, Waltham, USA) following the manufacturer's protocol (see further details in Supplemental Material).

11. Sequential fluorescence in situ hybridization (FISH) and immunofluorescence microscopy.

miRCURY-FISH Probe recognizing murine miR-574-5p (YD00616643-BED) labeled with 5'-FAM and 3'-FAM (Qiagen) was hybridized to tissue samples at 65°C for 4hours, followed by incubation with F-actin conjugated antibody (ActinGreen™ 488 ReadyProbes, ThermoFisher Scientific), and with CD63 antibody (BD biosciences, Franklin Lakes, USA), please see complementary information in the Major Resources Table in the Supplemental Material. Two-dimensional and white light images were analyzed and quantified using ImageJ software.

12. Statistical analyses

Results are presented as median ± standard deviation. SigmaPlot version 12.5 was used to perform the statistical analyses. The Shapiro-Wilk normality test preceded all analyses. t-test and Mann–Whitney test were used to compare two groups of continuous variables following Gaussian and non-Gaussian distributions, respectively. Chi-square and Fisher Exact Test were used for of qualitative variables. Correlations between 2 variables were assessed using the Spearman test. The association between miR-574-5p and TAA in the serum cohort was evaluated using ROC (receiver operating characteristic) curve analysis.

III. Results

1. Study design

The design of this study is presented in Supplementary Figure I and is divided in two major axes. The first axis aims to discover miRNA candidates and to evaluate their biomarker ability in human samples. The second axis proposes a functional characterization in *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice model.

2. Patient characteristics

The "tissue" and "serum" cohorts were composed of TAA patients and controls without aortic aneurysm. Characteristics of these two cohorts are reported in Tables 1 and 2. In the tissue cohort, the TAA group and the control group were comparable in terms of age and gender. Among TAA patients, 2 had an aortic dissection, 9 had a bicuspid aortic valve, 2 had Marfan syndrome, 2 had degenerative disease and none had Ehler-Danlos syndrome. In the serum cohort, controls were older than TAA patients. 3 TAA patients had an aortic dissection, 6 had a bicuspid aortic valve, 1 had Ehler-Danlos syndrome (type IV) and none had Marfan syndrome or degenerative disease. There was more patients with hyperlipidemia and more current and former smokers in TAA group than in control group. Medications were not significantly different between controls and TAA patients.

3. MiRNA expression profiles in human aortic media

Total RNA was extracted from aortic media of 19 TAA patients and 19 controls of the tissue cohort and was hybridized onto miRNA microarrays. 473 miRNAs were detected in at least half samples and had expression levels above the expression of negative controls. Principal component analysis showed that aneurysm and control groups could be almost completely separated by miRNAs expression profiles (Figure 1A).We identified 232 differentially expressed miRNAs with an adjusted q-value < 0.05, a log2-transformed fold change > 0.5 or < -0.5, and a relative expression level > 5. As shown in Figure 1B-C, 162 miRNAs were found to be up-regulated and 70 were downregulated in aneurysmal tissues compared to non-aneurysmal tissues.

4. Candidate miRNA selection

To identify miRNAs with a potential functional role in TAA, we used a network-based approach (Figure 1D). First, literature search and NCBI Gene database allowed the identification of 690 genes presumably associated with TAA (Supplementary Table I). Second, we interrogated the targetScan, miRDB and DIANA microT-CDS databases to predict interactions between the 232 miRNAs identified as differentially expressed between control and TAA in aortic media using microarrays.

5510 interactions were predicted by at least 2 databases. Third, we interrogated the IntAct database and we identified 1072 protein-protein interactions between the 690 TAA-associated proteins. A network combining both the 5510 interactions between the 232 differentially expressed miRNAs and the 690 TAA-associated genes, and the 1072 interactions between the 690 TAA-associated proteins, is displayed in Supplementary Figure II. The network was divided into 8 modules according to the density of links between miRNAs and genes. Biological processes enriched by genes of each module are presented in Supplementary Table II, to the exception of modules 2 and 8 which included only 4 and 3 genes respectively. Interestingly, module 6 was enriched by biological processes related to vessel biology such as vasculature development and blood vessel morphogenesis. Module 6 included 49 miRNAs. Traffic score of each miRNA, shown in Supplementary Table III attests for its betweenness centrality. A high score indicates a high level of interaction with genes. Among the 10 miRNAs with the highest traffic scores in module 6, miR-574-5p was the most differentially expressed between aneurysmal and non-aneurysmal tissue in microarray analysis (adjusted p-value 2.79E-06; Table 3). We therefore focused on miR-574-5p in subsequent analyses.

To gain insights into the potential role of miR-574-5p in TAA pathogenesis, we searched among the 690 genes previously identified as associated with TAA, which ones were predicted to be targeted by miR-574-5p. 79 genes satisfied this criteria (Supplementary Table IV). We then investigated the biological processes enriched by these 79 genes. The top 5 most significant and non-redundant biological processes were: regulation of phosphorus metabolic process, positive regulation of cell motion, positive regulation of macromolecule metabolic process, regulation of smooth muscle cell proliferation and positive regulation of cell proliferation. These 5 biological processes were enriched by 33 of the 79 genes targeted by miR-574-5p. A network illustrating these interactions is shown in Figure 1E.

5. MiR-574-5p expression in the human tissue cohort

Figure 2A displays the pattern of expression of miR-574-5p in aneurysmal and non-aneurysmal aortic tissues assessed by microarrays. MiR-574-5p was significantly downregulated in the aneurysmal group. This result was confirmed using quantitative PCR (Figure 2B). Expression levels of SMAD2 and SMAD4, genes identified as predicted target of miR-574-5p (Supplementary Table IV) were also measured in aneurysmal and healthy aortic tissues using quantitative PCR (Figure 2C-D). SMAD4 was significantly up-regulated in the aneurysmal group.

6. MiR-574-5p expression in the human serum cohort

To address a potential diagnostic value of miR-574-5p, we measured its expression in serum samples from TAA patients and controls (serum cohort). Interestingly, miR-574-5p was significantly up-regulated in the serum of patients with TAA compared to control (3-fold, $p<0.001$; Figure 2E) and this up-regulation was higher in patients with a large (above 49mm) aneurysm (Figure 2F). Of note, the cut-off of 49 mm corresponds to the median of the aortic diameter of the TAA group. ROC (receiver operating characteristic) curve analysis revealed an association between miR-574-5p and the diagnostic of TAA with an area under the curve of 0.87 (Figure EG). MiR-574-5p discriminated TAA patients from controls with a specificity of 85% and a sensitivity of 78.6%. These data support a diagnostic potential of miR-574-5p for TAA.

7. MiR-574-5p in *Fbn1*$^{C1039G/+}$ aortic tissues and EVs

To investigate miR-574-5p expression, we used the *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice model which is characterized by a mutation on the *Fbn1* gene [14]. Alteration of *Fbn1* gene was effective, since elastin disorganization was present in the aortic wall of *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice (Figure 3A). Using FISH in aortic wall, miR-574-5p was mainly localized in the nucleus of the cells, and was less expressed in aneurysmal than in normal aorta ($p=0.032$; Figure 3B and C). These data are consistent with our previous observations in human aortic tissue (Figure 3B).

To understand under which form miR-574-5p navigates in the blood flow, we studied EVs in the blood of Wt and *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice. There was approximatively 4-fold more EVs in plasma from *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice compared to normal mice ($p<0.001$; Figure 3D). Furthermore, miR-574-5p was 3-fold increased in the cargo of EVs from plasma of *Fbn1*$^{C1039G/+}$ than from Wt mice ($p<0.01$; Figure 3E).

8. MiR-574-5p expression in murine organs

The global expression of miR-574-5p was examined using FISH in several organs from Wt and *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice. Levels of miR-574-5p were low in lung, and were high in kidney (Figure 4). As previously observed in aortic tissue, miR-574-5p was localized in the nucleus. MiR-574-5p appears to be slightly less expressed in heart, lung and liver from *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice than from Wt mice (non -significant; Figure 4B). Conversely, miR-574-5p was highly expressed in *Fbn1*$^{C1039G/+}$ kidney compared to normal kidney (1.4 fold; $p=0.02$; Figure 4B).

9. MiR-574-5p in EVs and VSMCs

In cultured primary VSMCs isolated from Wt mice, miR-574-5p was solely expressed in the nucleus and the CD-63 positive extracellular staining consistent with EV-staining was only detected at low levels (Figure 5, upper panel). After treatment with EVs isolated from the plasma of Wt mice, miR-574-5p was detected both in the nucleus and in the cytoplasm of VSMCs and several CD-63-positive EVs appeared (Figure 5, middle panel). VSMCs treated with EVs from *Fbn1*$^{C1039G/+}$ showed higher levels of miR-574-5p (nuclear and cytoplasmic) and increased EVs formation compared to VSMCs treated with EVs from Wt mice (Figure 5, lower panel). Furthermore, in this condition, miR-574-5p staining co-localized with several EVs (yellow staining, Figure 5, lower panel). These results suggest that intercellular communication mediated by EVs from aneurysmal syndromes may both stimulate cytoplasmic translocation of miR-574-5p and possibly mediate their packaging and excretion in EVs. It is also possible that miR-574-5p may be directly transferred to VSMCs from the EVS obtained from the *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice (where extracellular miR-574-5p is increased).

10. MiR-574-5p expression in mice plasma

MiR-574-5p expression was measured in plasma from 6 Wt and 10 *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice. Aortic size of these mice was checked using ultrasounds (Supplementary Figure III). MiR-574-5p was over-expressed in the plasma of *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice versus Wt (3-fold; $p<0.05$; Figure 6A). Furthermore, miR-574-5p expression was positively correlated with the diameter of the different segment of the aorta, respectively, the aortic valve, the aortic root, the sinotubular junction and the ascendant aorta (Figure 6B-E). Levels of miR-574-5p were not correlated with the weight of the mice (Figure 6F).

IV. Discussion

In this study, we sought to address the potential of miRNAs as biomarkers of TAA. We used two independent cohorts of TAA patients and controls, a first one to study miRNAs in aortic tissue and a second to study miRNAs in serum samples. Using microarrays, we confirmed that miRNA expression profiles are altered in aneurysmal compared to normal aortic tissue. A network-based approach incited us to focus our attention on a particular miRNA, miR-574-5p. Bioinformatics analyses supported a role for miR-574-5p in TAA pathogenesis. Serum levels of miR-574-5p were able to discriminate TAA patients from controls, supporting the potential of this miRNA to be used as diagnostic biomarker of TAA. Then, we investigated miR-574-5p in the Marfan *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice model. We noticed that miR-574-5p expression levels were lower in aortic tissue from *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice compared to Wt mice, while plasma levels of miR-574-5p were higher in *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice compared to Wt mice. Additionally, plasma levels of miR-574-5p were correlated with the size of the thoracic aorta. In vitro, VSMCs treated with EVs obtained from the plasma of *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice led to higher cellular (particularly cytoplasmic) levels of miR-574-5p, where it may be able to better affect silencing of its messenger RNAs targets.

The reported incidence of TAA is probably under-estimated because of the silent evolution of the disease[4]. The real burden of the disease appears difficult to quantify for the same reasons. However, TAA is a life-threatening disease, responsible for high-risk of severe thoracic aortic complications occurrence[43]. Indeed, patients with a thoracic aortic diameter above 4.5 cm have a more than 6000-fold higher risk of aortic dissection compared to patients with small aortas (< 3.4 cm of diameter)[44]. Appropriate aortic management with a close follow-up of the aneurysm size evolution, appropriate medication and prophylactic surgery when needed all contribute to prevent the occurrence of such devastating aortic complications[43]. Prophylactic surgical intervention is currently performed only when the risk of aortic dissection exceeds the presumed operative risk. However many aortic dissections occur at aortic diameters below these thresholds[45], arguing that we currently need additional ways to stratify the risk of aortic dissection beyond simply measuring aortic diameter. Circulating biomarkers, including miRNAs, may have the potential to inform the risk of aortic dissection. A study reported a specific signature of circulating miRNAs in bicuspid aortic valve disease[30]. Interestingly, in this study, plasma levels of miR-718 were correlated with aortic dilation, however the prediction value and the cellular origin of miR-718 have not been reported.

The approach used in the present study to isolate disease-associated miRNAs has previously shown effectiveness in other pathological contexts[46]. We combined both high-throughput profiling of miRNAs expression with protein-gene-miRNAs interaction networks. This approach is more prone to highlight miRNAs functionally associated with the disease as compared to the one-step differential expression analysis. This is critical from a biomarker prospective when we aim to identify targets functionally associated with the disease and not only mere bystanders. Dysregulated miRNAs which contribute to disease development and progression may not only be used as biomarkers but may also constitute potential therapeutic targets. Although we report an association between miR-574-5p and the diagnosis of TAA, addressing the therapeutic value of this miRNA for aortic aneurysm is beyond the scope of this study.

Bioinformatics tools based on predicted gene targets of miR-574-5p and biological pathways enriched by these genes suggested that this miRNA might be involved in the "regulation of smooth muscle cell proliferation", "positive regulation of cellular proliferation" and "positive regulation of cell motion". These predictions are consistent with the increased proliferation and migration of VSMCs characterizing their phenotypic switch from muscular toward a secretory state[11] which has been observed in aortic aneurysmal media[12]. Also consistent with a role of miR-574-5p in VSMC phenotypic switch was the finding that it decreased apoptosis and promoted the proliferation of VSMC from patients with coronary artery disease[47]. Furthermore, VSMCs receiving EVs from mice with aortic aneurysm displayed an increased expression of miR-574-5p and newly formed EVs. To our knowledge, production of EVs by VSMCs has not been documented in aneurysmal context. However, in vascular calcification process, VSMCs undergo phenotypic changes from a synthetic state toward a chondrogenic state, accompanied by a release of EVs[48]. All together, these data support a role for miR-574-5p in aortic aneurysm formation.

From our network analysis, we observed that miR-574-5p was linked to SMAD2 and SMAD4, i.e. that miR-574-5p was predicted to down-regulate the expression of these 2 genes, which encode for two transcriptions factors involved in TGF-β pathway, well-known to be involved in TAA pathogenesis[49,50]. A recently found variant of SMAD4 gene increased the risk of TAA and dissection through enhanced VSMCs apoptosis and proteoglycan degradation[51]. Both the activation and increased expression of SMAD2 and SMAD4 are associated with aortic aneurysm remodeling, and may also participate to VSMCs phenotypic switch[51,52]. Furthermore, SMAD4 deficiency in VSMCs induces an increased elastase degradation and triggers aneurysm formation[53]. By regulating

SMAD4 expression, miR-574-5p could thus participate to VSMCs phenotypic switch and to extracellular matrix degradation observed in TAA.

Expression levels of miR-574-5p were inversely regulated between aortic tissue and serum samples, a down-regulation being observed in aneurysmal aortic media compared to non-aneurysmal tissue, while serum levels of miR-574-5p were up-regulated in TAA patients. This expression pattern was also observed in *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice, despite this model only mimics Marfan syndrome whereas patients had various etiologies, suggesting a high implication of miR-574-5p in TAA pathogenesis. Interestingly, circulating levels of miR-574-5p were correlated with the aortic diameter of *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice, although they were not associated with the severity of the disease in patients. This discrepancy may be explained by the heterogeneity of etiologies in patients while the *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mouse model represents only one etiology.

MiR-574-5p was found to be expressed in plasma and EVs from *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice. This observation suggests that circulating miR-574-5p is, at least in part, transported in EVs in an aneurysmal context. The presence of miR-574-5p in EVs documents an energy-dependant, selective and active secretion in blood flow[25] by "donor" cells or tissue, toward targeted "recipient" cells or tissue. Several studies showed that miRNAs encapsulated in EVs can modify gene expression in target cells[54,55]. Especially, VSMCs phenotype can be modulated by exosomal-miRNAs (such as miR-143/145[56] or miR-206[57]) secreted by endothelial cells. These data support a "paracrine" role for miR-574-5p in TAA pathogenesis.

We have not determined the cellular origin of circulating miR-574-5p, nor provided evidence for its "recipient" cells or tissue. In *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice, miR-574-5p appears to be modulated in several organs, and is highly up-regulated in kidneys. Kidneys are highly sensitive to blood pressure modulations and especially hypertension[58]. It has been reported that patients with TAA were more likely to have renal disease than healthy people[59]. TAA causes hemodynamic modifications in circulating apparatus[60], that irrigates other organs. We hypothesize that miR-574-5p may be up-regulated in kidneys of *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice in response to blood flow pressure alterations. However, even if kidney disease is not described in Marfan syndrome and even if renal structure is similar between Wt and *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice, we cannot exclude that the alteration of miR-574-5p expression in kidney is not a consequence of fbn1 mutation.

On the other hand, circulating levels of miR-574-5p were also up-regulated in patients with coronary artery disease, and miR-574-5p stimulated the growth of VSMCs obtained from these patients[47]. It

would be conceivable that up-regulated circulating levels of miR-574-5p in TAA patients would originate from diseased coronary arteries. However, of the 28 TAA patients in our serum cohort, none had a reported coronary artery disease. Therefore, the up-regulation of circulating levels of miR-574-5p in TAA patients appears to be independent from existing coronary artery disease and could be specific to TAA diagnosis.

In future studies, miR-574-5p quantification may help improve risk stratification for aortic dissection in TAA patients, presuming that the diagnostic value of miR-574-5p can be confirmed in independent and large patient cohorts. Further investigation of the origin and functional role of circulating miR-574-5p in TAA pathogenesis may improve our understanding of this complex disease.

This study has several limitations. 1) The number of participants in the different cohorts and groups is low and TAA patients were younger than controls in the serum cohort. 2) The association between miR-574-5p and TAA was not validated in an independent and properly size cohort. 3) A functional association between miR-574-5p and TAA pathogenesis is strongly suggested by bioinformatics analysis and its secretion in EVs, but this association should be further studied. 4) This study focused on one miRNA and the possibility that other miRNAs may also be associated with TAA cannot be excluded.

We identified an association between miR-574-5p and TAA and we propose that this miRNAs may be considered as a potential biomarker to diagnose TAA. We also propose that miR-574-5p may act as a paracrine mediator in TAA pathogenesis. Further studies are warranted to confirm these concepts.

Acknowledgements

Acknowledgments

We would like to thank Catherine Deschildre and the surgeons of the different cardiac and vascular surgery departments for providing us with aortic and serum samples.

Sources of funding

A.B. is funded by the National Research Fund of Luxembourg (grant # AFR 8832104). C.L.L is supported by the Fredman Fellowship, the Toomey Fund for Aortic Dissection Research, and the Hassenfeld Fellowship. A.C. is funded by the Aneurysmal Pathology Foundation. M.E.L. is supported by the National Institutes of Health (grant #HL130113) and the Toomey Fund for Aortic Dissection Research. Y.D. is supported by the National Research Fund and the Ministry of Higher Education and Research of Luxembourg. R.S.R and S.D are supported by the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) grant RO1-HL22547. S.N. is supported by the "Fonds pour la chirurgie cardiaque, ASBL", by the European Program FP7 "Fighting aneurysmal diseases" no. 200647. J.B.M. is funded by INSERM and Agence Nationale pour la Recherche GDPMs, NONAGES, and EU FP7: Fighting Aneurysmal Diseases.

Disclosures

None.

References

1. Elefteriades JA, Sang A, Kuzmik G, Hornick M. Guilt by association: paradigm for detecting a silent killer (thoracic aortic aneurysm). *Open Heart.* 2015;21:e000169.

2. van Bogerijen GH, Tolenaar JL, Grassi V, Lomazzi C, Segreti S, Rampoldi V, Elefteriades JA, Trimarchi S. Biomarkers in TAA-the Holy Grail. *Prog Cardiovasc Dis.* 2013;561:109-115.

3. Erbel R, Aboyans V, Boileau C, et al. 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases: Document covering acute and chronic aortic diseases of the thoracic and abdominal aorta of the adult. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Aortic Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2014;3541:2873-2926.

4. Elefteriades JA, Ziganshin BA. Paradigm for Detecting Silent Thoracic Aneurysm Disease. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2016;284:776-782.

5. Vapnik JS, Kim JB, Isselbacher EM, Ghoshhajra BB, Cheng Y, Sundt TM, 3rd, MacGillivray TE, Cambria RP, Lindsay ME. Characteristics and Outcomes of Ascending Versus Descending Thoracic Aortic Aneurysms. *The American journal of cardiology.* 2016;11710:1683-1690.

6. Magenis RE, Maslen CL, Smith L, Allen L, Sakai LY. Localization of the fibrillin (FBN) gene to chromosome 15, band q21.1. *Genomics.* 1991;112:346-351.

7. Michelena HI, Della Corte A, Prakash SK, Milewicz DM, Evangelista A, Enriquez-Sarano M. Bicuspid aortic valve aortopathy in adults: Incidence, etiology, and clinical significance. *Int J Cardiol.* 2015;201:400-407.

8. de Figueiredo Borges L, Jaldin RG, Dias RR, Stolf NA, Michel JB, Gutierrez PS. Collagen is reduced and disrupted in human aneurysms and dissections of ascending aorta. *Hum Pathol.* 2008;393:437-443.

9. Cook JR, Carta L, Galatioto J, Ramirez F. Cardiovascular manifestations in Marfan syndrome and related diseases; multiple genes causing similar phenotypes. *Clin Genet.* 2015;871:11-20.

10. Michel JB, Jondeau G, Milewicz DM. From genetics to response to injury: vascular smooth muscle cells in aneurysms and dissections of the ascending aorta. *Cardiovasc Res.* 2018.

11. Rzucidlo EM, Martin KA, Powell RJ. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *Journal of vascular surgery.* 2007;45 Suppl A:A25-32.

12. Mao N, Gu T, Shi E, Zhang G, Yu L, Wang C. Phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in animal model of rat thoracic aortic aneurysm. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2015;211:62-70.

13. Milewicz DM, Regalado E. Heritable Thoracic Aortic Disease Overview. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews((R)).* Seattle (WA)1993.

14. Judge DP, Biery NJ, Keene DR, Geubtner J, Myers L, Huso DL, Sakai LY, Dietz HC. Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *J Clin Invest.* 2004;1142:172-181.

15. Lindsay ME, Dietz HC. Lessons on the pathogenesis of aneurysm from heritable conditions. *Nature.* 2011;4737347:308-316.

16. Goretti E, Wagner DR, Devaux Y. miRNAs as biomarkers of myocardial infarction: a step forward towards personalized medicine? *Trends Mol Med.* 2014;2012:716-725.

17. Beermann J, Piccoli MT, Viereck J, Thum T. Non-coding RNAs in Development and Disease: Background, Mechanisms, and Therapeutic Approaches. *Physiol Rev.* 2016;964:1297-1325.

18. Patuzzo C, Pasquali A, Malerba G, Trabetti E, Pignatti P, Tessari M, Faggian G. A Preliminary microRNA Analysis of Non Syndromic Thoracic Aortic Aneurysms. *Balkan journal of medical genetics : BJMG.* 2012;15Suppl:51-55.

19. Jones JA, Stroud RE, O'Quinn EC, Black LE, Barth JL, Elefteriades JA, Bavaria JE, Gorman JH, 3rd, Gorman RC, Spinale FG, Ikonomidis JS. Selective microRNA suppression in human thoracic aneurysms: relationship of miR-29a to aortic size and proteolytic induction. *Circulation Cardiovascular genetics.* 2011;46:605-613.

20. Venkatesh P, Phillippi J, Chukkapalli S, Rivera-Kweh M, Velsko I, Gleason T, VanRyzin P, Aalaei-Andabili SH, Ghanta RK, Beaver T, Chan EKL, Kesavalu L. Aneurysm-Specific miR-221 and miR-146a Participates in Human Thoracic and Abdominal Aortic Aneurysms. *International journal of molecular sciences.* 2017;184.

21. Merk DR, Chin JT, Dake BA, Maegdefessel L, Miller MO, Kimura N, Tsao PS, Iosef C, Berry GJ, Mohr FW, Spin JM, Alvira CM, Robbins RC, Fischbein MP. miR-29b participates

in early aneurysm development in Marfan syndrome. *Circulation research.* 2012;1102:312-324.

22. Cheng Y, Liu X, Yang J, Lin Y, Xu DZ, Lu Q, Deitch EA, Huo Y, Delphin ES, Zhang C. MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. *Circulation research.* 2009;1052:158-166.

23. Chen KC, Wang YS, Hu CY, Chang WC, Liao YC, Dai CY, Juo SH. OxLDL up-regulates microRNA-29b, leading to epigenetic modifications of MMP-2/MMP-9 genes: a novel mechanism for cardiovascular diseases. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2011;255:1718-1728.

24. van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008;10535:13027-13032.

25. Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol.* 2012;223:125-132.

26. Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic acids research.* 2010;3820:7248-7259.

27. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology.* 2011;134:423-433.

28. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology.* 2007;96:654-659.

29. Xu Z, Wang Q, Pan J, Sheng X, Hou D, Chong H, Wei Z, Zheng S, Xue Y, Zhou Q, Cao H, Zhang CY, Wang D, Jiang X. Characterization of serum miRNAs as molecular biomarkers for acute Stanford type A aortic dissection diagnosis. *Sci Rep.* 2017;71:13659.

30. Martinez-Micaelo N, Beltran-Debon R, Baiges I, Faiges M, Alegret JM. Specific circulating microRNA signature of bicuspid aortic valve disease. *J Transl Med.* 2017;151:76.

31. BRIF BB-0033-00029; Thoracic Aneurysm Aorta (TAA); BBMRI-EU/infrastructure BIOBANQUE; No Access: 38, Last: January 2,2013.[BIORESOURCE].

32. Lino Cardenas CL, Kessinger CW, Cheng Y, et al. An HDAC9-MALAT1-BRG1 complex mediates smooth muscle dysfunction in thoracic aortic aneurysm. *Nat Commun.* 2018;91:1009.

33. Lino Cardenas CL, Kessinger CW, MacDonald C, Jassar AS, Isselbacher EM, Jaffer FA, Lindsay ME. Inhibition of the methyltranferase EZH2 improves aortic performance in experimental thoracic aortic aneurysm. *JCI Insight.* 2018;35.

34. Li K, Wong DK, Hong KY, Raffai RL. Cushioned-Density Gradient Ultracentrifugation (C-DGUC): A Refined and High Performance Method for the Isolation, Characterization, and Use of Exosomes. *Methods Mol Biol.* 2018;1740:69-83.

35. de Hoon MJ, Imoto S, Nolan J, Miyano S. Open source clustering software. *Bioinformatics.* 2004;209:1453-1454.

36. Saldanha AJ. Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics.* 2004;2017:3246-3248.

37. Garcia DM, Baek D, Shin C, Bell GW, Grimson A, Bartel DP. Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of lsy-6 and other microRNAs. *Nature structural & molecular biology.* 2011;1810:1139-1146.

38. Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic acids research.* 2015;43Database issue:D146-152.

39. Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Kostoulas N, Vlachos IS, Vergoulis T, Reczko M, Filippidis C, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG. DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic acids research.* 2013;41Web Server issue:W169-173.

40. Orchard S, Ammari M, Aranda B, et al. The MIntAct project--IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction databases. *Nucleic acids research.* 2014;42Database issue:D358-363.

41. Goncalves JP, Graos M, Valente AX. POLAR MAPPER: a computational tool for integrated visualization of protein interaction networks and mRNA expression data. *J R Soc Interface.* 2009;639:881-896.

42. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;41:44-57.

43. Davies RR, Goldstein LJ, Coady MA, Tittle SL, Rizzo JA, Kopf GS, Elefteriades JA. Yearly rupture or dissection rates for thoracic aortic aneurysms: simple prediction based on size. *Ann Thorac Surg.* 2002;731:17-27; discussion 27-18.

44. Elefteriades JA, Ziganshin BA. Gratitude to the International Registry of Acute Aortic Dissection From the Aortic Community. *Journal of the American College of Cardiology.* 2015;664:359-362.

45. Tolenaar JL, Froehlich W, Jonker FH, et al. Predicting in-hospital mortality in acute type B aortic dissection: evidence from International Registry of Acute Aortic Dissection. *Circulation.* 2014;13011 Suppl 1:S45-50.

46. Devaux Y, Vausort M, McCann GP, Zangrando J, Kelly D, Razvi N, Zhang L, Ng LL, Wagner DR, Squire IB. MicroRNA-150: a novel marker of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Circulation Cardiovascular genetics.* 2013;63:290-298.

47. Lai Z, Lin P, Weng X, Su J, Chen Y, He Y, Wu G, Wang J, Yu Y, Zhang L. MicroRNA-574-5p promotes cell growth of vascular smooth muscle cells in the progression of coronary artery disease. *Biomed Pharmacother.* 2018;97:162-167.

48. Kapustin AN, Chatrou ML, Drozdov I, et al. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circulation research.* 2015;1168:1312-1323.

49. Dietz HC. TGF-beta in the pathogenesis and prevention of disease: a matter of aneurysmic proportions. *J Clin Invest.* 2010;1202:403-407.

50. Daugherty A, Chen Z, Sawada H, Rateri DL, Sheppard MB. Transforming Growth Factor-beta in Thoracic Aortic Aneurysms: Good, Bad, or Irrelevant? *J Am Heart Assoc.* 2017;61.

51. Wang Y, Huang HY, Bian GL, Yu YS, Ye WX, Hua F, Chen YH, Shen ZY. A Functional Variant of SMAD4 Enhances Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection Risk through Promoting Smooth Muscle Cell Apoptosis and Proteoglycan Degradation. *EBioMedicine.* 2017;21:197-205.

52. Gomez D, Kessler K, Borges LF, Richard B, Touat Z, Ollivier V, Mansilla S, Bouton MC, Alkoder S, Nataf P, Jandrot-Perrus M, Jondeau G, Vranckx R, Michel JB. Smad2-dependent protease nexin-1 overexpression differentiates chronic aneurysms from acute dissections of human ascending aorta. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2013;339:2222-2232.

53. Zhang P, Hou S, Chen J, Zhang J, Lin F, Ju R, Cheng X, Ma X, Song Y, Zhang Y, Zhu M, Du J, Lan Y, Yang X. Smad4 Deficiency in Smooth Muscle Cells Initiates the Formation of Aortic Aneurysm. *Circulation research.* 2016;1183:388-399.

54. Nguyen MA, Karunakaran D, Geoffrion M, Cheng HS, Tandoc K, Perisic Matic L, Hedin U, Maegdefessel L, Fish JE, Rayner KJ. Extracellular Vesicles Secreted by Atherogenic Macrophages Transfer MicroRNA to Inhibit Cell Migration. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2018;381:49-63.

55. Jansen F, Yang X, Hoelscher M, Cattelan A, Schmitz T, Proebsting S, Wenzel D, Vosen S, Franklin BS, Fleischmann BK, Nickenig G, Werner N. Endothelial microparticle-mediated transfer of MicroRNA-126 promotes vascular endothelial cell repair via SPRED1 and is abrogated in glucose-damaged endothelial microparticles. *Circulation.* 2013;12818:2026-2038.

56. Hergenreider E, Heydt S, Treguer K, Boettger T, Horrevoets AJ, Zeiher AM, Scheffer MP, Frangakis AS, Yin X, Mayr M, Braun T, Urbich C, Boon RA, Dimmeler S. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nature cell biology.* 2012;143:249-256.

57. Lin X, He Y, Hou X, Zhang Z, Wang R, Wu Q. Endothelial Cells Can Regulate Smooth Muscle Cells in Contractile Phenotype through the miR-206/ARF6&NCX1/Exosome Axis. *PloS one.* 2016;113:e0152959.

58. Sanai T, Kimura G. Renal function reserve and sodium sensitivity in essential hypertension. *J Lab Clin Med.* 1996;1281:89-97.

59. Karthikesalingam A, Bahia SS, Patterson BO, Peach G, Vidal-Diez A, Ray KK, Sharma R, Hinchliffe RJ, Holt PJ, Thompson MM. The shortfall in long-term survival of patients with repaired thoracic or abdominal aortic aneurysms: retrospective case-control analysis of hospital episode statistics. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery.* 2013;465:533-541.

60. Allen BD, Barker AJ, Kansal P, Collins JD, Carr JC, Malaisrie SC, Markl M. Impact of aneurysm repair on thoracic aorta hemodynamics. *Circulation.* 2013;12817:e341-343.

Highlights

- MiR-574-5p is downregulated in aneurysmal aortic tissue in human and *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice
- Circulating levels of miR-574-5p are increased in patients with thoracic aortic aneurysm and *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice
- MiR-574-5p levels are up-regulated in circulating extracellular vesicles from *Fbn1*$^{C1039G/+}$
- MiR-574-5p may be considered as a potential diagnostic biomarker of thoracic aortic aneurysm
- MiR-574-5p may act as a paracrine mediator in the pathogenesis of thoracic aortic aneurysm.

Tables

Table 1. Patient characteristics (tissue cohort).

	Control (n=19)	**TAA (n=19)**	**p-value (Control vs. TAA)**
Age, median (range)	56 (36-76)	57 (35-77)	0.96
Sex, male, n (%)	13 (74)	13 (74)	0.727
Aortic diameter in mm, median (range)	N/A	52 (33-64)	
Aortic dissection, n (%)	N/A	2 (10.5)	
Aortic aneurysm aetiology, n (%)			
Marfan	N/A	2 (10.5)	
Degenerative	N/A	2 (10.5)	
Bicuspid aortic valve	N/A	9 (47.3)	
Ehler-Danlos (type IV)	N/A	0 (0)	
Smoking status			
Never	N/A	1 (5.3)	
Stop	N/A	3 (15.8)	
Current	N/A	5 (26.3)	
Unknown	N/A	10 (52.6)	
Medication			
Aspirin	N/A	1 (5.3)	
Angiotensin II receptor blocker	N/A	3 (15.8)	
Statin	N/A	3 (15.8)	
Beta-blockers	N/A	4 (21.1)	
Inhibitors of conversion enzyme	N/A	2 (10.5)	
Unknown	N/A	11 (58)	

TAA : thoracic aortic aneurysm; N/A: not available.

Table 2. Patient characteristics (serum cohort).

	Control (n=20)	TAA (n=28)	p-value (Control vs. TAA)
Age, median (range)	75 (67-85)	61 (32-84)	<0.001
Sex, male, n (%)	16 (80)	21 (75)	0.741
Aortic diameter in mm, median (range)	N/A	48 (35-74)	
Aortic dissection , n (%)	N/A	3 (10.7)	
Aortic aneurysm aetiology, n (%)			

Marfan	N/A	0 (0)	
Degenerative	N/A	0 (0)	
Bicuspid aortic valve	N/A	6 (21.4)	
Ehler-Danlos (type IV)	N/A	1 (3.6)	
Hyperlipidemia, n (%)	4 (20)	15 (53.6)	0.041
Smoking status			0.036
Never	14 (70)	11 (39.3)	
Stop	6 (30)	8 (28.6)	
Current	0 (0)	8 (28.6)	
Unknown	0 (0)	1 (3.5)	
Medication			
Aspirin	9 (45)	13 (46.4)	0.845
Clopidrogrel	1 (5)	1 (3.6)	0.625
Statin	9 (45)	15 (53.6)	0.770
Beta-blockers	9 (45)	13 (46.4)	0.226
Angiotensin-converting enzyme inhibitors	4 (20)	2 (7.1)	0.218
None	4 (20)	5 (17.9)	0.851

TAA : thoracic aortic aneurysm; N/A: not available.

Table 3. Top-10 traffic miRNAs from module 6.

miRNA	Traffic	Fold change (log2)	Expression mean (control and TAA)	Adjusted p-value
miR-574-5p	**4288.79**	**-1.20**	**8.87**	**2.79E-06**
miR-874-3p	3827.13	0.75	7.19	1.48E-05
miR-128-3p	6186.65	1.75	7.24	4.40E-05
miR-342-3p	5387.52	1.14	8.73	4.88E-05
miR-149-5p	7160.61	0.86	5.15	1.02E-04
miR-193a-5p	3553.22	0.93	6.86	3.24E-04
miR-331-3p	4821.11	1.07	8.86	5.27E-04
miR-23a-3p	3418.90	0.57	13.78	8.41E-04
miR-24-3p	6353.67	0.55	13.29	1.01E-03
miR-34a-5p	3640.53	0.58	11.05	9.10E-03

Figure 1: MiRNA expression profiles in aortic tissues from the tissue cohort and miRNA-gene and protein-protein interaction network. **A-C**. Microarrays were conducted on RNA samples isolated from the aortic media of 19 TAA patients and 19 non-aneurysmal control donors. **A.** Principal component analysis showing the separation of TAA and control samples according to miRNA expression. **B.** M-A plot showing the distribution of miRNAs in TAA vs control samples. Log2 transformed-fold change is shown in the vertical axis and the average signal of each miRNA is shown in the horizontal axis **C.** Heat-map displaying modulated miRNAs between TAA and control samples. A log2-transformed fold change > 0.5 or < -0.5, a q-value <5% and a relative expression level > 5 were used as cut-offs. Red color corresponds to miRNAs up-regulated in TAA patients and green color corresponds to miRNAs down-regulated in TAA patients compared to controls. **D-E** MiRNA-gene and protein-protein interaction network. **D.** Procedure followed to create the interaction network. 690 TAA-associated genes were identified using NCBI Genedatabase and literature search. 232 miRNAs were found to be differentially expressed between aneurysmal and non-aneurysmal aortic tissue using microarrays. Interactions between TAA-associated genes and differentially expressed miRNAs were predicted using targetScan, miRDB and DIANA microT-CDS databases. Only the interactions predicted by at least 2 databases were considered. Functional protein-protein interactions identified in IntAct database were also included in the network. **E.** MiR-574-5p-gene interaction network. The network shows the association between-miR-574-5p, its predicted gene targets, and the top 5 biological processes enriched by these targets. Solid line: interaction between miRNA and target gene. Dash line: association between gene targets and biological processes.

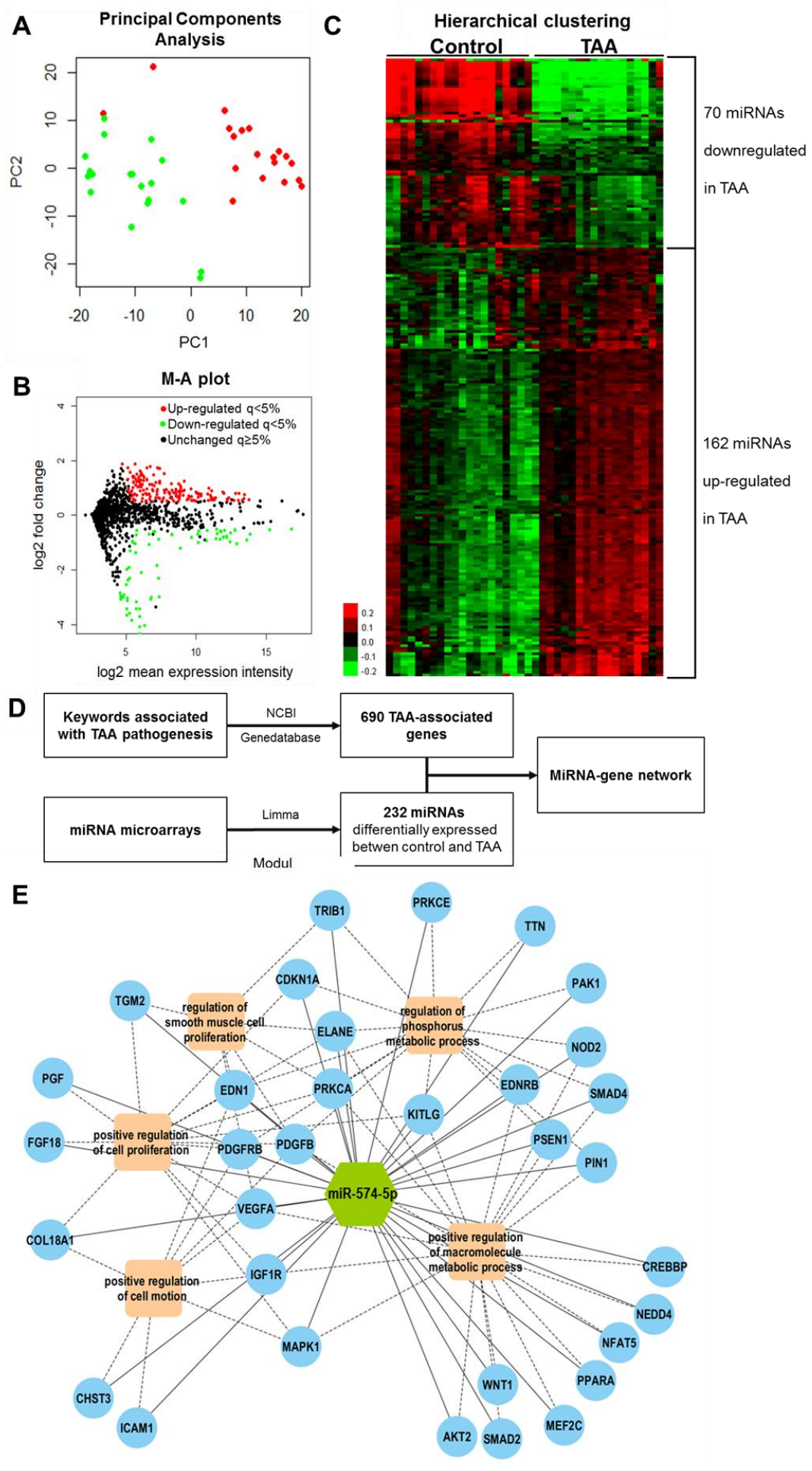

A
Principal Components Analysis
PC2
PC1
B
M-A plot
Up-regulated q<5%
Down-regulated q<5%
Unchanged q≥5%
log2 fold change
log2 mean expression intensity
C
Hierarchical clustering
Control
TAA
70 miRNAs
downregulated
in TAA
162 miRNAs
up-regulated
in TAA
D
Keywords associated with TAA pathogenesis
NCBI
Genedatabase
690 TAA-associated genes
MiRNA-gene network
miRNA microarrays
Limma
Modul
232 miRNAs
differentially expressed
betwen control and TAA
E
TRIB1
PRKCE
TTN
CDKN1A
PAK1
TGM2
regulation of smooth muscle cell proliferation
ELANE
regulation of phosphorus metabolic process
NOD2
PGF
EDN1
PRKCA
EDNRB
SMAD4
KITLG
FGF18
positive regulation of cell proliferation
PDGFRB
PDGFB
PSEN1
PIN1
miR-574-5p
VEGFA
COL18A1
positive regulation of macromolecule metabolic process
CREBBP
positive regulation of cell motion
IGF1R
NEDD4
MAPK1
NFAT5
WNT1
PPARA
CHST3
ICAM1
AKT2
SMAD2
MEF2C

Figure 2: MiR-574-5p, SMAD2 and SMAD4 expression in aortic tissues from the tissue cohort (A-D) and association between serum levels of miR-574-5p and TAA in serum cohort (**E-G**). **A**. Microarray data. **B-E**. Quantitative PCR data. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs. control.
E. Expression of miR-574-5p in the serum of TAA and control patients from the serum cohort. **F.** Expression of miR-574-5p according to the size of the aneurysm. The small group includes patients with an aneurysm < 49mm and the large group includes patients with an aneurysm > 49mm. TAA: thoracic aortic aneurysm. ***p < 0.001. **G.** ROC (receiver operating characteristic) curve analysis showing the association between serum levels of miR-574-5p and TAA. AUC: area under the curve, ***p < 0.001

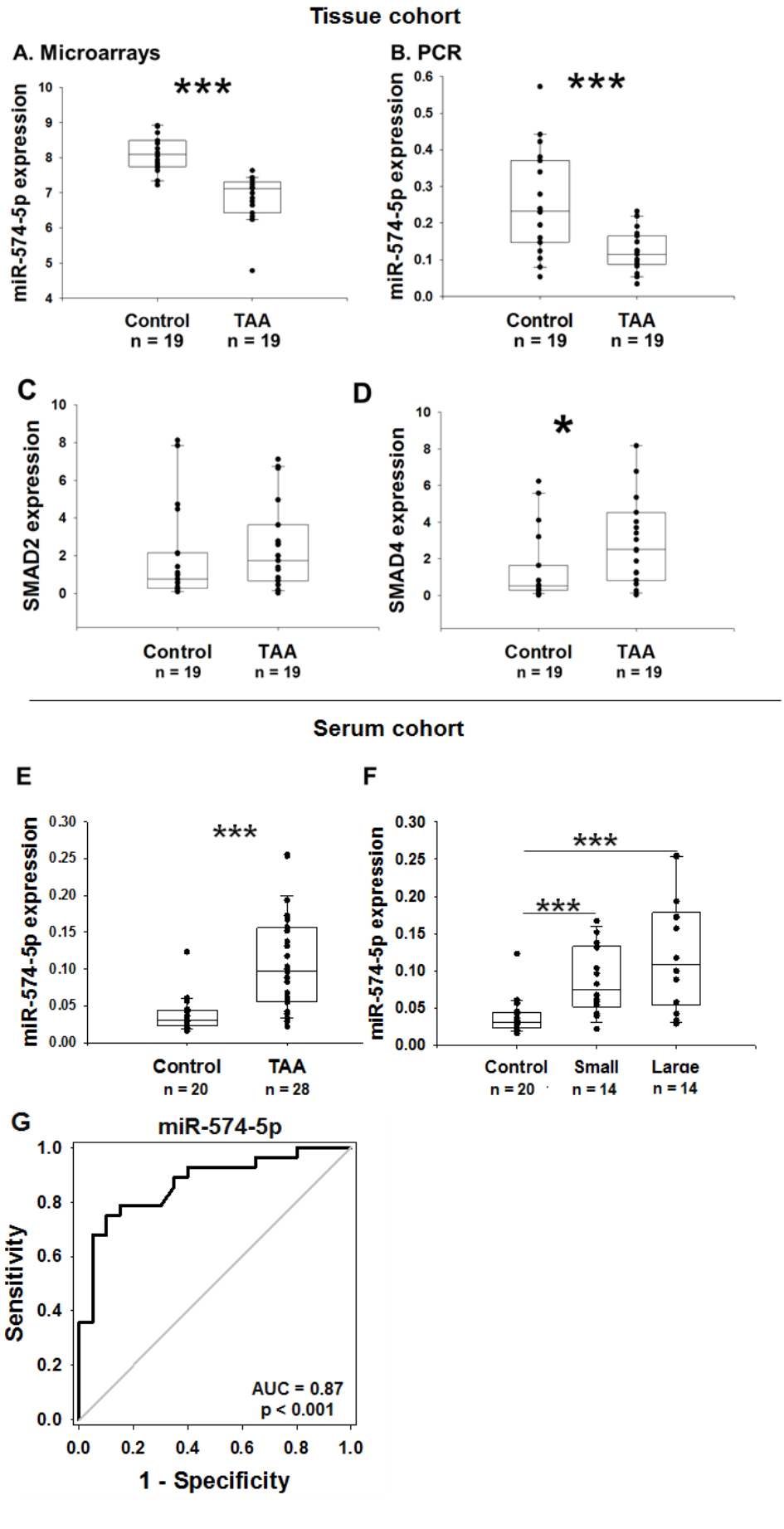

Tissue cohort
A. Microarrays
B. PCR
miR-574-5p expression
***
Control
n = 19
TAA
n = 19
C
D
SMAD2 expression
SMAD4 expression
*
Serum cohort
E
F
Control
n = 20
TAA
n = 28
Small
n = 14
Large
n = 14
G
miR-574-5p
Sensitivity
1 - Specificity
AUC = 0.87
p < 0.001

Figure 3: Expression of miR-574-5p in aorta of *Fbn1*$^{C1039G/+}$ and wild-type (Wt) mice. **A.** Staining of elastin fibers (VVG) in the aorta from Wt and *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice, scale bar represents 500µm. **B**. **Left panel**; Immunofluorescence and fluorescent in-situ hybridation staining of miR-574-5p (red), F-actin (green) and nucleus (blue) in section of ascending aortic tissue from Wt (n=4) and *Fbn1*$^{C1039G/+}$ (n=4) mice; the yellow scale bar corresponds to 200µm. **Right panel**; Relative fluorescence intensity quantification of miR-574-5p (red) in the aortic media from Wt (n=4) and *Fbn1*$^{C1039G/+}$ (n=4) mice. **C.** Relative expression of miR-574-5p measured using PCR in aortic tissue from Wt (n=4) and *Fbn1*$^{C1039G/+}$ (n=4) mice. **D**. Quantification of circulating EVs from Wt (n=9) and *Fbn1*$^{C1039G/+}$ (n=9) mice. **E.** Relative expression of miR-574-5p measured in EVs from Wt (n=9) and *Fbn1*$^{C1039G/+}$ (n=9) mice using PCR. *p<0.05; **p<0.01 ; ***p < 0.001.

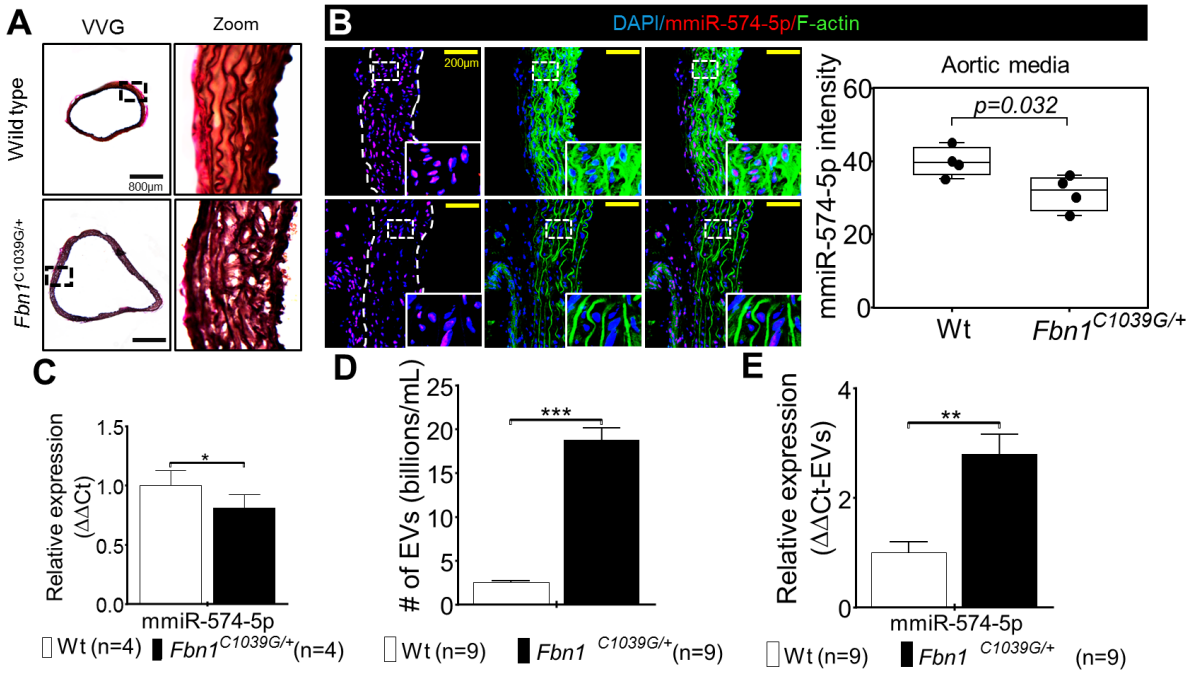


Figure 4: Expression of miR-574-5p in different organs (heart, lung, liver and kidney) in wild-type (Wt) and *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice. **A.** Immunofluorescence and FISH of miR-574-5p (red), F-actin (green) and nucleus (blue) from Wt and *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice. **B.** Relative fluorescence intensity quantification from Wt (n=3) and *Fbn1*$^{C1039G/+}$ (n=3) mice. The yellow scale bar corresponds to 1mm.

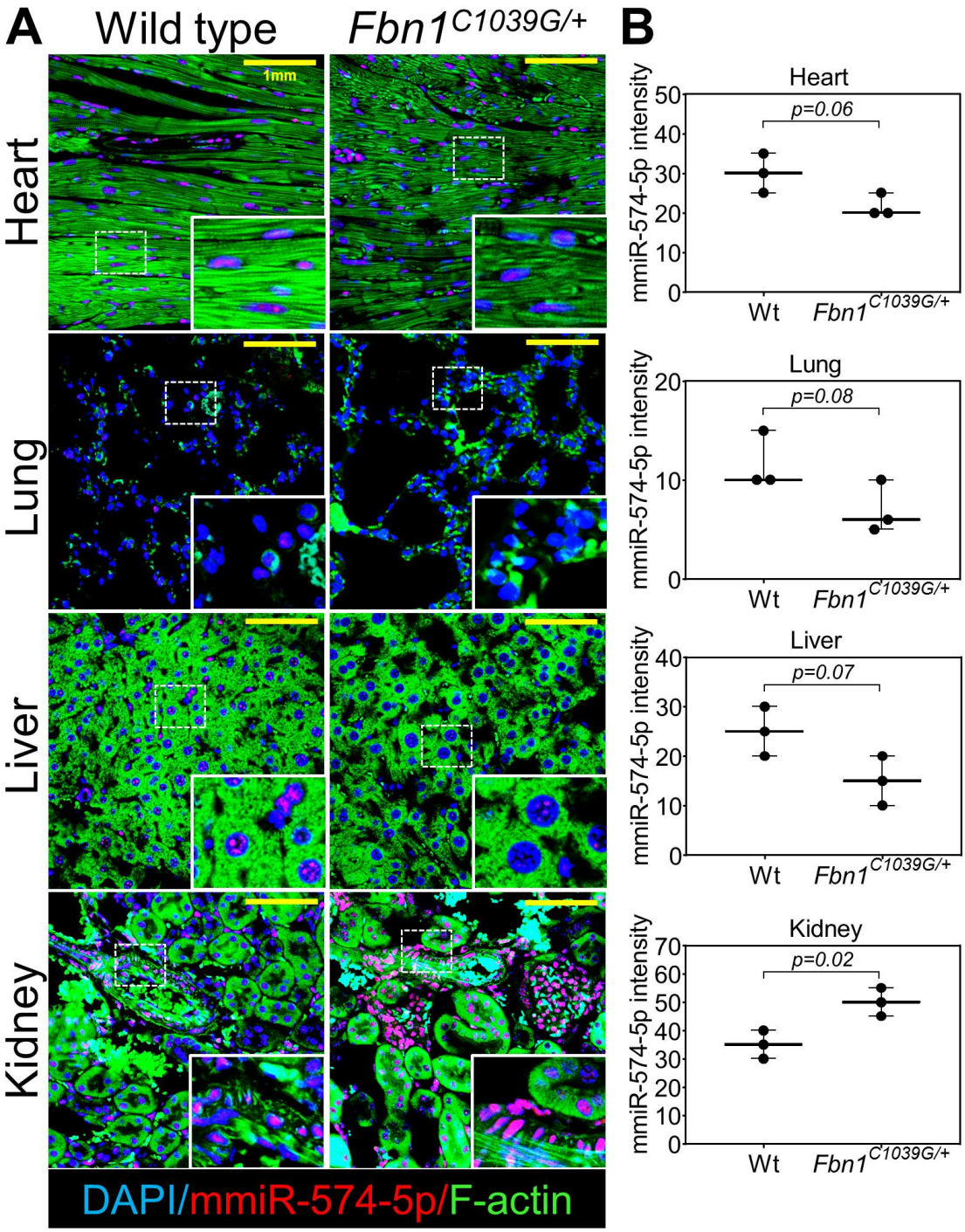


Figure 5: Localization of miR-574-5p in primary vascular smooth cells (VSMCs) from wild-type (Wt) mice, treated with plasma extracellular vesicles (EVs) from Wt and *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice. Immunofluorescence and FISH staining of miR-574-5p (red); CD63, a membrane marker of EVs (green) and nucleus (blue) were used on primary VSMCs. The yellow scale bar corresponds to 500µm.

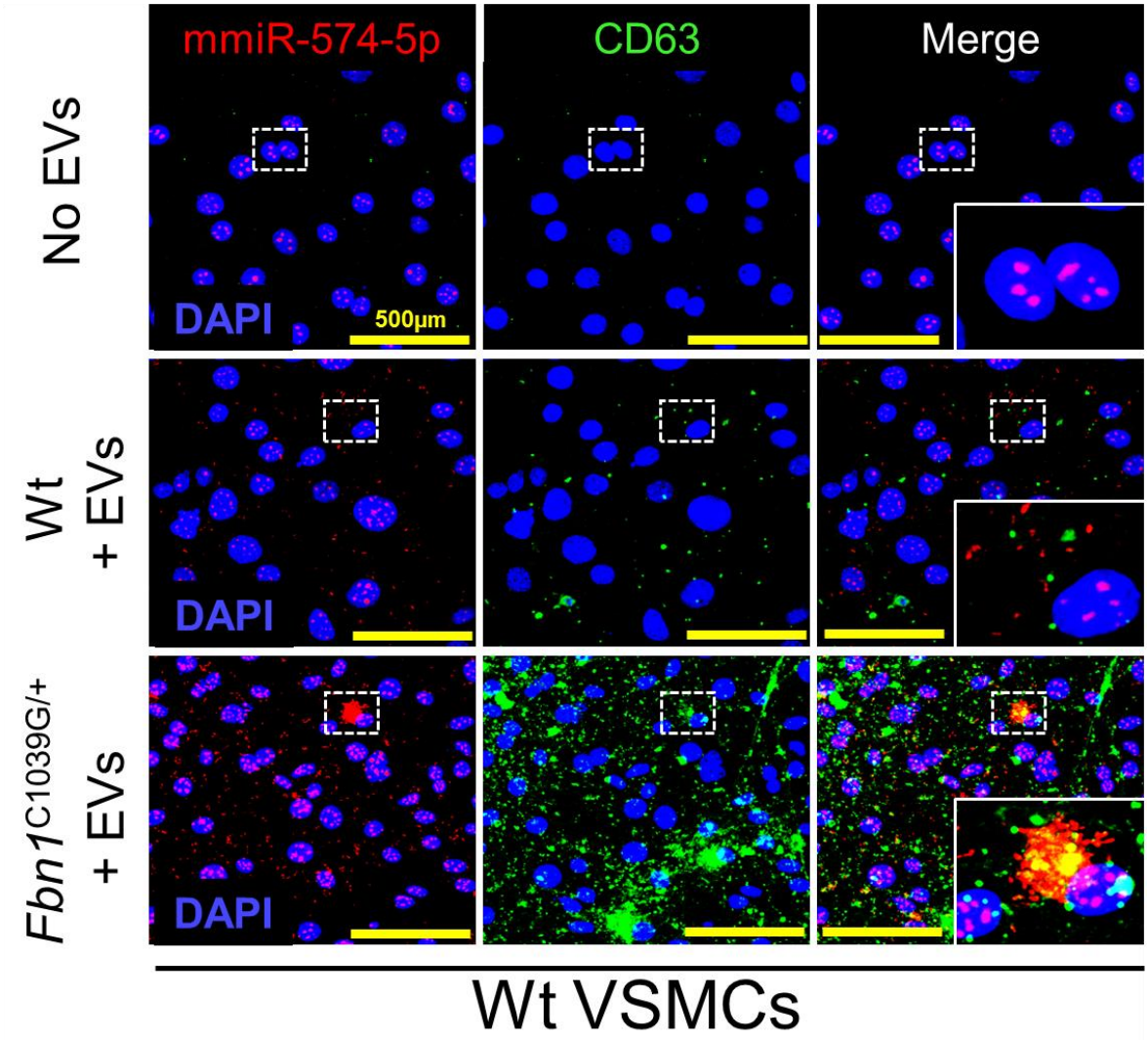
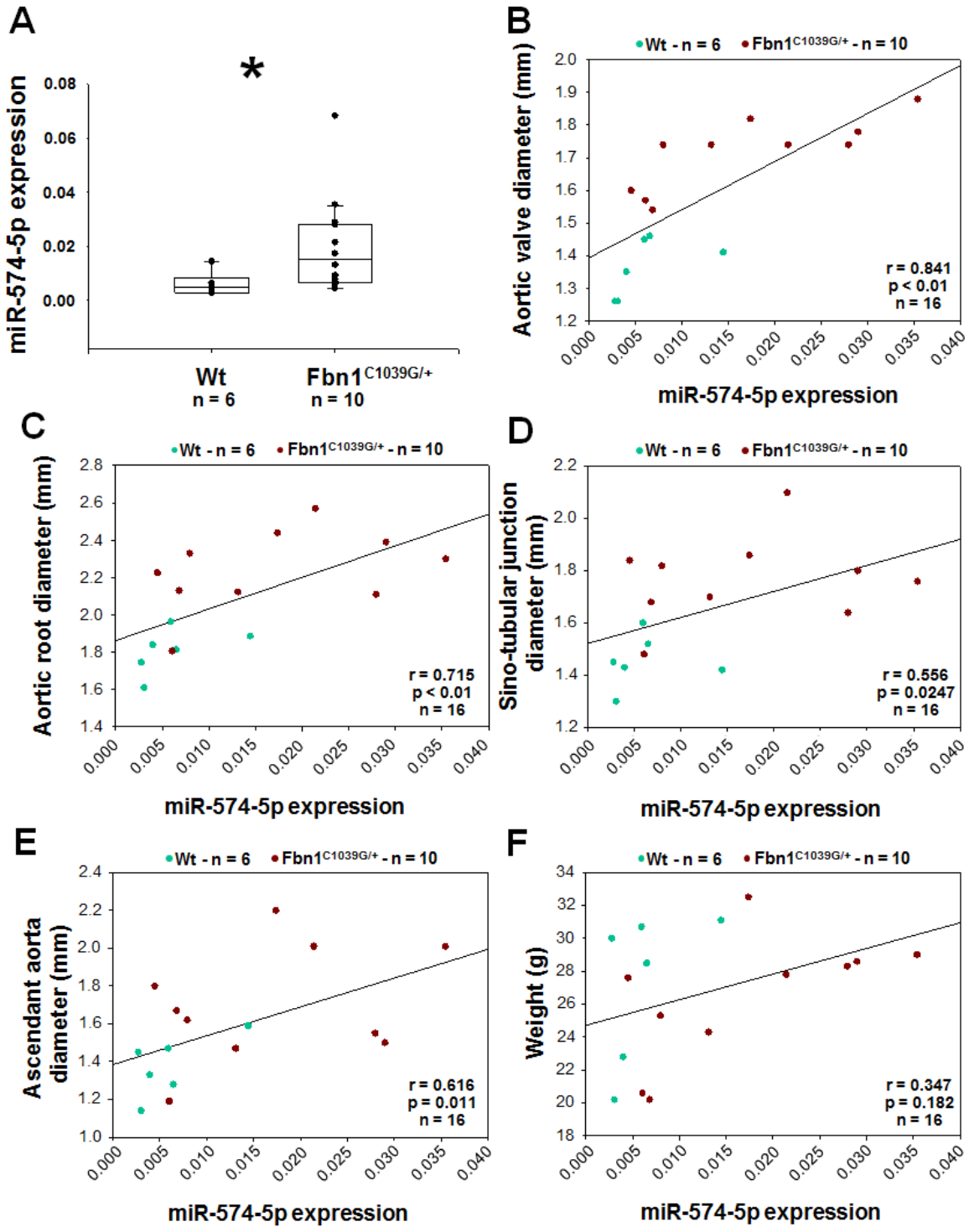


Figure 6: Association between plasma levels of miR-574-5p and aortic dilatation in *Fbn1*$^{C1039G/+}$ mice. **A.** Expression of miR-574-5p in the plasma of *Fbn1*$^{C1039G/+}$ and wild-type (Wt) mice. **B, C, D, E** and **F**. Spearman correlation between miR-574-5p and, respectively, aortic valve diameter **(B)**, aortic root diameter **(C)**, sino-tubular junction diameter **(D)**, ascendant aorta diameter **(E)** and weight **(F)**. R= correlation coefficient; *p < 0.05.



SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplementary materials

1. Mice ultrasounds

For ultrasounds on mice, a Nair hair removal cream was used on all mice the day prior to ultrasounds. All ultrasounds were performed on awake, unsedated mice using the Visualsonics Vevo660 imaging system and a 30 MHz transducer. The aorta was imaged using a standard parasternal long axis view. Dimensions from each animal represent averages of measurements made on still frames in systole of the maximal internal diameter of the aortic valve annulus, aortic sinuses, sinotubular junction, or ascending aorta by a cardiologist blinded to genotype. On the basis of historic controls, the mean diameter of the Wt (wild-type) aorta at 6 months of life is 1.75 + /-0.2 mm while in our disease model ($Fbn1^{C1039G/+}$) the mean diameter is 2.2 ± 0.3 mm. We calculated a need for ~10 animals per group at a power (1-β) of 0.8 and a Type I error rate (α) of 5% to detect a 0.34 mm (57%) mean improvement (vs. 2.2mm mean) improvement in aneurysm diameter.

2. Isolation of intact EVs

To isolate intact EVs, we pooled the collected plasma from each group and used the cushioned-density gradient ultracentrifugation method as described by Li et al [1]. In brief, ~1mL of plasma from each group was diluted with PBS (phosphate-buffered saline) to a total volume of 8mL, placed over 2mL of 60% iodixanol solution (SKU:D1556, Millipore Sigma, Bedford,USA) and centrifuged at 110,000 x g (k factor of 124) for 2h at 4 °C using an SW41Ti swinging-bucket rotor (Beckman Coulter, Danvers, USA). Following this step, we carefully aspirated and discarded the top 7mL and recovered the bottom 3mL, which contained the EVs fraction. For the second density gradient ultracentrifugation step, we transferred the 3mL in a new tube, mixed well, carefully overlaid three layers of 20%, 10%, and 5% iodixanol (3mL each), and centrifuged at 110,000 x g for 18h at 4 °C. We then collected 12 fractions (1mL each) from the top to the bottom of each tube and pooled fractions 6-10 that are enriched for EVs for downstream experiments. To remove iodixanol from recovered EVs, we performed a dialysis step in filtered (0.22μm) 1x PBS buffer using a 100kD Float-A-Lyzer G2 Dialysis device (SKU:G235059, Spectrum Lab, Rancho Dominguez, CA) according to manufacturer's protocol.

3. RNA extraction procedure.

For human aortic tissues samples, approximatively 45 mg of aortic media tissue was crushed in lysis binding buffer (mirVana isolation kit, Life Technologies, Carlsbad, USA). Total RNA was then extracted using miRVana kit (Life Technologies), according to provider recommendations. Briefly, a small volume of miRNA homogenate additive (1/10 of the lysate volume) was added to the lysate, followed by the addition of one volume of acid phenol:chloroform. After a centrifugation step, the aqueous phase was recovered and washed through a column using washing solutions containing increasing ethanol concentration. Total RNA was eluted from the column with 50µl of RNase-free DNase-free water. RNA concentration was measured using a Nanodrop spectrophotometer.

For human serum samples, RNA was extracted from 90µl of serum, added with 110µl of molecular grade phosphate buffered saline using miRNeasy serum/plasma kit (Qiagen, Hilden, Germany) and the semi-automated QIAcube system, according to manufacturer recommendations. Briefly, samples were homogenized with Qiazol (Qiagen), and $1.6x10^8$ copies of spike-in cel-miR-39 were added in the samples, followed by the addition of 200µl of chloroform and a centrifugation step. The aqueous phase was recovered and introduced into the QIAcube apparatus for several washes using a column-based system and solutions containing increasing ethanol concentrations. Total RNA was finally eluted in 18µl of water.

For mice aortic and EVs samples, total RNA was prepared from the ascending aortas or EV-fractions 6-10 using miRNeasy kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol.

For murine plasma samples, RNA was extracted from 50µl of serum using miRNeasy serum/plasma kit (Qiagen) according to manufacturer recommendations. Briefly, samples were homogenized with Qiazol (Qiagen), and $1.6x10^8$ copies of spike-in cel-miR-39 were added in the samples, followed by the addition of 200µl of chloroform and a centrifugation step. The aqueous phase was recovered and passed through a silica membrane. The membrane was washed several times with solutions containing increasing concentrations of ethanol. Total RNA was finally eluted in 18µl of water.

4. Microarrays

For each tissue sample, 100ng of RNA was successively dephosphorylated, denatured, ligated with cyanine3 fluorophore, dried and hybridized onto microarrays overnight at 55°C. Microarray slides were washed and scanned using the high-resolution scanner G2565C (Agilent). Quantifiable values

of microarray were extracted using Agilent's feature extraction software. Of the 40 samples, 2 paired-samples were excluded because of poor quality. MiRNA expression data were computed and normalized using the Robust Microarray Average method integrated in AgiMicroRna R package. The data has been deposited in the GEO repository under accession number GSE110527. Differentially expressed miRNAs were obtained after fitting a linear model and applying Empirical Bayes method from Limma R package. Heatmap was generated using Clucter3 [2] and Java TreeView [3].

5. Reverse transcription and quantitative PCR

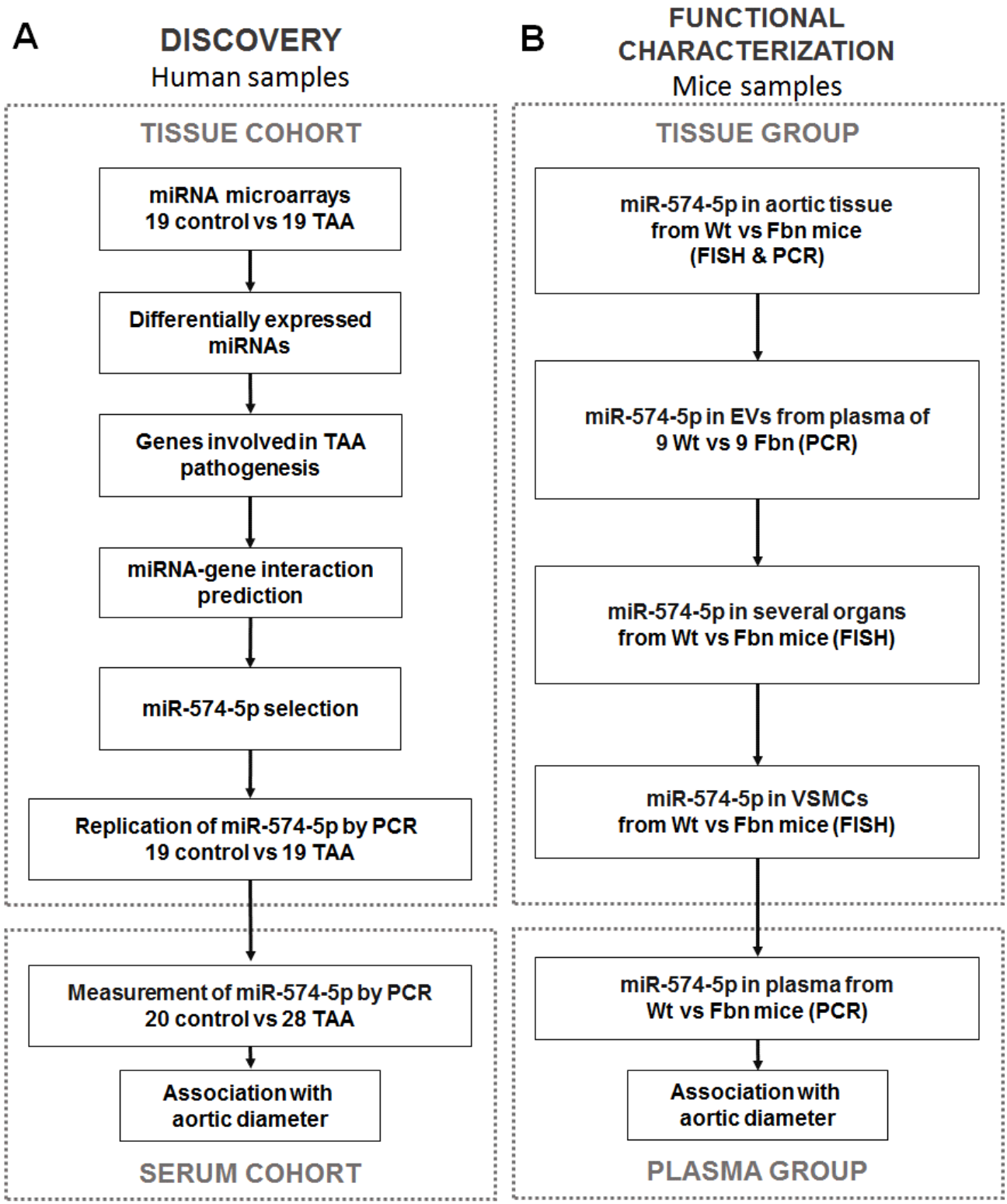
450 to 500 ng of total RNA from human aortic tissues samples were reverse-transcribed using miScript II reverse transcription kit (Qiagen) with the HiFlex buffer. For measurement of miRNA expression, SNORD68 was used as housekeeping gene for normalization of quantitative PCR raw data in aortic tissue samples. Expression levels of predicted target genes of miR-574-5p SMAD2 and SMAD4 were calculated using the formula $2^{\text{mean Cq all samples - Cq sample}}$.

For human serum and murine plasma samples, 12µl of total RNA were reverse-transcribed using miScript II reverse transcription kit (Qiagen) with the HiSpec buffer and cel-miR-39 was used for normalization. MiR-574-5p primers were obtained from Qiagen. All PCR were run on the CFX96 thermocycler (Bio-Rad) with the miScript SYBR Green PCR system (Qiagen). For primer sequence or reference, please see the Major Resources Table in the Supplemental Material.

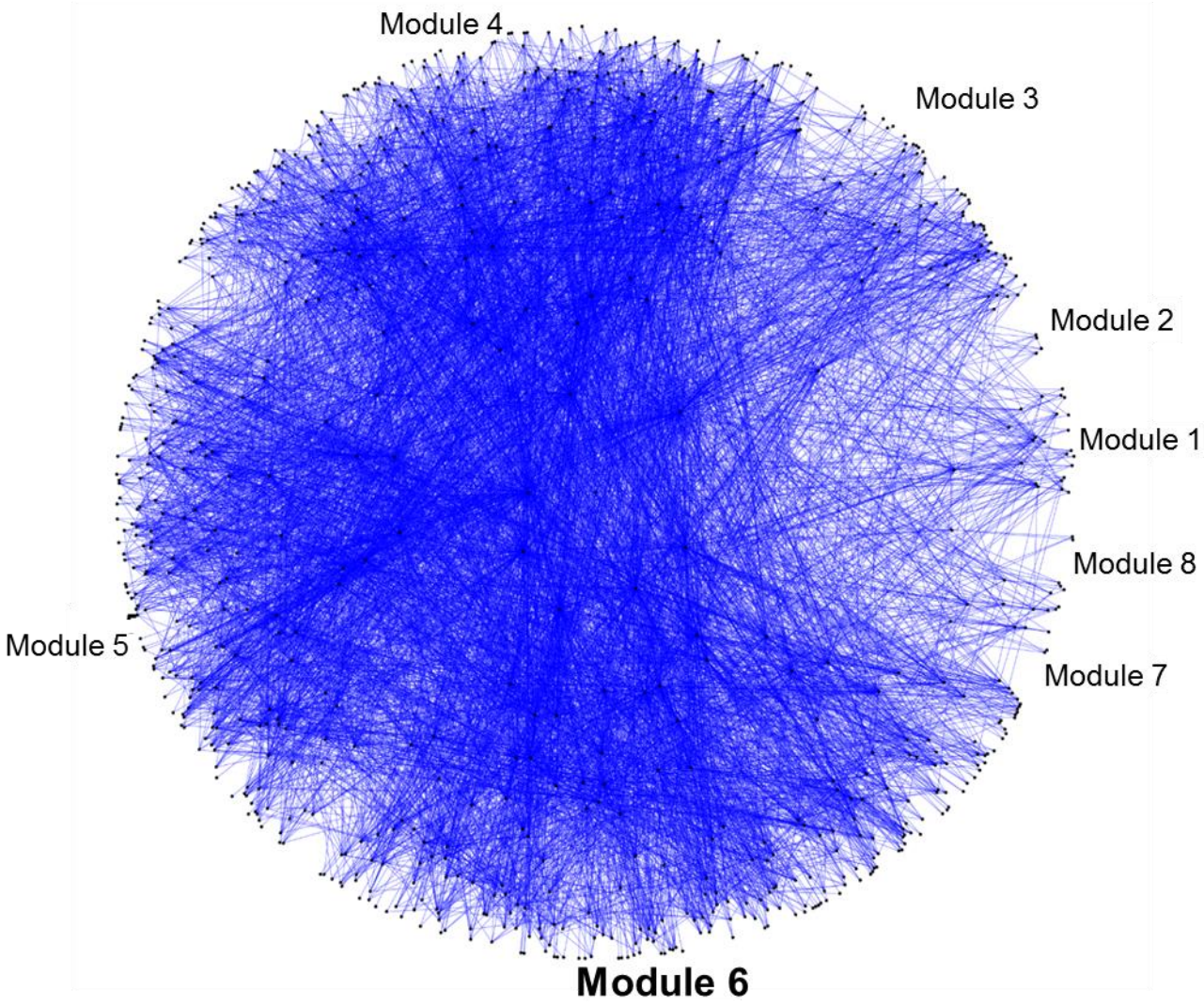
For mice aortic tissues and EVs, U6 was used as housekeeping gene for normalization in aortic tissue samples. For EVs, different miRNAs were tested by quantitative PCR for their stability across samples (miR-133a-3p, miR-133a-5p, miR-199a-5p, miR-191-5p, miR-29-3p) and miR-191-5p was selected for normalization.

Supplementary figures

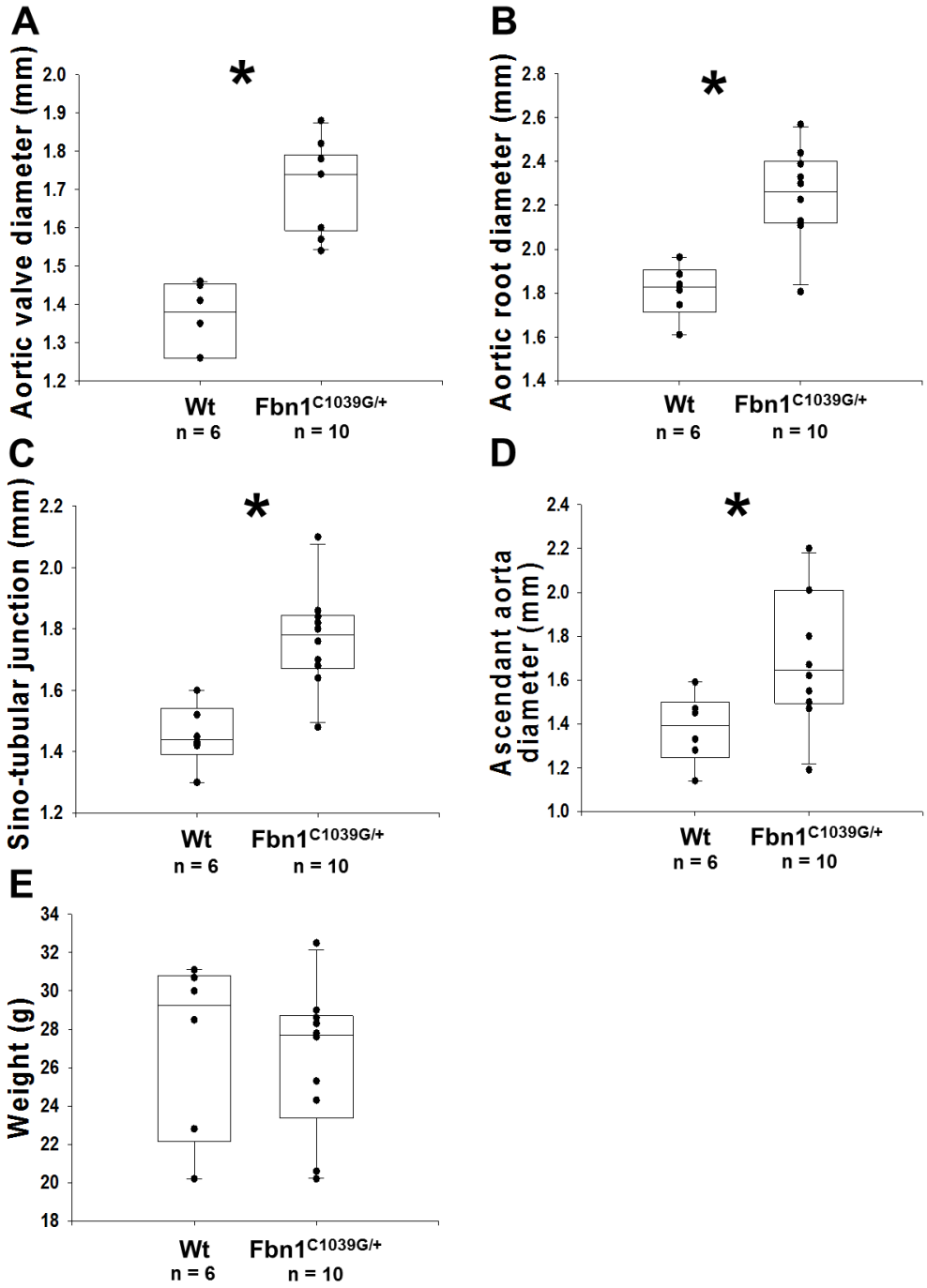
Supplementary figure I: Study design.



Supplementary Figure II: MiRNA-gene and protein-protein interaction network: polar map of the interaction network. Eight modules representing high density of links between miRNAs and genes are displayed.



Supplementary Figure III: Characterization of aortic feature in *Fbn1*$^{C1039G/+}$mice model : diameter of different part of the aorta, measured by echography; respectively, aortic valve diameter **(A)** , aortic root diameter **(B)** , sino-tubular junction diameter **(C)** , ascendant aorta diameter **(D)** and weight **(E)**. *p < 0.05.



Supplementary tables

Supplementary Table I. List of 690 TAA-associated genes identified using NCBI Gene database and literature

A2M	CCNE1	EGLN1	IGF1	MIR15A	PKN1	SPARC
AAT1	CCNE2	EIF2AK2	IGF1R	MIR21	PLA2G2A	SPARCL1
AAT2	CCR6	ELANE	IGFBP5	MIR210	PLAT	SPINT1
ABCA1	CCR8	ELAVL1	IL10	MIR223	PLAU	SPON1
ABL1	CD151	ELN	IL17A	MIR24-1	PLAUR	SPON2
ABL2	CD209	EMILIN1	IL17F	MIR26A1	PLCG1	SPP1
ACAN	CD248	EMILIN2	IL18	MIR29A	PLEC	SPRR3
ACE	CD34	ENAM	IL19	MIR31	PLG	SPRY2
ACE2	CD4	ENG	IL1A	MIR638	PLIN2	SRC
ACKR3	CD40	ENO1	IL1B	MIR663A	PLOD2	SREBF1
ACTA2	CD40LG	ENPP1	IL1RL1	MIRLET7G	PODN	SRF
ACTN1	CD44	EPC1	IL22	MMP1	POLDIP2	SRI
ADAM10	CD47	EPHA2	IL6	MMP10	POMT1	SSPN
ADAM15	CDC42	ERG	ILK	MMP12	POSTN	ST14
ADAM17	CDH1	ERO1A	INHBA	MMP13	POU1F1	ST6GALNAC6
ADAM8	CDH2	ERO1B	IRS1	MMP14	PPARA	ST8SIA1
ADAMTS10	CDK6	ETS1	ITGA1	MMP16	PPARD	STAT1
ADAMTS13	CDKN1A	EZR	ITGA2B	MMP2	PPARG	STIM1
ADAMTS14	CDKN1B	F11R	ITGA5	MMP28	PPARGC1A	STK11
ADAMTS20	CEL	F2	ITGA8	MMP3	PPIB	TBK1
ADAMTS4	CFHR1	F2R	ITGAL	MMP7	PRDX4	TEK
ADAMTS5	CHAD	F2RL1	ITGAM	MMP8	PREB	TFF3
ADCYAP1	CHI3L1	F2RL3	ITGAV	MMP9	PRF1	TFPI2
ADGRG1	CHN2	F3	ITGAX	MRC2	PRKCA	TGFB1
ADIPOQ	CHST3	FASLG	ITGB1	MSN	PRKCB	TGFB2
ADM	CIAPIN1	FBLN5	ITGB2	MSRA	PRKCD	TGFB3
ADORA2B	CKLF	FBN1	ITGB3	MSTN	PRKCE	TGFBI
ADRA1A	CLCN3	FBN3	ITGB4	MTHFR	PRKCZ	TGFBR1
ADRA1B	CLEC11A	FER	ITGB5	MTOR	PRKD1	TGFBR2
ADRA2A	CLIC4	FGA	ITGB6	MUC17	PRKG1	TGM2
ADRA2B	CLU	FGB	ITLN1	MUC4	PRSS3	THBD

ADRA2C	CMA1	FGF1	JAG1	MUC5AC	PSAP	THBS1
AEBP1	COCH	FGF18	JAM3	MYB	PSEN1	THBS4
AGER	COL10A1	FGF2	JUN	MYC	PTEN	THY1
AGT	COL13A1	FGF20	KCNA10	MYCN	PTGFR	TIMP1
AGTR1	COL14A1	FGF23	KCNA3	MYH11	PTGIS	TIMP2
AGTR2	COL15A1	FGF9	KCNMA1	MYH9	PTGS2	TIMP3
AIF1	COL17A1	FGFR2	KDR	MYLK	PTH	TJP2
AKT1	COL18A1	FGFR4	KIT	MYOC	PTK2	TLN1
AKT2	COL1A1	FGFRL1	KITLG	MYOCD	PTK2B	TLR2
ALOX12	COL1A2	FGG	KLF4	NCL	PTPRZ1	TLR4
ALOX15	COL25A1	FHOD1	KLF6	NCOA3	PTX3	TLR9
ALOX15B	COL28A1	FKBP1A	KLK2	NCSTN	PVR	TM4SF5
ALOX5	COL2A1	FLG	KLK4	NDP	QSOX1	TMPRSS6
ALPL	COL3A1	FLNA	KLK7	NDRG2	RAB25	TNF
AMD1	COL4A1	FLT1	KLKB1	NDRG4	RAC1	TNFAIP6
AMELX	COL4A2	FMOD	KRT1	NDUFS3	RCAN1	TNFRSF11B
ANGPT1	COL4A3	FN1	LAMA1	NEDD4	RDX	TNFRSF1A
ANGPTL4	COL6A3	FOXF1	LAMA2	NF1	RELN	TNFRSF1B
ANTXR1	COL7A1	FOXF2	LAMA4	NFAT5	RETN	TNFSF11
ANTXR2	COL9A1	FRAS1	LAMA5	NFATC1	RHEB	TNFSF12
ANXA2	COMP	FSCN1	LAMB1	NFKB1	RHOA	TNK2
APCS	CPB2	FSTL1	LAMB2	NFKB2	ROCK1	TNNI2
APLN	CREBBP	FURIN	LAMC1	NID2	ROCK2	TNXB
APLP2	CREG1	FYN	LAMC2	NOD2	RPSA	TP53
APOA1	CRISP3	GAS6	LAMC3	NOS2	RPTOR	TP63
APOD	CRP	GATA6	LAMP1	NOS3	RTN4	TP73
APOE	CRTAC1	GC	LARGE	NOTCH1	RUNX2	TPSAB1
APOH	CSF2	GDF5	LATS2	NOTCH2	S100A12	TRAPPC4
APP	CSGALNACT1	GNB2L1	LEP	NOTCH3	S100A4	TRIB1
AQP1	CST3	GPC1	LEPR	NOX1	SDC1	TRPC1
AR	CTGF	GPC3	LGALS1	NOX4	SDC2	TRPC6
ARF6	CTNNB1	GPC4	LGALS3	NPM1	SDC4	TRPM7
ARHGAP9	CTSB	GPER1	LGALS8	NPPA	SEL1L	TTN
ARHGEF25	CTSD	GREM1	LGALS9	NPPB	SERAC1	TTR
ARNTL	CTSK	GSK3B	LIMK1	NPY2R	SERPINA1	TWIST1
ATP2A2	CTSL	GSN	LMNA	NQO1	SERPINB5	TYK2

ATP7A	CTSS	GSR	LOX	NR1H2	SERPINB9	TYMP
AURKA	CTTN	GZMB	LOXL1	NR1H3	SERPINE1	UCHL1
AXL	CX3CL1	HAS1	LPL	NR1I2	SERPINE2	UGDH
BAD	CX3CR1	HBEGF	LRP1	NR3C2	SERPINF1	UPF1
BAG1	CXCL10	HES1	LRP5	NR4A3	SFRP1	USF2
BAX	CXCL12	HEXIM1	LRP6	NRG1	SFTPA1	VASP
BCL2	CXCL8	HEY1	LTB4R	NRP1	SFTPA2	VCAM1
BGN	CXCR4	HEY2	LTBP1	NRXN1	SFTPD	VEGFA
BIRC2	CYBA	HGF	LTBP2	NTM	SHH	VEGFB
BIRC5	CYR61	HIF1A	LTF	OLFML2A	SIRPA	VTN
BMP1	CYSLTR1	HMGB1	LYZ	OLR1	SIRT1	VWA1
BMP2	DAG1	HMGCR	MADCAM1	ORAI1	SLC20A1	VWF
BMP4	DCN	HMOX1	MAP3K1	OSM	SLC2A10	WISP1
BMP7	DDR1	HNRNPA2B1	MAPK1	P4HB	SLC2A9	WISP3
BRCA1	DDR2	HOXA10	MAPK14	PAK1	SLIT2	WNT1
BSG	DDX39B	HPSE	MAPK3	PAK2	SMAD2	WNT3A
BST1	DDX58	HRAS	MATN2	PCNA	SMAD3	WNT5A
C5	DEFA1	HSP90AA1	MATN3	PCOLCE	SMAD4	WNT7B
CALR	DMBT1	HSP90B1	MCAM	PCSK9	SMAD7	WTAP
CAMP	DMD	HSPA5	MDM2	PDGFA	SMPD2	WWOX
CAPN1	DMP1	HSPB1	MEF2C	PDGFB	SNAI1	YAP1
CAPN2	DPP4	HSPG2	MEP1B	PDGFRB	SNAP23	YWHAG
CAPNS1	DST	HTRA1	MEPE	PEA15	SNX17	ZNF410
CASK	E2F1	HTT	MESP1	PEBP1	SOCS1	
CASP3	ECM1	HYAL1	MET	PECAM1	SOD1	
CASR	EDIL3	HYAL2	MFAP5	PGF	SOD2	
CAST	EDN1	HYAL4	MFGE8	PHEX	SOD3	
CAT	EDNRA	ICAM1	MFI2	PI3	SORL1	
CAV1	EDNRB	ICAM2	MFN2	PIK3CB	SOST	
CCL2	EFEMP1	ID1	MGP	PIK3CG	SOX9	
CCL20	EFEMP2	IDO1	MIA	PIN1	SP1	
CCL7	EGFL7	IER3	MIR143	PITX2	SP7	
CCND1	EGFR	IFNG	MIR145	PKM	SPACA3	

Supplementary Table II – Biological processes enriched in module 1; module 3; module 4; module 5; module 6 and module 7. FDR : false discovery rate – Please see Excel file.

Supplementary Table III –MiRNAs included in the module 6

miRNA	Traffic	Fold change (log2)	Expression mean (control and TAA)	Adjusted p-value
hsa-miR-106b-5p	1717.16	0.83	8.54	1.97E-03
hsa-miR-1180-3p	502.00	-1.89	5.19	4.87E-10
hsa-miR-125a-5p	2016.02	0.88	8.75	4.55E-03
hsa-miR-125b-5p	808.85	0.77	13.45	3.10E-04
hsa-miR-127-3p	550.74	1.74	6.46	7.12E-06
hsa-miR-128-3p	6186.65	1.75	7.24	4.40E-05
hsa-miR-132-3p	1546.18	0.88	5.34	3.48E-03
hsa-miR-1-3p	1226.55	0.66	8.78	3.04E-02
hsa-miR-140-5p	1850.69	0.84	11.91	2.72E-04
hsa-miR-149-5p	7160.61	0.86	5.15	1.02E-04
hsa-miR-151a-5p	809.71	1.02	8.9	5.88E-04
hsa-miR-15a-5p	2117.39	0.68	9.66	1.03E-02
hsa-miR-1915-3p	948.96	-0.51	11.47	4.88E-03
hsa-miR-193a-5p	3553.22	0.93	6.86	3.24E-04
hsa-miR-193b-3p	502.00	0.92	8.88	1.30E-04
hsa-miR-20b-5p	1535.46	0.94	7.24	2.52E-03
hsa-miR-214-3p	3353.07	0.97	9.61	6.49E-05
hsa-miR-23a-3p	3418.89	0.57	13.78	8.41E-04
hsa-miR-24-3p	6353.67	0.55	13.29	1.01E-03
hsa-miR-28-5p	1136.07	0.95	7.87	2.83E-03
hsa-miR-2861	538.64	-0.58	11.73	1.07E-02
hsa-miR-3127-5p	584.93	-2.09	6.09	6.39E-08
hsa-miR-324-3p	737.89	0.62	9.47	2.83E-03

hsa-miR-324-5p	1307.46	1.25	7.41	1.84E-05
hsa-miR-331-3p	4821.11	1.07	8.86	5.27E-04
hsa-miR-342-3p	5387.52	1.14	8.73	4.88E-05
hsa-miR-34a-5p	3640.53	0.58	11.05	9.10E-03
hsa-miR-365a-3p	2441.28	0.79	10.08	1.10E-03
hsa-miR-3665	502.96	-0.55	10.78	3.66E-03
hsa-miR-377-3p	3112.98	1.88	5.62	8.72E-07
hsa-miR-423-5p	2606.54	0.56	7.59	3.20E-03
hsa-miR-4261	595.33	1.29	6.05	3.77E-04
hsa-miR-4281	1002.00	-0.97	12.41	5.95E-03
hsa-miR-4306	515.86	0.65	7.12	1.69E-04
hsa-miR-4324	539.02	0.89	5.98	1.52E-05
hsa-miR-4459	820.04	-0.67	11.49	9.38E-03
hsa-miR-4515	524.97	0.51	6.42	7.08E-03
hsa-miR-4669	505.03	-0.69	8.29	8.69E-04
hsa-miR-4726-5p	502.00	-3.42	5.95	2.21E-10
hsa-miR-4728-5p	1756.83	0.7	8.82	0.042817789
hsa-miR-4770	502.00	1.07	5.92	5.72E-04
hsa-miR-484	2470.29	1.04	6.07	3.57E-05
hsa-miR-487b-3p	550.67	1.62	5.98	3.75E-05
hsa-miR-564	1365.46	0.6	6.69	2.95E-04
hsa-miR-574-5p	4288.79	-1.2	8.87	2.79E-06
hsa-miR-638	556.09	-0.54	12.02	1.27E-02
hsa-miR-670-5p	663.53	-3.42	5.05	5.31E-11
hsa-miR-874-3p	3827.13	0.75	7.19	1.48E-05
hsa-miR-93-5p	1162.43	0.84	7.74	2.79E-03

Supplementary Table IV – 79 TAA-associated genes predicted to be targeted by miR-574-5p

ABL2	ACE2	ADAMTS10
ADAMTS14	ADAMTS5	ADRA1A
AKT2	ALPL	AXL
CD151	CDKN1A	CHST3
COL15A1	COL18A1	CREBBP
CTSD	CX3CL1	CX3CR1
DAG1	DDR1	DDX58
DPP4	EDN1	EDNRB
EFEMP1	ELANE	ELAVL1
FASLG	FGF18	FGFRL1
HTRA1	HYAL1	ICAM1
IGF1R	IL1RL1	ITGAL
JAM3	KITLG	LAMC3
LEP	MAPK1	MEF2C
MMP16	MMP3	MSN
NDRG4	NEDD4	NFAT5
NOD2	NPY2R	NR3C2
OLFML2A	OLR1	ORAI1
PAK1	PDGFB	PDGFRB
PGF	PIN1	PLEC
PPARA	PRKCA	PRKCE
PSEN1	PTGIS	ROCK2
S100A12	SEL1L	SERPINB9
SMAD2	SMAD4	SNAP23
SPRR3	TGM2	TIMP2
TRIB1	TTN	VEGFA
WNT1		

References

1. Li K, Wong DK, Hong KY, Raffai RL. Cushioned-Density Gradient Ultracentrifugation (C-DGUC): A Refined and High Performance Method for the Isolation, Characterization, and Use of Exosomes. *Methods Mol Biol.* 2018;1740:69-83.

2. de Hoon MJ, Imoto S, Nolan J, Miyano S. Open source clustering software. *Bioinformatics.* 2004;209:1453-1454.

3. Saldanha AJ. Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics.* 2004;2017:3246-3248.

4. Etudes n°4 & n°5 : Valeur prédictive des microARN envers l'évolution neurologique et la survie post-arrêt cardiaque

L'AC est associé avec un taux de mortalité de 90% [7]. De plus, la moitié des rares survivants vont présenter des séquelles neurologiques importantes, associées à une qualité de vie réduite (nécessitant des soins lourds) et une faible survie à moyen terme [8]. La mesure de biomarqueurs sanguins (telle que la NSE) couplée à l'observation de caractéristiques cliniques aide les médecins à entrevoir le pronostic du patient et à prendre la difficile décision du maintien ou de l'arrêt des soins de maintien de vie [116].

La découverte de nouveaux biomarqueurs permettant de prédire avec plus de précision l'évolution cérébrale des patients est nécessaire pour assurer une prise de décision plus juste et plus proche de la réalité cérébrale du patient. Par ailleurs, de plus en plus d'études démontrent l'importance sous-estimée du genre dans le diagnostic, le traitement et l'évolution des patients atteints de MCV. Les cohortes comprenant des patients ayant subi un AC présentent souvent une plus grande proportion d'hommes que de femmes [286].

Les miARN circulants disposent d'un potentiel de biomarqueur envers diverses maladies, y compris les MCV. Ainsi, une étude à petite échelle a montré que les niveaux circulants de miR-574-5p étaient plus élevés chez les patients ayant une maladie coronarienne [287]. Les maladies coronariennes représentent une cause fréquente d'AC d'origine cardiaque [288]. Enfin, d'autres études à petite échelle ont montré la valeur pronostique des miR-21, miR-124-3p et miR-122-5p pour prédire l'évolution neurologique et la survie après un AC [23,127,260,261,289]. Le miR-124-3p est spécifique du cerveau, et sa capacité à prédire l'évolution neurologique post-AC a été validée dans une sous-étude de la cohorte TTM [262].

4.1. Valeur prédictive du miR-122-5p

Le but de cette étude était d'évaluer la valeur prédictive du miR-122-5p pour l'évolution neurologique et la survie après un AC survenu en dehors de l'hôpital, dans une étude à large échelle.

Ainsi, l'expression du miR-122-5p a été mesurée dans le sérum de 590 patients ayant survécu à un AC hors hôpital, par PCR quantitative. Ces patients font partie de l'étude multicentrique TTM.

L'évolution neurologique des patients a été estimée six mois post-AC à l'aide de l'échelle CPC. La survie fut observée à la fin de l'étude.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

- Une sous-expression du miR-122-5p a été observée chez les patients ayant une mauvaise évolution cérébrale, indépendamment de la température utilisée (33 ou 36°C, les premières 24h après AC).
- Les taux d'expression du miR-122-5p étaient inversement corrélés avec l'âge des patients ($r=0,24$; $p<0,001$), étaient légèrement plus élevés chez les hommes et diminuaient progressivement entre 24, 48 et 72h après la survenue de l'AC.
- Les taux d'expression du miR-122-5p ont permis d'identifier les patients ayant une mauvaise évolution neurologique avec une AUC de 0,62 et étaient un prédicteur univarié de l'évolution neurologique (OR [95% CI]: 0,71 [0,57-0,88]).
- Les taux d'expression du miR-122-5p étaient un prédicteur indépendant de l'évolution neurologique (OR [95% CI]: 0,51 [0,37-0,68]) et de la survie post-AC.
- Le modèle de prédiction clinique contenant les variables connues comme étant associées à l'évolution cérébrale et la survie post-AC (l'âge, le genre, le temps entre l'AC et le RACS, l'occurrence de RCP par les témoins, la survenue du RACS après défibrillation, le type de premier rythme monitoré, la survenue d'un choc cardiogénique lors de l'admission, les niveaux de lactate (au moment de l'AC), de NSE (48h post-AC) et la température d'hypothermie thérapeutique utilisée) permettait de prédire l'évolution neurologique post-AC avec un AIC de 471. L'ajout des taux d'expression du miR-122-5p à ce modèle permet d'augmenter la prédiction avec l'obtention d'un AIC de 463. L'augmentation de la capacité prédictive entre ces deux modèles est significative (IDI de 0,016 [0,007-0,025], p=0,0004, rapport de vraisemblance p=0,002.
- Enfin, l'ajout des taux d'expression des miR-124-3p et miR-122-5p dans le modèle de prédiction clinique permet d'augmenter encore la capacité prédictive du modèle avec l'obtention d'un AIC de 446. Cette augmentation de la capacité prédictive est significative comparée au modèle clinique (IDI de 0,04 [0,02-0,05], p=0,0000026, rapport de vraisemblance p<0,001).

Les niveaux circulants de miR-122-5p mesurés 48h post-AC sont associés avec l'évolution neurologique et la survie à moyen terme post-AC. De plus, les niveaux de miR-122-5p permettent une amélioration de la prédiction de l'évolution cérébrale post-AC, laissant suggérer son potentiel de biomarqueur.

IVYSPRING INTERNATIONAL PUBLISHER

Theranostics

2017; 7(10): 2555-2564. doi: 10.7150/thno.19851

Research Paper

Incremental Value of Circulating MiR-122-5p to Predict Outcome after Out of Hospital Cardiac Arrest

Yvan Devaux[1]✉, Antonio Salgado-Somoza[1], Josef Dankiewicz[2], Adeline Boileau[1], Pascal Stammet[3], Anna Schritz[4], Lu Zhang[1], Mélanie Vausort[1], Patrik Gilje[2], David Erlinge[2], Christian Hassager[5], Matthew P. Wise[6], Michael Kuiper[7], Hans Friberg[8], Niklas Nielsen[9] and the TTM-trial investigators; On behalf of the Cardiolinc™ network

1. Cardiovascular Research Unit, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg;
2. Department of Cardiology, Clinical Sciences, Lund University and Skane University Hospital, Lund, Sweden;
3. Department of Anaesthesia and Intensive Care Medicine, Centre Hospitalier de Luxembourg, Luxembourg;
4. Competence Centre for Methodology and Statistics, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg;
5. Department of Cardiology B, The Heart Centre, Rigshospitalet University Hospital, Copenhagen, Denmark;
6. Department of Intensive Care, University Hospital of Wales, Cardiff, United Kingdom;
7. Department of Intensive Care, Leeuwarden Medical Centrum, Leeuwarden, The Netherlands;
8. Department of Anesthesia and Intensive Care, Clinical Sciences, Lund University and Skane University Hospital, Lund, Sweden;
9. Department of Anesthesia and Intensive Care, Clinical Sciences, Lund University and Helsingborg Hospital, Helsingborg, Sweden.

✉ Corresponding author: Yvan Devaux, Cardiovascular Research Unit, Luxembourg Institute of Health (L.I.H.), L1526 Luxembourg. Tel: +352 26970300. Fax: +352 26970396. Email: yvan.devaux@lih.lu

© Ivyspring International Publisher. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC) license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). See http://ivyspring.com/terms for full terms and conditions.

Received: 2017.02.28; Accepted: 2017.03.30; Published: 2017.06.25

Abstract

Rationale. The value of microRNAs (miRNAs) as biomarkers has been addressed in various clinical contexts. Initial studies suggested that miRNAs, such as the brain-enriched miR-124-3p, might improve outcome prediction after out-of-hospital cardiac arrest. The aim of this study is to determine the prognostic value of miR-122-5p in a large cohort of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest.

Methods. We analyzed 590 patients from the Targeted Temperature Management trial (TTM-trial). Circulating levels of miR-122-5p were measured in serum samples obtained 48 hours after return of spontaneous circulation. The primary end-point was poor neurological outcome at 6 months evaluated by the cerebral performance category score. The secondary end-point was survival at the end of the trial.

Results. Forty-eight percent of patients had a poor neurological outcome at 6 months and 43% were dead at the end of the trial. Levels of miR-122-5p were lower in patients with poor neurological outcome compared to patients with good neurological outcome ($p<0.001$), independently of targeted temperature management regimen. Levels of miR-122-5p were significant univariate predictors of neurological outcome (odds ratios (OR), 95% confidence intervals (CI): 0.71 [0.57-0.88]). In multivariable analyses, miR-122-5p was an independent predictor of neurological outcome and improved the predictive value of a clinical model including miR-124-3p (integrated discrimination improvement of 0.03 [0.02-0.04]). In Cox proportional hazards models, miR-122-5p was a significant predictor of survival at the end of the trial.

Conclusion. Circulating levels of miR-122-5p improve the prediction of outcome after out-of-hospital cardiac arrest.

Key words: microRNAs; biomarker; prognostic; cardiac arrest; neurological function.

Introduction

Cardiac arrest is a life-threatening condition with an overall poor prognosis. Mortality of patients admitted to the intensive care unit after out-of-hospital cardiac arrest is around fifty percent. While early in-hospital mortality is mainly due to hemodynamic failure, half of survivors after hospital discharge suffer irreversible neurological sequelae or die within a few months [1]. In addition, withdrawal of life-sustaining therapies in patients with presumed poor prognosis accounts for a significant number of in-hospital deaths [2, 3]. Decision to withdraw life assistance is a difficult task which necessitates

accurate prognostication tools such as pathologic patterns on electroencephalograms, neuroimaging, absent pupillary reflexes to light, and absent somatosensory evoked potentials [4-7]. Neuron-specific enolase (NSE) is recommended by current guidelines in multimodal strategies [8], and high serial levels afford the best prediction [9]. Continuous monitoring of bispectral index, an indicator of brain activity, has shown some promise in prognostication after cardiac arrest [10]. Combined assessment of bispectral index and the neuron-enriched S100 beta protein provided an added prognostic value over single parameters [11]. New biomarkers would be invaluable for improving risk stratification and allow healthcare to be adapted according to outcome, optimizing treatment to patients likely to survive while avoiding futile and costly resources to patients with irreversible neurological sequelae [12]. It would also provide relatives with information about outcome at an earlier stage, limiting uncertainty and distress.

The biomarker value of circulating microRNAs (miRNAs) has been extensively studied since the discovery that these small non-coding RNA molecules regulating gene expression are present in the bloodstream [13]. MicroRNAs appear to have the potential to improve personalized healthcare of patients with heart disease [14]. A few studies have indicated that circulating miRNAs may predict outcome after cardiac arrest. In two small-scale studies, plasma levels of miR-122-5p and miR-124-3p were associated with neurological outcome and survival after cardiac arrest [15, 16]. MiR-122-5p is enriched in the liver and is involved in lipid metabolism, inhibiting fatty acid oxidation and promoting fatty acid and triglyceride biosynthesis [17]. MiR-122-5p is also involved in glucose homeostasis and is consistently present in the blood, hence its potential biomarker value for cardiovascular and metabolic diseases [18]. Accordingly, plasma levels of miR-122-5p were found to be increased in a porcine cardiogenic shock model [19]. Recent investigations identified miR-122-5p in other organs such as the kidney [20], aortic valves [21] and the myocardium of patients with severe aortic stenosis where it regulates fibrosis [22]. In a discovery phase with small RNA sequencing, we observed an association between circulating levels of miR-122-5p and outcome after cardiac arrest [23]. *In vitro*, miR-122-5p has been shown to be expressed in different cell types including hepatocytes, fibroblasts and neuronal cells [15, 22]. The predictive capacity of brain-enriched miR-124-3p, whose circulating levels reflect the extent of brain damage after cardiac arrest, was recently confirmed in the large Targeted Temperature Management trial (TTM trial) [23], a trial designed to address the potential benefit of targeted temperature management at 33°C vs. 36°C on outcome after out-of-hospital cardiac arrest [24].

In the present sub-study of the TTM trial, we assessed the incremental value of miR-122-5p to predict neurological outcome and survival after cardiac arrest.

Methods

Patients

Between November 2010 and July 2013, the 36 recruiting centers of the TTM trial enrolled 939 unconscious adult patients admitted to an intensive care unit after an out-of-hospital cardiac arrest of presumed cardiac cause. Patients were randomized to either targeted temperature management at 33°C or 36°C. The trial has received ethical approval from each participating country. Informed consent was obtained from each participant or relatives, according to the legislation in each country, and in line with the declaration of Helsinki [25]. Detailed TTM trial design, protocol, statistical analysis, results and interpretation have been published [24, 26, 27]. The trial is registered at www.clinicaltrials.gov (NCT01020916). Of the 36 recruiting sites, 29 collected blood samples in a total of 700 patients. Blood samples were stored at the Integrated Biobank of Luxembourg in compliance with the International Society for Biological and Environmental Repositories Best Practices and with International Organization for Standards (ISO 9001:2008, 17025:2005 and NF S96-900:2011).

The biomarker steering committee and steering group of the TTM trial approved this sub-study.

Study end-points

The primary endpoint used in the present sub-study was poor neurological outcome as determined by a cerebral performance category (CPC) score [28] at 6 months of 3, 4 or 5. A CPC score of 3 indicates severe neurological sequelae, 4 indicates coma or vegetative state, and 5 indicates death. Patients with a CPC score of 1 or 2, indicating no or moderate neurological sequelae respectively, were considered as having a good outcome. Determination of CPC was achieved as described in the TTM trial protocol [26]. The secondary end-point considered in this sub-study was survival until the end of the trial.

Assessment of miR-122-5p levels

Circulating levels of miR-122-5p were measured in serum samples collected 48 hours after return of spontaneous circulation (ROSC), as described previously [23, 29] and in the online supplement

(Methods and Figure S1). Levels of miR-122-5p were normalized with Cel-miR-39 and are expressed as number of miR-122-5p copies per µL of serum.

For a time-course experiment, levels of miR-122-5p were also measured in serum samples from a sub-group of 43 patients for whom samples were available at 24, 48 and 72 hours after cardiac arrest.

Assessment of NSE levels

Neuron-specific enolase (NSE) was assessed in serum samples collected 48 hours after ROSC. Measurements were performed in a core laboratory 6 months after completion of the trial, as previously described [9].

Statistical analysis

Demographic and clinical data

Comparisons between two groups of continuous variables were performed using the Mann-Whitney test. Categorical variables were compared with the Chi-square test or the Fisher exact test. A P value <0.05 was considered statistically significant.

Levels of miR-122-5p

Comparisons of miR-122-5p levels between two groups of patients were performed using the Mann-Whitney test. Associations between miR-122-5p levels and co-morbidities were determined using logistic regression. Correlations between miR-122-5p levels and age were determined using the Spearman test on ranks.

Prediction of neurological outcome

Both univariable and multivariable analyses with logistic regression were conducted to assess the association between miR-122-5p after log10 transformation and neurological outcome as determined by dichotomized CPC at 6 months: CPC 1-2 being considered a good neurological outcome (0 value) and CPC 3-5 being considered a poor neurological outcome (1 value). For univariable analyses, the association between miR-122-5p and neurological outcome was assessed using the area under the receiver operating characteristic (ROC) curve (AUC). Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals [95% CI] were computed for an increase of 1 unit for continuous variables, which were centered and scaled. Missing data were computed using 10-fold multiple imputation. Prediction value of multivariable models was estimated using the Akaike information criterion (AIC). Lower AIC is indicative of better model fit. The statistical significance of the decrease in AIC was assessed using the likelihood ratio test. The AIC was chosen to assess the predictive value of models when consecutively adding variables (i.e. miR-122-5p) to a baseline clinical model since it is penalized by the number of variables entered in the model, contrarily to the AUC. This allows to avoid model over fitting by the multiplication of co-variates. The incremental predictive value of miR-122-5p to the baseline model that included demographic and cardiac arrest-related clinical parameters was evaluated by the decrease in AIC and the integrated discrimination improvement (IDI).

Survival analyses

Cox proportional hazards and Kaplan-Meier curves were analyzed to evaluate the association between miR-122-5p after log10 transformation with survival until the end of the trial. For Cox proportional hazards, the association between miR-122-5p and survival was evaluated after adjusting with clinical variables using 10-fold multiple imputation. For Kaplan-Meier analysis, miR-122-5p levels were divided in quartiles.

Softwares

Between-group comparisons were performed using the SigmaPlot v 12.3 software. Prediction and survival analyses were performed using the R statistical environment (3.2.2) with the packages pROC, lmtest, survival and Hmisc.

Results

Patients

A study design flow-chart is displayed in the Online supplement (Figure S2). A total of 939 patients were enrolled in the TTM trial. Among the 36 recruiting sites, 29 sites collected blood samples for sub-studies. In the present sub-study, we included 590 patients who survived the first 24 hours after ROSC and who had blood samples available for miRNA assessment (=miRNA cohort). Serum blood samples obtained 48 hours after ROSC were used for miR-122-5p assessment. This time-point was chosen for consistency with past studies [11, 15, 23, 30] and because the predictive value of NSE was highest 48 hours after cardiac arrest [9]. The miRNA cohort had comparable demographic and clinical characteristics to the entire TTM cohort, except that fewer patients from the miRNA cohort had a medical history of myocardial infarction (Table S1 in the Online supplement). 80 % of patients in the miRNA cohort were males and the median [range] age was 64 (20-94). 307 (52%) patients had a good neurological outcome at 6 months (CPC scores 1-2) and 283 (48%) patients had a poor neurological outcome or died (CPC scores 3-5) (Table 1). Patients with a poor neurological outcome or who died within 6 months

after cardiac arrest were older, had more often co-morbidities and an initial non-shockable rhythm compared to patients with a good neurological outcome. Time from cardiac arrest to ROSC, initial serum lactate levels and the frequency of circulatory shock on admission were higher in patients with poor outcome (Table 1).

Circulating levels of miR-122-5p according to targeted temperature

Of the 590 patients enrolled in this study, 286 (48%) were randomized to 33°C and 304 (52%) to 36°C. 147 (51%) patients randomized to 33°C had a good outcome and 160 (53%) patients randomized to 36°C had a good outcome (p=0.92). In the 33°C group, levels of miR-122-5p were moderately but significantly higher compared to the 36°C group (Figure 1A).

Table 1. Demographic and clinical features of patients with good and poor neurological outcome within the miRNA cohort.

Characteristic	Good outcome (CPC 1-2, n=307)	Poor outcome (CPC 3-5, n=283)	P value
Age, years	60 (20-90)	68 (35-94)	<0.001
Gender			
Male	254 (82.7%)	219 (77.4%)	0.13
Co-morbidities			
Hypertension	100 (32.6%)	133 (47.0%)	<0.001
Diabetes mellitus	31 (10.1%)	52 (18.4%)	0.006
Known IHD	62 (20.2%)	92 (32.5%)	<0.001
Previous MI	45 (14.7%)	64 (22.6%)	0.02
Heart failure	7 (2.3%)	26 (9.2%)	<0.001
COPD	16 (5.2%)	32 (11.3%)	0.01
Renal failure	1 (0.3%)	4 (1.4%)	0.32
Previous cerebral stroke	17 (5.5%)	30 (10.6%)	0.03
Alcohol abuse	7 (2.3%)	10 (3.5%)	0.50
First monitored rhythm			<0.001
VF or non-perfusing VT	282 (91.9%)	193 (68.2%)	
Asystole or PEA	17 (5.5%)	80 (28.3%)	
ROSC after bystander defibrillation	6 (2.0%)	2 (0.7%)	
Unknown	2 (0.7%)	8 (2.8%)	
Witnessed arrest	280 (91.2%)	245 (86.6%)	0.10
Bystander CPR	244 (79.5%)	187 (66.1%)	<0.001
Time from CA to ROSC, min	20 (0-111)	30 (0-170)	<0.001
Initial serum lactate (mmol/l)	4.7 (0.5-20)	6.5 (0.5-25)	<0.001
Shock on admission	24 (7.8%)	48 (17.0%)	0.001

Continuous characteristics are indicated as median (range) and categorical characteristics are indicated as number (frequency). CA: cardiac arrest; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; CPR: cardio-pulmonary resuscitation; IHD: ischemic heart disease; MI: myocardial infarction; PEA: pulseless electric activity; ROSC: return of spontaneously circulation; VF: ventricular fibrillation; VT: ventricular tachycardia.

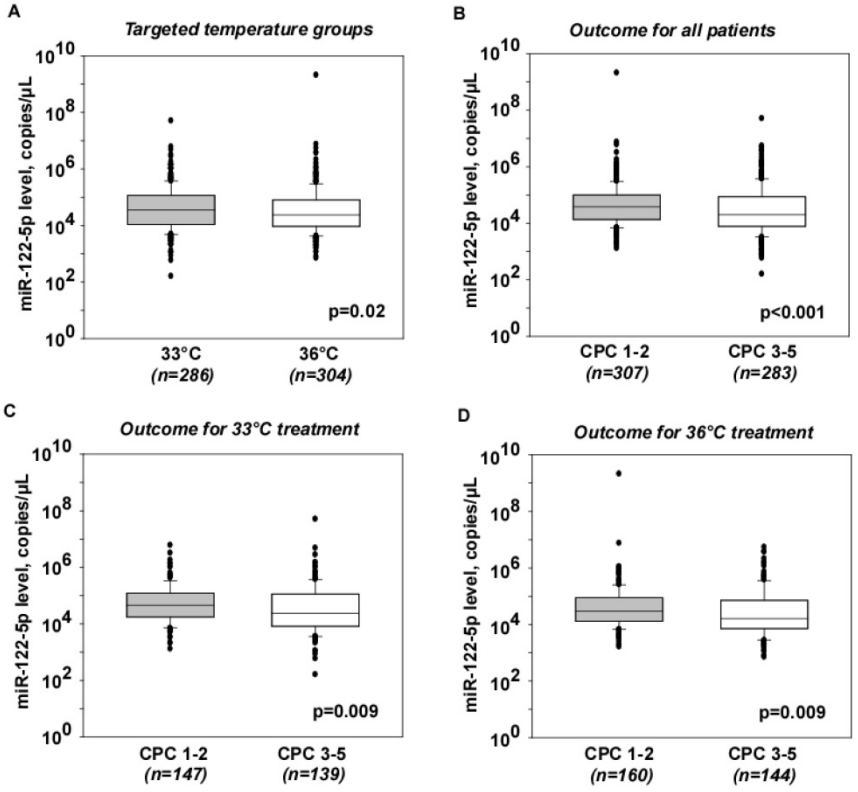


Figure 1. Serum levels of miR-122-5p according to targeted temperature and neurological outcome. Levels of miR-122-5p were assessed 48 hours after ROSC using quantitative PCR in 590 patients. (A) Comparisons of miR-122-5p levels between patients treated at 33°C and patients treated at 36°C. (B-D) Comparisons of miR-122-5p levels between patients with good (CPC 1-2) and poor (CPC 3-5) neurological outcome, independently of targeted temperature (B), in patients treated at 33°C (C) and in patients treated at 36°C (D). Patient numbers are displayed in italics. Levels of miR-122-5p are expressed as copy numbers per µL of serum. Y axes are in log scale. The lower boundary of the boxes indicates the 25th percentile, the horizontal line within the box indicates the median, the higher boundary of the box indicates the 75th percentile, the error bars indicate the 90th and 10th percentiles, and individual dots represent outliers.

Circulating levels of miR-122-5p according to neurological outcome

Levels of miR-122-5p were lower in patients with poor outcome compared to patients with good outcome (Figure 1B). The outlier with high levels of miR-122-5p in the good outcome group did not affect this difference, nor did it affect the prediction analyses, and was therefore kept in all subsequent analyses. The difference in miR-122-5p levels between patients with good and poor outcome was independent of targeted temperature regimen (Figure 1C-D). Consequently, patients were not separated into targeted temperature regimen groups in subsequent analyses.

Association between miR-122-5p levels, co-morbidities, age and gender

Levels of miR-122-5p were inversely associated with chronic heart failure (OR 0.59 [0.35-0.99], n=33) and history of arrhythmias (OR 0.73 [0.54-0.99], n=99). No significant associations were detected with other co-morbidities listed in Table 1. No patient had cirrhosis.

Levels of miR-122-5p were inversely correlated with age (r=-0.24, P<0.001; Figure S3 in the Online supplement), although this correlation was not significant (p=0.43) in linear regression analysis. Levels of miR-122-5p tended to be higher in males compared to females (median $4.6x10^5$ copies/µL vs. $2.7x10^5$ copies/µL, respectively; p=0.08).

Association between miR-122-5p and miR-124-3p levels

Levels of miR-122-5p were positively correlated with the levels of miR-124-3p assessed previously [23] (r=0.35, p<0.001; Figure S4 in the Online supplement).

Time-course of miR-122-5p levels after cardiac arrest

Levels of miR-122-5p were assessed in a sub-group of 43 patients for whom serum samples were available at 24, 48 and 72 hours after cardiac arrest. Levels of miR-122-5p gradually decreased from 24 hours to 72 hours after cardiac arrest, both in the good and poor outcome groups (Figure S5 in the Online supplement).

Prediction of neurological outcome

In univariable analyses, levels of miR-122-5p were associated with 6-month neurological outcome, as determined by dichotomized 6-month CPC (CPC 1-2 vs CPC 3-5), with an AUC of 0.62, 95% CI [0.54-0.63] (Figure 2). Patients with lower levels of miR-122-5p were at high risk for a poor neurological outcome (OR [95% CI]: 0.71 [0.57-0.88]).

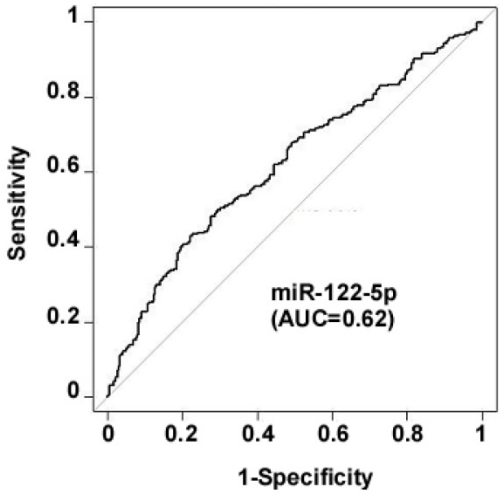


Figure 2. Association between levels of miR-122-5p and neurological outcome. Circulating levels of miR-122-5p were assessed using quantitative PCR in serum samples collected 48 hours after ROSC in 590 patients. Association between miR-122-5p and neurological outcome assessed by dichotomized CPC at 6 months (CPC 1-2 vs. CPC 3-5) was evaluated using logistic regression. ROC curve and AUC are shown.

In multivariable analyses − including age, gender (male), time from cardiac arrest to ROSC, bystander cardiopulmonary resuscitation (CPR), first monitored rhythm (ROSC after defibrillation or ventricular tachycardia (VT)-ventricular fibrillation (VF)), circulatory shock on admission, initial serum lactate levels, NSE levels at 48h, targeted temperature regimen and miR-124-3p −, levels of miR-122-5p were independent predictors of neurological outcome (OR [95% CI]: 0.51 [0.37-0.68]; Figure 3A). Age, first monitored rhythm (VT-VF), NSE and miR-124-3p also had a significant predictive value. Of note, temperature regimen was not associated with neurological outcome, confirming previous data from the main TTM trial [24]. The model reached a specificity of 91% and a sensitivity of 77%.

To evaluate the incremental predictive value of miR-122-5p, we calculated the AIC of models including the demographic and cardiac arrest-related variables described above (=baseline model), with or without miR-122-5p and miR-124-3p. Results are summarized in Table 2. Adding miR-124-3p to the baseline model resulted in a decrease of AIC from 471 (baseline model) to 466 (p=0.01), but failed to reach statistical significant in terms of IDI (0.006 [-0.001-0.013]), p=0.095, as previously reported [23]. Adding miR-122-5p to the baseline model resulted in a decrease of AIC from 471 to 463 (p=0.002) and provided an IDI of 0.016 [0.007-0.025], $p=5.0x10^{-4}$. Addition of miR-122-5p to the baseline model with miR-124-3p decreased the AIC from 466 to 446 (p<0.001) and provided an IDI of 0.03 [0.02-0.04], $p=1.3x10^{-5}$. Furthermore, adding both miR-122-5p and miR-124-3p to the baseline model improved the

prediction (decrease of AIC from 471 to 446, p<0.001, and IDI of 0.04 [0.02-0.05], p=2.6x10^{-6}. Overall, both miR-122-5p and miR-124-3p were necessary to reach the maximal predictive value.

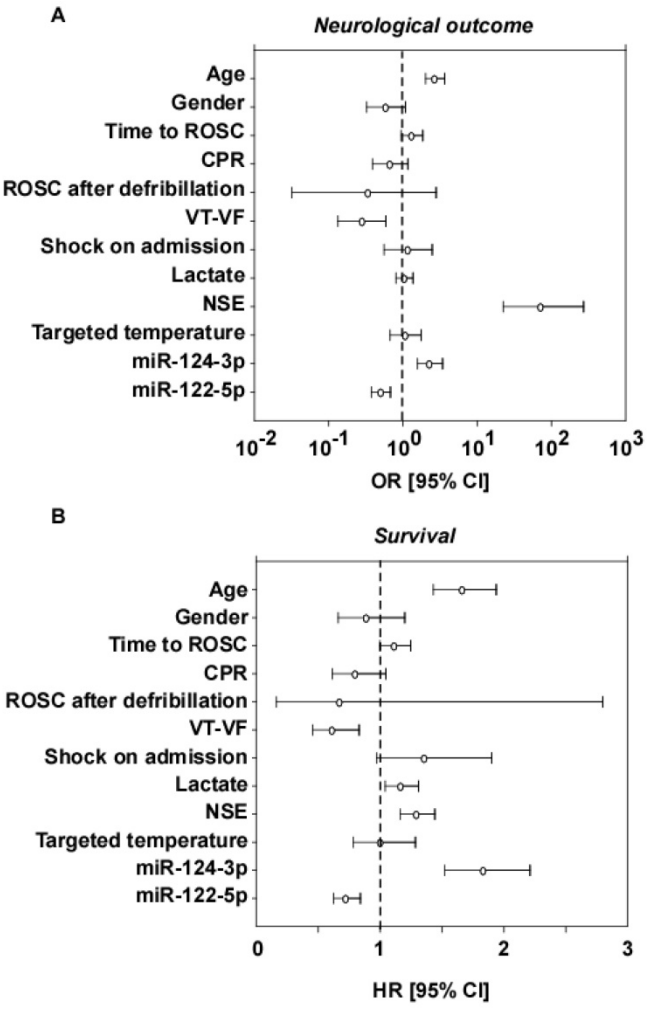


Figure 3. Multivariable analyses. Odds ratios (OR) and hazard ratios (HR) ± 95% confidence intervals (95% CI) are displayed for the prediction of 6-month neurological outcome (A) and survival until the end of the trial (B) respectively. The following variables were included in the models: age, gender (male), time from cardiac arrest to ROSC, bystander cardiopulmonary resuscitation (CPR), first monitored rhythm (ROSC after defibrillation or ventricular tachycardia (VT)-ventricular fibrillation (VF)), circulatory shock on admission initial serum lactate levels, NSE levels at 48h, targeted temperature regimen, and miRNA levels.

Prediction of survival

Cox proportional hazards models and Kaplan-Meier curves were analyzed to assess the association between circulating levels of miR-122-3p and miR-124-3p measured 48 hours after ROSC and survival until the end of the trial. Longest follow-up time was 956 days after cardiac arrest, and median time from cardiac arrest to death was 7 days. 43% of patients were dead at the end of the trial. In Cox proportional hazards models including the same clinical and demographic parameters as used in logistic regression for the prediction of neurological outcome, lower levels of miR-122-5p and higher levels of miR-124-3p predicted a shorter survival (Figure 3B). Age, first monitored rhythm (VT-VF), lactate and NSE were also significantly associated with survival. Targeted temperature regimen was not associated with survival, as previously reported [24]. In Kaplan-Meier analysis, patients within the lowest quartiles of miR-122-5p levels were at high risk of shorter survival (Figure 4). Overall, patients with low levels of miR-122-5p were at high risk of death.

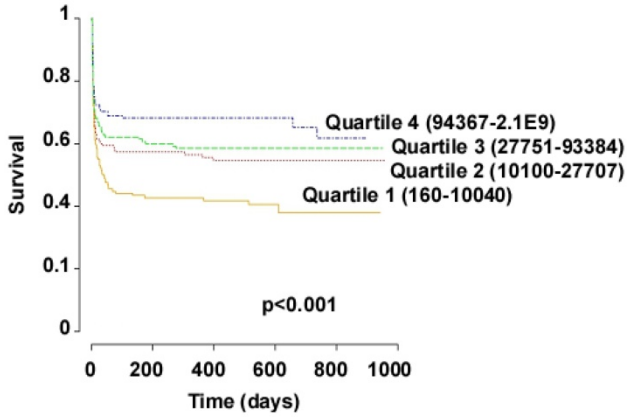


Figure 4. Survival analyses. Kaplan Meier curves show the survival of patients according to their circulating levels of miR-122-5p measured 48 hours after ROSC in 590 patients. Levels of miR-122-5p were divided into quartiles. Ranges of miR-122-5p values in number of copies per µL of serum are indicated for each quartile. P value of Log-Rank test is shown.

Table 2. Incremental value of miR-122-5p to predict neurological outcome as assessed by 6-month CPC score.

Models	AIC	P value	IDI [95% CI]	P value
Baseline model	471	0.01 (vs. baseline)		
+ miR-124-3p	466		0.006 [-0.001-0.013]	0.09
+ miR-122-5p	463	0.002 (vs. baseline)	0.016 [0.007-0.025]	5.0x10^{-4}
		* (vs. baseline + miR-124-3p)	0.010 [-0.004-0.023]	0.17
+ miR-124-3p	446	<0.001 (vs. baseline)	0.04 [0.02-0.05]	2.6x10^{-6}
and miR-122-5p		<0.001 (vs. baseline + miR-124-3p)	0.03 [0.02-0.04]	1.3x10^{-5}

The baseline model includes age, gender, bystander cardiopulmonary resuscitation (CPR), first monitored rhythm, time from cardiac arrest to ROSC, initial serum lactate levels, shock on admission, 48h-NSE, and targeted temperature regimen. Log10-transformed miRNA values were used in these analyses. AIC: Akaike information criteria. Lower AIC indicates a better predictive value. IDI: integrated discrimination improvement.

* The comparison of AIC between the baseline models with miR-124-3p or miR-122-5p could not be performed with the likelihood ratio test because the two models are not nested (i.e. variables of the first model are not a subset of the variables of the second model and vice versa).

Discussion

The association between miRNAs and outcome after out-of-hospital cardiac arrest has been reported previously. Circulating levels of brain-enriched miR-124-3p were associated with outcome in a previous sub-study of the TTM-trial [23]. In the present study, we addressed the value of miR-122-5p to improve outcome prediction after cardiac arrest. We observed that miR-122-5p was an independent predictor of neurological outcome and survival after cardiac arrest and provided an incremental prognostic value.

The selection of miR-122-5p was based on a previous study indicating that this miRNA is associated with outcome after cardiac arrest [15]. Surprisingly, we found in the present study an inverse association between miR-122-5p levels and the risk of poor outcome after cardiac arrest, while miR-122-5p was positively associated with poor neurological outcome and mortality in our previous study [15]. Several explanations might exist for this discrepancy. Two independent cohorts of patients with cardiac arrest were used in the past [15] and present study, which differed substantially with respect to their size and design (small monocentric cohort in the past study versus large multicenter cohort in the present study), but similar in relation to there being no apparent link between miR-122-5p levels and liver function. This is important considering that miR-122 is enriched in the liver. In the present study, miR-122-5p levels were neither associated with the presence of shock on admission, which induces multiple organ damage including the liver, nor with the liver sub-score of the sequential organ failure assessment score [31], which was calculated from the highest bilirubin level each day in the intensive care unit (not shown). Even though fine characterization of liver function was not performed in the TTM-trial, the inverse relationship between miR-122-5p levels and poor outcome does not support a confounding effect of underlying liver disease on the predictive value of miR-122-5p.

The Predictive Safety Testing Consortium (PSTC) of the Safer and Faster Evidence-based Translation (SAFE-T) Consortium estimated the mean circulating levels of miR-122 as approximately 2000 copies/μL in the normal population and the upper limit of normal to 13,000 copies/μL [32]. In our cohort of cardiac arrest patients, 77% of patients from the good outcome group had miR-122-5p levels above 13,000 copies/μL while only 38% of patients from the poor outcome group had such elevated levels. Together with the lower levels of miR-122-5p in the poor outcome group compared to the good outcome group, this observation suggests that patients from the poor outcome group may not be able to increase their levels of miR-122-5p in response to injury. This needs further investigation.

The inverse association with outcome between miR-122-5p and miR-124-3p most likely explains the ability of miR-122-5p to provide an incremental value to a prognostic model including miR-124-3p. The modest yet significant collinearity between the two miRNAs is not strong enough to prevent the incremental value of miR-122-5p. This strengthens the concept that panels of miRNAs with different function or reflecting different pathophysiology are likely to have added value. Such miRNA panels have been reported in the past to predict outcome after acute myocardial infarction [33]. Furthermore, a miR-122-5p/133b ratio has shown some value to predict the risk of developing major adverse events after acute myocardial infarction [34]. In the case of cardiac arrest, adding another brain-enriched miRNA to a model already including miR-124-3p would have a weak chance for providing an incremental predictive value.

The inverse association between age and miR-122-5p may not merely be responsible for the association between miR-122-5p and outcome since, in multivariable analyses, miR-122-5p was an independent predictor in a model including age as a covariate. In addition, the correlation between age and miR-122-5p, even though significant, was weak ($r=-0.24$, $P<0.001$; Spearman test) and lost significance in linear regression. Therefore, despite its correlation with age, miR-122-5p still appears robust as an independent prognostic marker.

This leads to the question of a potential functional link between circulating levels of miR-122-5p and outcome after cardiac arrest. MiR-122-5p is expressed in cultured brain cells [15] but, since it is inversely associated with a poor neurological outcome in the present study, this association may not be only explained by a release of miR-122-5p from dying neuronal cells, as it is believed to be the case for brain-enriched miR-124-3p. The inverse association between miR-122-5p and poor outcome is against a causal relationship between liver failure, circulating levels of miR-122-5p, and poor outcome. Even though miR-122-5p levels were shown to be decreased in patients with renal failure [35], the very low proportion of patients with renal failure in the present study is unable to account per se for the association between miR-122-5p and outcome after cardiac arrest. Overall, miR-122-5p levels were not associated with the different organ-specific sub-scores of the sequential organ failure assessment score (not shown). The decrease of miR-122-5p levels over the 3

days following cardiac arrest may indicate a depletion of liver miR-122-5p at an early stage after cardiac arrest. This would encourage addressing the prognostic value of miR-122-5p at admission or in the few hours after cardiac arrest. Being able to predict outcome at an early stage after cardiac arrest would be of high clinical interest.

In both animal experiments [36] and *in vitro* investigations [37, 38], the use of targeted temperature management (therapeutic hypothermia) modified the expression levels of some miRNAs in the brain. In a cardiogenic shock model in pigs, hypothermia decreased the plasma levels of miR-122-5p [19]. We found that miR-122-5p levels were modestly higher in patients randomized to the 33°C-group compared to patients randomized to 36°C. This difference did not affect the association between miR-122-5p and neurological outcome, and targeted temperature management regimen was not associated with outcome in multivariable analyses. This is consistent with the absence of significant effect of targeted temperature management at 33°C compared to 36°C on neurological outcome observed in the main TTM trial [24].

The main finding of the present study is that miR-122-5p has an incremental prognostic value to a clinical model including the previously described miR-124-3p [23]. This is important since, in our previous study [23], miR-124-3p failed to reach a statistically significant effect on outcome prediction. The incremental value of miR-122-5p observed in the present study was demonstrated in multivariable analyses in which this miRNA increased model fit, as attested by a decrease of AIC, and improved patient classification, as attested by a significant IDI. As a reminder, the AIC was used to assess the predictive value of multivariable models instead of the AUC since it is penalized by the number of variables entered in the model, thus avoiding model over fitting.

Our findings have important potential clinical implications. Identification of novel biomarkers of outcome after cardiac arrest is needed since current biomarkers lack specificity. These novel biomarkers, combined with previously characterized brain-derived proteins such as NSE [9] and S100 beta [39], as well as clinical and neurophysiologic examination, may aid in identification of patients at high risk of poor outcome. Diagnostic assays to measure miRNAs on a routine basis are being implemented [14]. These assays are sensitive, do not require a high volume of blood, can be multiplexed and automated, and may therefore be cost-effective. Presuming that the incremental value of miRNAs for outcome prediction after cardiac arrest can be confirmed in future large-scale studies, multiplex miRNA assays could be developed and used in multimodal prediction algorithms involving clinical examination, neurophysiologic tests and brain imaging. These miRNA assays could aid in personalizing healthcare, not only of patients with cardiac arrest, but also of patients with cerebrovascular diseases such as stroke.

This study has a number of strengths and limitations. One strength is that it is a predefined sub-study of the largest prospective multicenter randomized clinical trial testing the benefit of two target temperature regimens in cardiac arrest patients. Blood samples used for biomarker determination were stored in a single biobank according to best practices and international standards. Furthermore, miR-122-5p assessment was performed in a single laboratory, thus allowing to maximize consistency of sample handling and processing. Measurement of miR-122-5p was performed according to extensively characterized and validated procedures. Levels of miR-122-5p are expressed as an absolute concentration (copy number per µL of serum), while the majority of past miRNA studies reported relative concentrations. Although it may be difficult to implement for weakly expressed miRNAs (which is not the case of miR-122-5p), the absolute quantification method has the advantage of allowing for comparisons of expression levels between different analytical platforms. One limitation relates to the selection of only one miRNA for this study, and it cannot be excluded that other miRNAs might have a further added prognostic value. In addition, this study was performed in a sub-group of patients of the TTM-trial for whom blood samples were available for biomarker studies. However, this sub-group had comparable demographic and clinical characteristics to the entire cohort. The evolution over time of miR-122-5p levels in the 3 days following cardiac arrest was performed in a small subgroup of patients and only miR-122-5p levels measured 48h after ROSC were used in prediction analyses. Further studies are warranted to determine the best time-points for optimal prediction, as well as the influence of renal function on the circulating levels of miRNAs such as miR-122-5p. Finally, a biologically plausible explanation for the inverse association between miR-122-5p levels and outcome remains to be established.

In conclusion, we have shown that miR-122-5p is associated with neurological outcome and survival after cardiac arrest. Levels of miR-122-5p measured 48 after ROSC provide an incremental predictive value and may constitute a novel biomarker to aid in outcome prediction after cardiac arrest.

Abbreviations

AUC: area under the received operating characteristic (ROC) curve; AIC: Akaike information criteria; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; CPC: Cerebral performance category; CPR: cardio-pulmonary resuscitation; HR: hazards ratio; IDI: integrated discrimination improvement; IHD: ischemic heart disease; MI: myocardial infarction; miRNAs: microRNAs; NSE: neuron specific enolase; OR: odds ratio; PEA: pulseless electric activity; ROSC: return of spontaneous circulation; TTM: Target Temperature Management; VF: ventricular fibrillation; VT: ventricular tachycardia

Acknowledgements

We thank all staff from the recruitment sites involved in the biomarker studies. We also thank Olivier Collignon and Francois Fays for expert statistical advice.

Funding

This sub-study was supported by the Ministry of Culture, Higher Education and Research and the National Research Fund of Luxembourg (grants # C14/BM/8225223 and AFR 8832104).

The TTM-trial and the TTM-trial biobank were funded by independent research grants from: Swedish Heart Lung Foundation; Arbetsmarknadens försäkringsaktiebolag (AFA)-insurance Foundation; The Swedish Research Council; Regional research support, Region Skåne; Governmental funding of clinical research within the Swedish NHS (National Health Services); Thelma Zoega Foundation; Krapperup Foundation; Thure Carlsson Foundation; Hans-Gabriel and Alice Trolle-Wachtmeister Foundation for Medical Research; Skåne University Hospital; Sweden, TrygFonden, Denmark, the European Clinical Research Infrastructures Network and the European Critical Care Research Network. There was no commercial funding. Funding organisms did not have any access to the data nor did they have any influence on their analysis or interpretation.

Supplementary Material

Supplementary methods and figures.
http://www.thno.org/v07p2555s1.pdf

Competing Interests

The authors have declared that no competing interest exists.

References

1. Lemiale V, Dumas F, Mongardon N, Giovanetti O, Charpentier J, Chiche JD, et al. Intensive care unit mortality after cardiac arrest: the relative contribution of shock and brain injury in a large cohort. Intensive Care Med. 2013; 39: 1972-80.
2. Dragancea I, Rundgren M, Englund E, Friberg H, Cronberg T. The influence of induced hypothermia and delayed prognostication on the mode of death after cardiac arrest. Resuscitation. 2013; 84: 337-42.
3. Laver S, Farrow C, Turner D, Nolan J. Mode of death after admission to an intensive care unit following cardiac arrest. Intensive Care Med. 2004; 30: 2126-8.
4. Friberg H, Cronberg T, Dunser MW, Duranteau J, Horn J, Oddo M. Survey on current practices for neurological prognostication after cardiac arrest. Resuscitation. 2015; 90: 158-62.
5. Sandroni C, Cariou A, Cavallaro F, Cronberg T, Friberg H, Hoedemaekers C, et al. Prognostication in comatose survivors of cardiac arrest: an advisory statement from the European Resuscitation Council and the European Society of Intensive Care Medicine. Intensive Care Med. 2014; 40: 1816-31.
6. Westhall E, Rossetti AO, van Rootselaar AF, Wesenberg Kjaer T, Horn J, Ullen S, et al. Standardized EEG interpretation accurately predicts prognosis after cardiac arrest. Neurology. 2016; 86: 1482-90.
7. Dragancea I, Horn J, Kuiper M, Friberg H, Ullen S, Wetterslev J, et al. Neurological prognostication after cardiac arrest and targeted temperature management 33 degrees C versus 36 degrees C: Results from a randomised controlled clinical trial. Resuscitation. 2015; 93: 164-70.
8. Nolan JP, Soar J, Cariou A, Cronberg T, Moulaert VR, Deakin CD, et al. European Resuscitation Council and European Society of Intensive Care Medicine Guidelines for Post-resuscitation Care 2015: Section 5 of the European Resuscitation Council Resuscitation Guidelines 2015. Resuscitation. 2015.
9. Stammet P, Collignon O, Hassager C, Wise MP, Hovdenes J, Åneman A, et al. Neuron-Specific Enolase as a Predictor of Death or Poor Neurological Outcome After Out-of-Hospital Cardiac Arrest and Targeted Temperature Management at 33°C and 36°C. J Am Coll Cardiol. 2015; 65: 2104-14.
10. Stammet P, Collignon O, Werer C, Sertznig C, Devaux Y. Bispectral index to predict neurological outcome early after cardiac arrest. Resuscitation. 2014; 85: 1674-80.
11. Stammet P, Wagner DR, Gilson G, Devaux Y. Modeling Serum Level of S100B and Bispectral Index to Predict Outcome After Cardiac Arrest. J Am Coll Cardiol. 2013; 62: 851-8.
12. Devaux Y, Stammet P, Friberg H, Hassager C, Kuiper M, Wise M, et al. MicroRNAs: new biomarkers and therapeutic targets after cardiac arrest? Critical Care. 2015; 19: 54.
13. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105: 10513-8.
14. Goretti E, Wagner DR, Devaux Y. miRNAs as biomarkers of myocardial infarction: a step forward towards personalized medicine? Trends Mol Med. 2014; 20: 716-25.
15. Stammet P, Goretti E, Vausort M, Zhang L, Wagner DR, Devaux Y. Circulating microRNAs after cardiac arrest*. Crit Care Med. 2012; 40: 3209-14.
16. Gilje P, Gidlof O, Rundgren M, Cronberg T, Al-Mashat M, Olde B, et al. The brain-enriched microRNA miR-124 in plasma predicts neurological outcome after cardiac arrest. Crit Care. 2014; 18: R40.
17. Zampetaki A, Mayr M. MicroRNAs in Vascular and Metabolic Disease. Circulation Research. 2012; 110: 508-22.
18. Willeit P, Skroblin P, Kiechl S, Fernandez-Hernando C, Mayr M. Liver microRNAs: potential mediators and biomarkers for metabolic and cardiovascular disease? Eur Heart J. 2016; 37: 3260-6.
19. Andersson P, Gidlof O, Braun OO, Gotberg M, van der Pals J, Olde B, et al. Plasma levels of liver-specific miR-122 is massively increased in a porcine cardiogenic shock model and attenuated by hypothermia. Shock. 2012; 37: 234-8.
20. Nientiedt M, Deng M, Schmidt D, Perner S, Muller SC, Ellinger J. Identification of aberrant tRNA-halves expression patterns in clear cell renal cell carcinoma. Sci Rep. 2016; 6: 37158.
21. Coffey S, Williams MJ, Phillips LV, Galvin IF, Bunton RW, Jones GT. Integrated microRNA and messenger RNA analysis in aortic stenosis. Sci Rep. 2016; 6: 36904.
22. Beaumont J, López B, Hermida N, Schroen B, San José G, Heymans S, et al. microRNA-122 down-regulation may play a role in severe myocardial fibrosis in human aortic stenosis through TGF-β₁ up-regulation. Clinical Science. 2014; 126: 497-506.
23. Devaux Y, Dankiewicz J, Salgado-Somoza A, Stammet P, Collignon O, Gilje P, et al. Association of Circulating MicroRNA-124-3p Levels With Outcomes After Out-of-Hospital Cardiac Arrest: A Substudy of a Randomized Clinical Trial. JAMA Cardiol. 2016; 1: 305-13.
24. Nielsen N, Wetterslev J, Cronberg T, Erlinge D, Gasche Y, Hassager C, et al. Targeted temperature management at 33 degrees C versus 36 degrees C after cardiac arrest. N Engl J Med. 2013; 369: 2197-206.
25. World Medical A. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. JAMA. 2013; 310: 2191-4.
26. Nielsen N, Wetterslev J, al-Subaie N, Andersson B, Bro-Jeppesen J, Bishop G, et al. Target Temperature Management after out-of-hospital cardiac arrest--a

randomized, parallel-group, assessor-blinded clinical trial--rationale and design. Am Heart J. 2012; 163: 541-8.
27. Nielsen N, Winkel P, Cronberg T, Erlinge D, Friberg H, Gasche Y, et al. Detailed statistical analysis plan for the target temperature management after out-of-hospital cardiac arrest trial. Trials. 2013; 14: 300.
28. Booth CM, Boone RH, Tomlinson G, Detsky AS. Is this patient dead, vegetative, or severely neurologically impaired? Assessing outcome for comatose survivors of cardiac arrest. JAMA. 2004; 291: 870-9.
29. Devaux Y, Vausort M, Goretti E, Nazarov PV, Azuaje F, Gilson G, et al. Use of Circulating MicroRNAs to Diagnose Acute Myocardial Infarction. Clin Chem. 2012; 58: 559-67.
30. Gilje P, Koul S, Thomsen JH, Devaux Y, Friberg H, Kuiper M, et al. High-sensitivity troponin-T as a prognostic marker after out-of-hospital cardiac arrest - A targeted temperature management (TTM) trial substudy. Resuscitation. 2016; 107: 156-61.
31. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. Intensive Care Med. 1996; 22: 707-10.
32. Matheis K, Laurie D, Andriamandroso C, Arber N, Badimon L, Benain X, et al. A generic operational strategy to qualify translational safety biomarkers. Drug Discov Today. 2011; 16: 600-8.
33. Devaux Y, Vausort M, McCann GP, Kelly D, Collignon O, Ng LL, et al. A Panel of 4 microRNAs Facilitates the Prediction of Left Ventricular Contractility after Acute Myocardial Infarction. PLoS ONE. 2013; 8: e70644.
34. Cortez-Dias N, Costa MC, Carrilho-Ferreira P, Silva D, Jorge C, Calisto C, et al. Circulating miR-122-5p/miR-133b Ratio Is a Specific Early Prognostic Biomarker in Acute Myocardial Infarction. Circ J. 2016; 80: 2183-91.
35. Rivoli L, Vliegenthart AD, de Potter CM, van Bragt JJ, Tzoumas N, Gallacher P, et al. The effect of renal dysfunction and haemodialysis on circulating liver specific miR-122. Br J Clin Pharmacol. 2017; 83: 584-92.
36. Truettner JS, Alonso OF, Bramlett HM, Dietrich WD. Therapeutic hypothermia alters microRNA responses to traumatic brain injury in rats. J Cereb Blood Flow Metab. 2011; 31: 1897-907.
37. Pilotte J, Dupont-Versteegden EE, Vanderklish PW. Widespread regulation of miRNA biogenesis at the Dicer step by the cold-inducible RNA-binding protein, RBM3. PLoS ONE. 2011; 6: e28446.
38. Dresios J, Aschrafi A, Owens GC, Vanderklish PW, Edelman GM, Mauro VP. Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102: 1865-70.
39. Böttiger BW, Möbes S, Glätzer R, Bauer H, Gries A, Bärtsch P, et al. Astroglial Protein S-100 Is an Early and Sensitive Marker of Hypoxic Brain Damage and Outcome After Cardiac Arrest in Humans. Circulation. 2001; 103: 2694-8.

ONLINE SUPPLEMENT

METHODS

Assessment of miR-122-5p levels

Extraction and quantitative RT-PCR. Total RNA was extracted from serum samples using the miRNeasy serum/plasma kit and the semi-automated QIAcube system (Qiagen) according to the manufacturer' instructions. 200µL of serum was mixed with 1 mL of QIAzol. After 5 min, 3.5µL of spike-in working solution (Qiagen) containing $1.6x10^8$ copies of cel-miR-39 per µL was added to the sample for correction of extraction efficiency. 200µL of chloroform was added during 3 minutes before a centrifugation step of 20 min at 12,000xg and 4°C. The aqueous phase was introduced into the QIAcube. RNA elution was performed using 18µL of water. Reverse transcription of RNA was performed on 12µL of RNA eluate with the miScript reverse transcription II kit and miScript HiFlex buffer (Qiagen). The resulting cDNA was diluted 10-fold before quantitative PCR with the miScript SYBR-green PCR kit (Qiagen). miRNA-specific miScript primer sets were obtained from Qiagen. Amplifications were performed in a CFX96 thermocycler (Bio-Rad). An inter-run calibrator was used in each PCR to correct technical variations between PCR runs.

Absolute quantification of miR-122-5p. Synthetic miR-122-5p mimics (1nmol, Qiagen) were dissolved into 50µL of water to obtain a 20µM stock solution ($1.204x10^{13}$ copies/µL). A working solution was prepared from this stock solution to obtain 10^{10} copies/µL. A 10-fold serial dilution

of miR-122-5p mimics was performed from 10^{10} copies/µL to 10^4 copies/µL. 5µL of each miR-122-5p mimic dilution was reverse transcribed using the HiFlex miScript reverse transcription II kit in presence of 50ng of carrier RNA (Qiagen). Negative reverse transcription controls were obtained with 50ng of carrier RNA only. Quantitative PCR was performed with 4µL of each cDNA after a 10-fold dilution. Each assay was run in duplicate and a standard curve from 10^9 to 10^3 copies per well was produced. The slope of the standard curve (b=-3.244) and the Y-axis intercept (m=41.644) were determined using the CFX96 Manager 3.1 software (Bio-Rad) (Figure S1). The amount of miR-122-5p per well of PCR plate was obtained with the formula: $10^{((Ct\ miR\text{-}122\text{-}5p\ -b)/m)}$. The amount of miR-122-5p per sample was obtained by multiplying this last value with a correction factor of 75 to account for dilutions during the process. The number of copies of miR-122-5p per µL of serum was obtained by dividing this corrected value by the starting volume of serum (200µL).

Normalization. The number of copies of miR-122-5p per µL of serum was normalized by multiplication with a normalization factor, as described by Mitchell and colleagues [1]. This factor was calculated for each serum sample with the following formula: $1/[2^{(median\ cel\text{-}miR\text{-}39\ Ct\ value)-(cel\text{-}miR\text{-}39\ Ct\ value\ of\ the\ given\ sample)}]$, where the median cel-miR-39 Ct value was obtained by calculating the median of cel-miR-39 Ct values of all samples to be compared.

Overall, the normalized miR-122-5p values expressed in number of copies of miR-122-5p per µL of serum was obtained using the formula:

$10^{((Ct\ miR\text{-}122\text{-}5p\ -b)/m)}$ x dilution factor x normalization factor

where dilution factor is 75 / 200

and normalization factor is $1/[2^{(median\ cel\text{-}miR\text{-}39\ Ct\ value)-(cel\text{-}miR\text{-}39\ Ct\ value\ of\ the\ given\ sample)}]$.

TABLES

Table S1. Comparison of the demographic and clinical features of the miRNA cohort and the TTM cohort.

Characteristic	miRNA cohort (n=590)	TTM cohort (n=939)	P value
Age, years	64 (20-94)	65 (20-94)	0.39
Gender			
Male	473 (80%)	761 (81%)	0.72
Co-morbidities			
Hypertension	233 (39%)	374 (40%)	0.95
Diabetes mellitus	83 (14%)	141 (15%)	0.86
Known IHD	154 (26%)	260 (27.7%)	0.67
Previous MI	109 (18%)	193 (21%)	0.004
Heart failure	33 (6%)	61 (6%)	0.77
COPD	48 (8%)	97 (10%)	0.26
Renal failure	5 (1%)	6 (1%)	0.65
Previous cerebral stroke	47 (8%)	73 (8%)	0.96
Alcohol abuse	17 (3%)	37 (4%)	0.54
First monitored rhythm			0.60
VF or non-perfusing VT	475 (80%)	729 (78%)	
Asystole or PEA	97 (16%)	178 (19%)	
ROSC after bystander defibrillation	8 (1%)	13 (1%)	
Unknown	10 (2%)	19 (2%)	
Witnessed arrest	525 (89%)	838 (89%)	0.71
Bystander CPR	431 (73%)	683 (73%)	0.53
Time from cardiac arrest to ROSC (min)	25 (0-170)	25 (0-170)	0.26
Initial serum lactate (mmol/l)	5.7 (0.5-25)	6.0 (0.5-24)	0.41
Circulatory shock on admission	72 (12%)	137 (15%)	0.22

Continuous characteristics are indicated as median (range) and categorical characteristics are indicated as number (frequency). COPD: chronic obstructive pulmonary disease; CPR: cardio-pulmonary resuscitation; IHD: ischemic heart disease; MI: myocardial infarction; PEA: pulseless

electric activity; ROSC: return of spontaneously circulation; VF: ventricular fibrillation; VT: ventricular tachycardia.

Figure S1. Quantitative PCR results for the generation of standard curves for miR-122-5p. Amplification curve (left panel), melting curve (middle panel) and standard curve (right panel) are shown. Negative control (pink color) is composed of carrier RNA only.

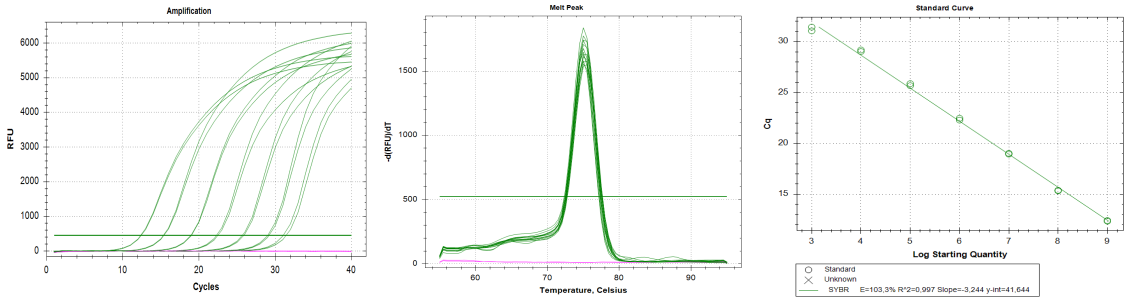


Figure S2. Study flow chart. 590 of the 939 patients of the TTM trial were included in the present sub-study.

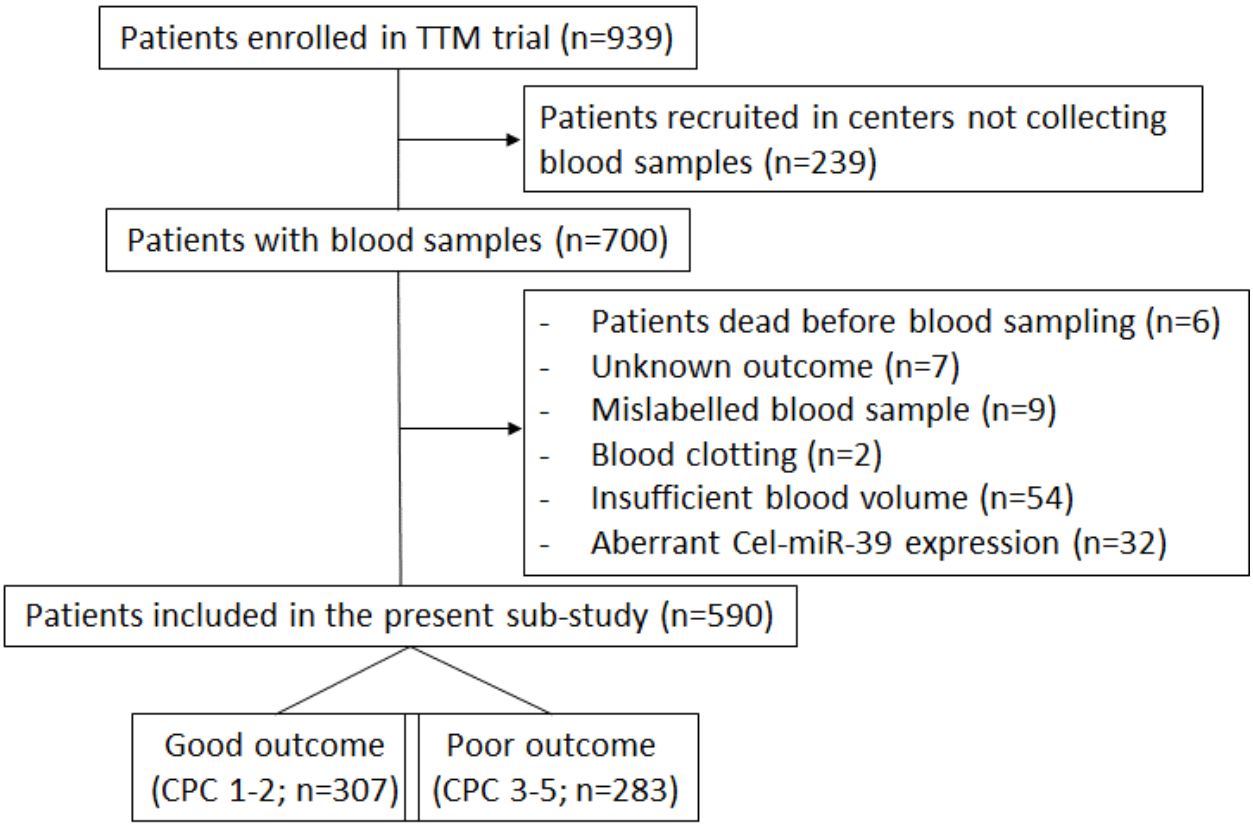


Figure S3. Association between miR-122-5p levels and age. Levels of miR-122-5p were assessed 48 hours after ROSC using quantitative PCR in 590 patients. Correlation coefficient (r) and p value were obtained from Spearman test. Y axis is in log scale.

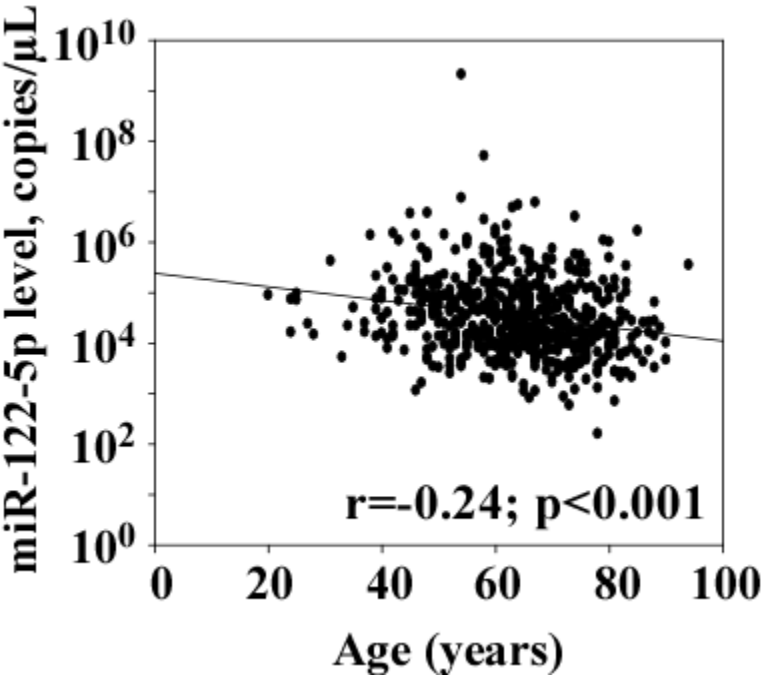


Figure S4. Association between miR-122-5p and miR-124-3p levels. Levels of miR-122-5p were assessed 48 hours after ROSC using quantitative PCR in 590 patients. Levels of miRNAs were assessed in a previous study [2]. Correlation coefficient (r) and p value are from Spearman test. Y axis is in log scale.

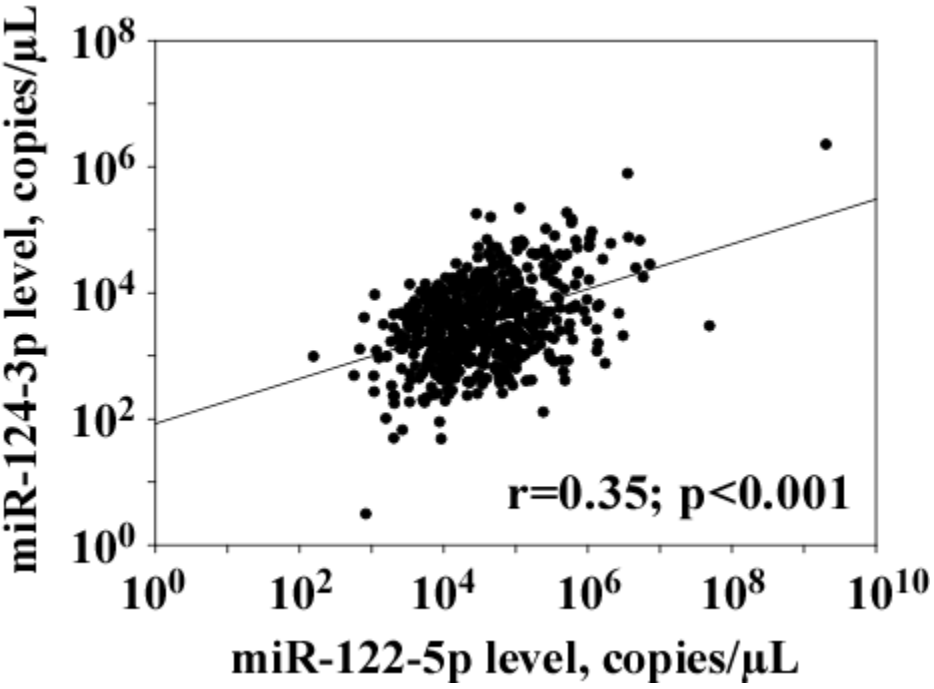
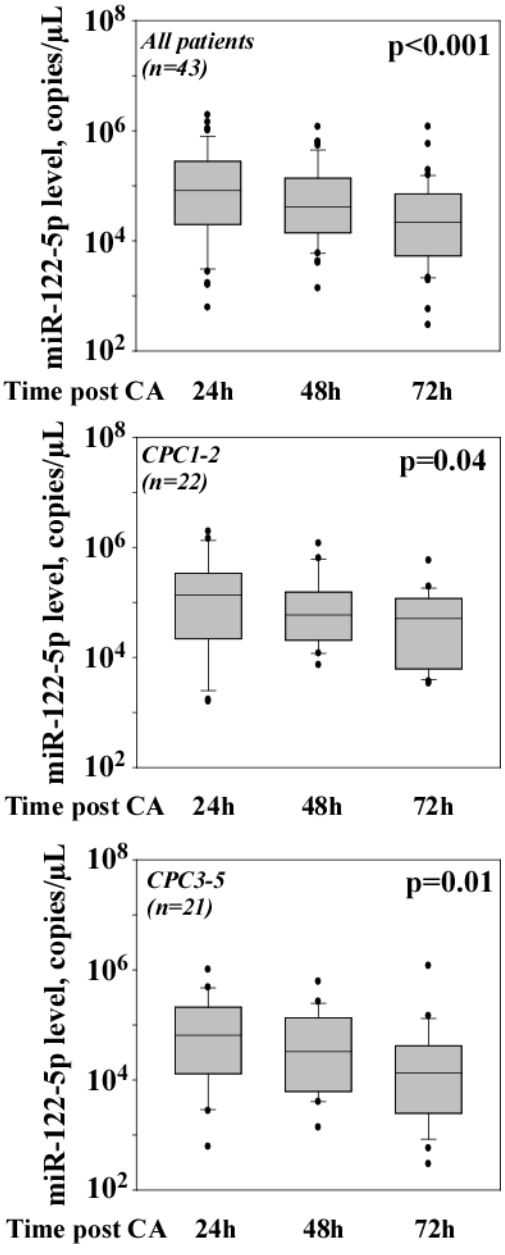


Figure S5. Time-course of circulating levels of miR-122-5p after cardiac arrest. Serum levels of miR-122-5p were assessed by quantitative PCR in 43 patients with blood samples available at 24, 48 and 72 hours after cardiac arrest. Top plot displays data for all patients, middle plot displays data for good outcome patients and bottom plot displays data for poor outcome patients. P values are shown (one-way repeated measures analysis of variance on ranks).



Reference

1. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008; 105: 10513-8.
2. Devaux Y, Dankiewicz J, Salgado-Somoza A, Stammet P, Collignon O, Gilje P, et al. Association of Circulating MicroRNA-124-3p Levels With Outcomes After Out-of-Hospital Cardiac Arrest: A Substudy of a Randomized Clinical Trial. JAMA Cardiol. 2016; 1: 305-13.

4.2. Valeur prédictive du miR-574-5p et spécificité liée au sexe

Cette étude a eu pour but d'étudier la valeur de prédiction de l'évolution neurologique après un AC hors hôpital du miR-574-5p, avec un accent porté sur le genre des patients.

Pour cela, la technique de PCR quantitative a été utilisée pour mesurer l'expression du miR-574-5p dans le plasma de 590 patients ayant survécu à un AC hors hôpital. Ces patients sont inclus dans la cohorte multicentrique TTM. L'évolution neurologique des patients a été évaluée 6 mois post-AC, à l'aide de la classification CPC. La survie fut enregistrée à la fin de l'étude.

Nous avons pu observer que :

- Le miR-574-5p était plus exprimé chez les patients ayant une mauvaise évolution neurologique que chez les patients ayant une bonne évolution neurologique, indépendamment de la température utilisée lors de l'hypothermie thérapeutique.
- Les taux d'expression du miR-574-5p étaient modérément corrélés avec l'âge ($r=0,158$; $p<0,001$), les niveaux de lactate ($r=0,144$, $p<0,001$) et le temps entre l'AC et le RASC ($r=0,118$, $p<0,001$). Ils étaient également associés avec le temps entre l'AC et le RASC (OR [95% CI]: 1,12 [1,03-1,21]), les niveaux initiaux de lactate (OR [95% CI]: 1,16 [1,07-1,26]) et étaient surexprimés chez les patients ayant subi un choc lors de l'admission (OR [95% CI]: 1,62 [1,27-2,05]).
- Le miR-574-5p était un prédicteur univarié de l'évolution neurologique (OR [95% CI]: 1,5 [1,26-1,78]) et de la survie (HR [95% CI]: 1,3 [1,17-1,51]) post-AC.
- Lorsqu'inclus dans un modèle clinique contenant les variables connues comme étant associées à l'évolution cérébrale et la survie post-AC (l'âge, le sexe, le temps entre l'AC et le RACS, l'occurrence de RCP par les témoins, la survenue du RACS après défibrillation, le type de premier rythme monitoré, l'occurrence d'un choc lors de l'admission, les niveaux de lactate (au moment de l'AC) et de NSE (48h post-AC)), le miR-574-5p n'était plus un prédicteur de l'évolution neurologique ou de la survie post-AC .
- En revanche, lorsque le miR-574-5p était inclus dans un modèle contenant les variables associées à l'évolution cérébrale sans les niveaux de NSE, le miR-574-5p était un prédicteur indépendant de l'évolution neurologique post-AC (OR [95% CI]: 1,29 [1,05-1,58]). De plus, les niveaux circulants de miR-574-5p étaient corrélés avec les niveaux de NSE ($r=0,234$; $p<0,001$), ainsi qu'avec les niveaux de protéine S100b ($r=0,29$; $p<0,001$).
- Les niveaux de miR-574-5p étaient positivement corrélés avec les niveaux de NT-proBNP ($r=0,17$; $p<0,001$), de c-TnT-us ($r=0,20$; $p<0,001$) et avec les niveaux de miR-124-3p

(r=0,29 ; p<0,001). Ils n'étaient pas corrélés avec les niveaux de miR-122-5p (r=0,06 ; p=0,19)

- Le miR-574-5p était un prédicteur univarié de l'évolution neurologique et de la survie post-AC chez les hommes (OR [95% CI]: 1,36 [1,13-1,64]) et les femmes (OR [95% CI]: 2,28 [1,44-3,60]).
- Le miR-574-5p est un prédicteur indépendant de l'évolution neurologique post-AC chez les femmes (OR [95% CI]: 1,94 [1,09-3,45]), mais pas chez les hommes.
- Pour les femmes, le modèle de prédiction clinique contenant les variables connues comme étant associées à l'évolution cérébrale et la survie post-AC (l'âge, le sexe, le temps entre l'AC et le RACS, l'occurrence de RCP par les témoins, la survenue du RACS après défibrillation, le type de premier rythme monitoré, la nécessité d'un choc lors de l'admission, les niveaux de lactate (au moment de l'AC) et de NSE (48h post-AC) et la température d'hypothermie thérapeutique utilisée) permettait la prédiction de l'évolution neurologique post-AC avec un AIC de 109,3. L'ajout des niveaux de miR-574-5p dans ce modèle clinique permet d'obtenir une valeur de prédiction avec un AIC de 105,7. L'augmentation de la capacité prédictive apportée par l'ajout du miR-574-5p est significative (IDI de 0,04 [0,0071-0,0794]; p = 0,019, rapport de vraisemblance p=0,018).
- Pour les hommes et les femmes, lorsqu'inclus dans un modèle clinique contenant les variables connues comme étant associées à l'évolution cérébrale et à la survie post-AC (l'âge, le temps entre l'AC et le RACS, une RCP, la survenue du RACS après défibrillation, le type de premier rythme monitoré, la survenue d'un choc lors de l'admission, les niveaux de lactate (au moment de l'AC) et de NSE (48h post-AC)), le miR-574-5p n'était plus un prédicteur de la survie post-AC, En revanche, lorsque le miR-574-5p était inclus dans un modèle contenant les variables associées à l'évolution cérébrale sans les niveaux de NSE, le miR-574-5p était un prédicteur indépendant de la mort post-AC (HR [95% CI]: 1,52 [1,11-2,09]) pour les femmes, mais pas pour les hommes (HR [95% CI]: 1,1 [0,91-1,22]).

Les niveaux circulants de miR-574-5p apparaissent comme étant associés à l'évolution neurologique à 6 mois post-AC chez les femmes.

Circulating levels of miR-574-5p are associated with neurological outcome after cardiac arrest in females

A Target Temperature Management (TTM)-Trial Sub-study

Adeline Boileau MSc[1], Antonio Salgado Somoza, PhD[1], Josef Dankiewicz MD, PhD[2], Pascal Stammet, MD, PhD[3], Patrik Gilje MD, PhD[2], David Erlinge MD-PhD[2], Christian Hassager MD-DMSc[4], Matthew P. Wise MD-DPhil[5], Michael Kuiper, MD-PhD[6], Hans Friberg MD-PhD[7], Niklas Nielsen, MD, PhD[8], Yvan Devaux, PhD[1], and the TTM-trial investigators.

On the behalf of the Cardiolinc™ network (www.cardiolinc.org).

[1]Cardiovascular Research Unit, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg

[2] Department of Cardiology, Clinical Sciences, Lund University and Skane University Hospital, Lund, Sweden

[3]Medical and Health Department, National Fire and Rescue Corps, Luxembourg, Luxembourg

[4]Department of Cardiology B, The Heart Centre, Rigshospitalet University Hospital, Copenhagen, Denmark

[5]Department of Intensive Care, University Hospital of Wales, Cardiff, United Kingdom

[6]Department of Intensive Care, Leeuwarden Medical Centrum, Leeuwarden, The Netherlands

[7]Department of Anesthesia and Intensive Care, Clinical Sciences, Lund University and Skane University Hospital, Lund, Sweden

[8]Department of Anesthesia and Intensive Care, Clinical Sciences, Lund University and Helsingborg Hospital, Helsingborg, Sweden

Address correspondence to Yvan Devaux, Cardiovascular Research Unit, Luxembourg Institute of Health, 1A-B rue Edison, L-1445 Strassen, Luxembourg. Tel: +352 26970300. Fax: +352 26970396. Email: yvan.devaux@lih.lu

Key words: microRNAs, out-of-hospital cardiac arrest, neurological outcome, survival, sex-specific biomarkers

Words count: 2963 **Abstract words count**: 247

Abstract

Rationale

Post-resuscitation neuroprognostication is guided by neurophysiological tests and biomarker measurement. Recent investigations suggest that circulating microRNAs (miRNA) may help in outcome prediction after cardiac arrest. We assessed the ability of miR-574-5p to predict neurological outcome and survival after cardiac arrest, in a sex-specific manner.

Methods

In this sub-study of the Target Temperature Management (TTM)-Trial, we enrolled 590 cardiac arrest patients for which blood samples were available. Expression levels of miR-574-5p were measured by quantitative PCR in plasma samples collected 48h after cardiac arrest. The primary end-point was poor neurological outcome at 6 months (cerebral performance category scores 3 to 5), and the secondary end-point was survival at the end of the trial.

Results

Eighty-one percent of patients were males and 49% had a poor neurological outcome. Circulating levels of miR-574-5p at 48h were higher in patients with a poor neurological outcome at 6 months ($p < 0.001$), independently of both sex and the targeted temperature management regimen (33° vs. 36°C). Circulating levels of miR-574-5p were univariate predictor of neurological outcome (odds ratio (OR) [95% confidence interval (CI)]: 1.5 [1.26-1.78]) and survival (hazard ratio (HR) [95% CI]: 1.3 [1.17-1.51]) and were mildly correlated with levels of neuron-specific enolase (NSE), ($r = 0.234$; $p < 0.001$). After adjustment with clinical variables and NSE, circulating levels of miR-574-5p predicted neurological outcome in women (OR [95% CI]: 1.94 [1.09-3.45]), but not in men (OR [95% CI]: 0.97 [0.73-1.28]).

Conclusion

MiR-574-5p is associated with neurological outcome after cardiac arrest in females.

Abbreviations

AIC: Akaike information criteria

CA: Cardiac arrest

CI: Confidence interval

COPD: Chronic obstructive pulmonary disease

CPC: Cerebral performance category

CPR: Cardio-pulmonary resuscitation

HIF-1a: hypoxia-inducible factor-1a

HR: Hazard ratio

hs-TnT: High-sensitive cardiac troponin

IDI: Integrated discrimination improvement

MI: Myocardial infarction

miRNA: MicroRNA

NSE: Neuron-specific enolase

NT-proBNP: N-terminal pro-brain natriuretic peptide

OHCA: Out-of-hospital cardiac arrest

OR: Odds ratio

ROSC: Return of spontaneous circulation

TTM: Targeted temperature management

VT: Ventricular tachycardia

VF: Ventricular fibrillation

Introduction

Out-of-hospital cardiac arrest (OHCA) is a devastating condition, with overall survival rates lower than 10% [1]. Survival post-OHCA is associated with age [2], bystander cardiopulmonary resuscitation (CPR), type of first monitored rhythm and time from cardiac arrest to return of spontaneous circulation (ROSC) [3]. Whether survival rate differs between men and women is not clear although several studies reported that women had higher survival rates than men [4]. The benefit on survival provided by targeted temperature management, as assessed for instance in the Target Temperature Management (TTM)-trial [5], is still a matter of debate.

It is well documented that the brain is highly sensitive to ischaemia, and half of OHCA survivors suffer neurological damage which impacts their quality of life and survival [6]. Currently, most deaths after OHCA occur after withdrawal of life-supporting therapies in patients with severe and irreversible neurological sequelae [7]. The decision to withdraw life-supporting therapies is currently based on a multi-modal approach including clinical examination, electrophysiological tests (absence of somatosensory evoked potential), electroencephalography, brain imaging and assessment of protein biomarkers such as neuron-specific enolase (NSE) and S100b [8]. Cardiac biomarkers as N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) [9] and high-sensitive cardiac troponin T (hs-TnT) [10] are associated with neurological outcome and death after OHCA, but are not included in guidelines [8]. Despite this multimodal approach, predicting outcome after OHCA, especially at an early stage and in patients with moderate brain damage, is challenging and would benefit from novel biomarkers.

MicroRNAs (miRNA) are small single-stranded RNA molecules that regulate gene expression and are involved in multiple pathophysiological processes. As they circulate in the blood and reflect disease status, they are considered as promising biomarkers towards personalized medicine [11]. Several circulating miRNA have been shown to be associated with outcome after OHCA [12, 13]. Previous studies showed associations between circulating levels of miR-21, miR-124-3p and miR-122-5p and neurological outcome and survival after OHCA [14-17]. The ability of brain-enriched miR-124-3p to predict outcome after OHCA has been validated in a sub-study of the large TTM-trial [18]. A combined use of miR-124-3p and miR-122-5p improved outcome prediction in the same cohort [15].

We hereby aimed to extend previous investigations to novel miRNA which may provide an incremental predictive value. We focused on miR-574-5p which is up-regulated in patients and mice with ischaemic heart disease [19], one of the most frequent cause of cardiac arrest [20]. We also

centred our attention on sex differences, since the knowledge of the effect of sex on prediction modalities after OHCA is limited.

Methods

1. Patients

Nine hundred and thirty nine unconscious adults admitted to an intensive care unit after an OHCA of presumed cardiac cause were enrolled in the TTM-trial, in 36 recruiting centres from November 2010 to July 2013. The trial aimed to evaluate the potential benefit of a targeted temperature management at 33°C compared to 36°C [5]. The TTM-trial and collection of blood samples in participating countries was approved by ethical committees of each participating country and fulfils the declaration of Helsinki [21]. The trial is accessible at www.clinicaltrials.gov (NCT01020916). Design, protocol including statistical analysis, results and interpretation of the results of the trial have been previously published [5, 22, 23]. Blood samples were collected at each site and centrally stored at the Integrated Biobank of Luxembourg, in compliance with the International Society for Biological and Environmental Repositories Best Practices and with International Organization for Standards (ISO 9001:2008, 17025:2005 and NF S96-900:2011).

2. End-points

In the present sub-study, the primary end-point was poor neurological outcome at 6 months after OHCA as assessed with the cerebral performance category (CPC) scale [24]. Briefly, a CPC score of 1 indicates no sequelae or slight disability and a CPC score of 2 corresponds to moderate neurological sequelae or disability. CPC scores 1 and 2 are considered as good neurological outcome. A CPC score of 3 corresponds to severe neurological sequelae or disability, a score of 4 is comatose or persistent vegetative state and a score of 5 is indicative of death. CPC scores 3 to 5 are considered as poor neurological outcome. For each patient, the CPC score was measured as indicated in the TTM trial protocol [22]. Survival at the end of the trial was the secondary end-point used in this sub-study.

3. Measurement of miRNA levels

Samples recovered 48 after ROSC were used to measure circulating levels of miRNA by quantitative PCR as previously described [15, 18] and as detailed in Supplementary Material.

4. Measurement of NSE, hs-TnT, S100b and NT-proBNP levels

Six months after the end of the trial, a core laboratory measured NSE, hs-TnT, S100b and NT-proBNP levels in serum samples recovered 48h after OHCA, as previously described [25] ,[10, 26], [9].

5. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SigmaPlot version 12.5 and R software and is described in details in the Supplementary Material.

Results

1. Patients selection and characteristics

A study design chart is available in the online supplement (Supplementary Fig. **1**). Among the 939 patients of the TTM-trial, plasma samples were available for 593 patients enrolled in 29 of the 36 recruiting centres. Three of these patients were excluded because of missing CPC data, allowing the inclusion of 590 patients in the present sub-study. There was no difference in demographic and clinical features between the whole TTM cohort and the present sub-study cohort (Supplementary Table **1**), apart from a higher prevalence of alcohol abuse in the TTM cohort as compared to the present sub-study (4% vs 1.9%, respectively).

Demographic and clinical characteristics of the 590 patients were compared between patients with good neurological outcome (CPC 1-2) and patients with poor neurological outcome (CPC 3-5). Eighty-one percent of patients were males and 49% had a poor neurological outcome. Patients with a poor neurological outcome were older, more often had comorbidities (hypertension, diabetes mellitus, known ischaemic heart disease, a previous MI, heart failure, chronic obstructive pulmonary disease), had longer time between CA to ROSC, had higher initial levels of serum lactate and less frequently had bystander CPR than patients with a good neurological outcome. A higher proportion of patients with poor neurological outcome presented with shock at admission and had an initial non-shockable rhythm compared to patients with a good neurological outcome.

2. Association between circulating levels of miR-574-5p and patient characteristics

We first sought to determine potential associations between circulating levels of miR-574-5p measured 48h after OHCA and demographic and clinical variables of the patients. Levels of miR-574-5p were moderately associated (OR [95% CI]: 1.2 [1.07-1.25]) and correlated with age (r: 0.17, $p<0.001$), time to ROSC (OR [95% CI]: 1.1 [1.03-1.21]; $r=0.12$, $p<0.001$), initial lactate levels (OR [95% CI]: 1.2 [1.07-1.26]; $r=0.141$, $p<0.001$) and were up-regulated in patients with shock on admission (OR [95% CI]: 1.6 [1.27-2.05], $p<0.001$) (Supplementary Fig. **2A-E**). There was no significant difference in miR-574-5p levels between males and females (Supplementary Fig. **2F**). Also, the association between miR-574-5p levels and first rhythm ventricular tachycardia (VT) or ventricular fibrillation (VF) was of borderline significance ($p=0.052$; Supplementary Fig. **2A**).

3. Circulating levels of miR-574-5p according to neurological outcome and temperature

Levels of miR-574-5p were higher in patients with poor neurological outcome (CPC 3-5), independently of the targeted temperature management regimen (33°C vs 36°C; Fig. **1A-C**). Interestingly, levels of miR-574-5p were higher in patients treated at 33°C (Fig. **1D**).

4. Association between miR-574-5p levels, neurological outcome and death independently of sex

Levels of miR-574-5p measured 48h after OHCA in 590 patients were univariate predictors of neurological outcome (OR [95% CI]: 1.5 [1.26-1.78]) and death at the end of the trial (HR [95% CI]: 1.3 [1.17-1.51]) (Fig. **2A-B**). Multivariable analyses included the following variables: age, sex (female), time from cardiac arrest to ROSC, CPR, first monitored rhythm (ROSC after defibrillation or VT/VF), circulatory shock on admission, initial serum lactate levels, NSE levels at 48h, targeted temperature regimen and miR-574-5p levels. As shown in Fig. **2C-D**, age, first shockable rhythm (VT or VF) and NSE were significant predictors of neurological outcome and death. MiR-574-5p lost statistical significance, both for the prediction of neurological outcome (OR [95% CI]: 1.1 [0.87-1.42]) and death (HR [95% CI]: 0.99 [0.86-1.13]) (Fig. **2C-D)**. After removal of NSE from the multivariable model, the predictive value of miR-574-5p was restored for neurological outcome (OR [95% CI]: 1.3 [1.05-1.58]) but not for death (HR [95% CI]: 1.13 [0.98-1.29]) (Supplementary Fig. **3A-B**). Consistently, we observed a modest but significant correlation between miR-574-5p and NSE levels ($r=0.23$, $p<0.001$), as well as S100b levels ($r=0.29$, $p<0.001$. Supplementary Fig. **3C-D**). In Kaplan-Meier analysis, the patients with the highest levels of miR-574-5p were at high risk of death before 3 months after CA (Fig. **2E**).

We next estimated the incremental predictive value of miR-574-5p to a baseline model including all variables included in multivariable analyses and NSE. The Akaike information criteria (AIC) and the integrated discrimination improvement (IDI) were calculated, bearing in mind that a lower AIC and a higher IDI indicate a better predictive value. When added to the baseline model, miR-574-5p did not improve the prediction of neurological outcome (increase of AIC and IDI [95% CI] 0.0009 [-0.0016-0.0033]). However, when added to the baseline model deprived of NSE, miR-574-5p increased the prediction of neurological outcome as attested by a significant decrease of AIC ($p = 0.0135$), and an IDI [95% CI] of 0.0097 [0.0024-0.0171]).

5. Association between circulating levels of miR-574-5p and cardiac markers

Circulating levels of miR-574-5p were modestly correlated with NT-proBNP levels (r=0.17, p<0.001), hs-TnT levels (r=0.20, p<0.001; Supplementary Fig. **4A-B**).

6. Association between circulating levels of miR-574-5p, miR-124-3p and miR-122-5p

Levels of miR-574-5p were not correlated with circulating levels of miR-122-5p (r=0.06, p=0.19), but were positively correlated with miR-124-3p levels (r=0.29, p<0.001; Supplementary Fig. **5A-B**).

7. Sex-specific association between miR-574-5p levels and neurological outcome

First of all, there was no difference in demographic and clinical characteristics between males and females (Supplementary Table **2**). Circulating levels of miR-574-p 48h after OHCA were comparable between males and females (Supplementary Fig. **2E**).

Levels of miR-574-5p were higher in patients with poor neurological outcome independently from targeted temperature management regimen, in both males (Supplementary Fig. **6A-C**) and females (Supplementary Fig. **7A-C**). Levels of miR-574-5p were higher in patients treated at 33°C compared to patients treated at 36°C, in both males (Supplementary Fig. **6D**) and females (Supplementary Fig. **7D**).

Levels of miR-574-5p were univariate predictors of neurological outcome in men (OR [95% CI]: 1.4 [1.13-1.64]; Fig. **3A**) and women (OR [95% CI]: 2.3 [1.44-3.60]; Fig. **3B**). After adjustment with demographic and clinical variables, miR-574-5p remained an independent predictor of neurological outcome in females (OR [95% CI]: 1.94 [1.09-3.45]) but not in males (OR [95% CI]: 0.97 [0.73-1.27]) (Fig. **3C-D**). Adding miR-574-5p to the baseline clinical model improved the prediction of neurological outcome in females, as attested by a significant decrease of AIC (p = 0.018) and an IDI of 0.04 [0.0071-0.0794]. No incremental value was found in men.

8. Sex-specific association between miR-574-5p levels and death

Kaplan-Meier analysis revealed an association between miR-574-5p and survival at the end of the trial in both males and females, patients with high levels of miR-574-5p being at high risk of short

term survival (Fig. **4A-B**). This was especially relevant for females within the third tertile who had a 75% risk of death in the 6 months following OHCA (Fig. **4B**).

Levels of miR-574-5p were significant univariate predictors of death at the end of the trial in males (HR [95% CI]: 1.25 [1.08-1.45]) and females (HR [95% CI]: 1.61 [1.25-2.07], Fig. **4C-D**). After adjustment with demographic and clinical variables and NSE, miR-574-5p lost its predictive value in males (HR [95% CI]: 0.9 [0.81-1.08]) and was close to statistical significance in females (HR [95% CI]: 1.4 [0.98-2.04]) (Fig. **4E-F**). Removal of NSE from the model restored the independent predictive value of miR-574-5p in females (HR [95% CI]: 1.52 [1.11-2.09]) but not in males (HR [95% CI]: 1.1 [0.91-1.22]) (Supplementary Fig. **8A-B**).

Discussion

This sub-study of the TTM-trial highlighted an association between circulating levels of miR-574-5p measured 48h after OHCA and patient outcome. More specifically, we observed that this miRNA was an independent predictor of 6-month neurological outcome in women, but not in men.

We focused on miR-574-5p in the present study because it has been reported to be up-regulated in plasma samples from patients with ischaemic heart disease [19], a frequent cause of cardiac arrest [20]. However, the association between the first rhythm (VT/VF), often seen as the first clinical manifestation of ischaemic heart disease, and circulating levels of miR-574-5p in the present study was only of borderline significance. Also, circulating levels of miR-574-5p were only modestly correlated with the cardiac markers NT-proBNP and hs-TnT. This might be due to inclusion of all OHCA of cardiac origin patients in the TTM-trial, independently of the presence of ischemia.

In our study, circulating levels of miR-574-5p were higher in patients of the 33°C group. Eskla et al showed that, in HeLa cells, hypothermia at 32°C for 24h increased the expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1a [27], and another study showed that over-expression of HIF-1a led to miR-574-5p over expression [28]. These results suggest HIF-1a may play a role in the higher levels of miR-574-5p observed in patients of the 33°C group. The exact pathway (and the clinical or neurological significance) leading to increased levels of miR-574-5p in the circulation after OHCA remains to be elucidated.

Circulating levels of miR-574-5p were moderately correlated with NSE and S100b levels, suggesting that miR-574-5p may originate, at least in part, from the brain. Indeed, NSE is known to be expressed by neurons whereas S100b is expressed by glial cells. Both are released after brain injury following cardiac arrest [25, 26] or in other neurological conditions such as traumatic brain injury [29, 30]. It is known that miR-574-5p promotes the differentiation of neural progenitor cells into neurons [31]. Furthermore, levels of miR-574-5p were decreased in the brain of mice following injury by exposure to fine particles and an increase of miR-574-5p levels restored synaptic and cognitive impairment caused by fine particle exposure [32]. Thus, miR-574-5p appears to be involved in brain injury and it might be released by the injured brain, in a similar manner to NSE or S100b. Of note, the blood-brain-barrier is disrupted after an ischaemic event [33], allowing the release of miRNA expressed by brain cells into the circulation [34, 35]. Further animal experiments would be needed to test whether miR-574-5p is effectively released from the brain after cardiac arrest. Such studies would allow characterization of the tissue and cellular origin of miR-574-5p which remains poorly known.

Other miRNA have been previously studied in the context of OHCA, a number of them having shown potential as prognostic indicators [12]. In the TTM-cohort, both miR-124-3p and miR-122-5p showed strong associations with neurological outcome and survival [15, 18]. MiR-124-3p is enriched in the brain. The correlation between miR-574-5p and miR-124-3p reinforces the possibility that miR-574-5p could be released from the injured brain after OHCA. In previous smaller-scale studies, miR-21 and miR-122-5p were also considered as potential prognostic biomarkers [14, 16], although a recent small trial did not report significant associations between admission levels of miR-122-5p and all-cause mortality [17]. This lack of association might be due to the time of measurement (admission vs 48h post OHCA), and this highlights the need for future studies with serial assessment of miRNA, from admission to a few days after OHCA. This would determine the kinetics of miRNA release after cardiac arrest as well as the optimal time-point(s) for measurement, as studies on the kinetics of miRNA levels after cardiac arrest are sparse.

Sex-disparities have been reported in the context of cardiac arrest, for instance a lower proportion of witnessed OHCA occur in females [36] or the fact that females have less OHCA from cardiac aetiology than men [37]. Differences in treatment modalities, such as the utilization of coronary angiography, have been reported [38, 39]. Despite these, and after adjustment with confounders, no significant difference in mortality between males and females has been reported [39, 40], including in the TTM-trial [36]. This is consistent with our present sub-study in which sex was not associated with neurological outcome or survival. We report here for the first time a sex-specific association between a candidate biomarker and outcome after OHCA. More specifically, we present data supporting a prognostic value of miR-574-5p in females but not in males.

From a clinical point of view, predicting neurological outcome after OHCA represents a step forward towards personalized medicine. Predicting outcome at an early stage after OHCA would allow clinicians to optimize therapies in patients who would mostly likely benefit whilst guiding early decision making in patients with irreversible and severe neurological sequelae, thereby avoiding long and painful waiting periods for relatives [12, 13]. Novel biomarkers will increase the accuracy of current multimodal prediction tools and circulating miRNA may have the potential to attain an optimal predictive value. It will be important to conduct future studies in a sex-specific manner to avoid extrapolating results obtained on a mainly male population to women.

The limitations of this study are as follows. First, the choice of miR-574-5p relied on a known association with ischaemic heart disease while many other miRNA are regulated in the ischaemic heart [11] and may also deserve further investigation in the context of OHCA. Second, we did not determine the cellular origin of miR-574-5p, which should be further investigated. Third, miR-574-

5p was measured at a single time-point. Fourth, our patient population contained only 109 women compared to 481 men, a difference which decreased the power of the study.

Conclusion

We identified miR-574-5p as a female-specific predictor of neurological outcome after OHCA. Our data require further independent and large-scale testing of the ability of miR-574-5p to predict outcome after OHCA, focusing on sex disparities.

Conflicts of Interest

Conflicts of interest: none.

Acknowledgements

We would like to thank all the staff involved in each recruitment sites of TTM-trial.

Funding

A.B. is funded by the National Research Fund of Luxembourg (grant # AFR 8832104). A.S.S. is funded by the National Research Fund of Luxembourg (grants # C14/BW1/8225223 and C17/BM/11613033). Y.D. is supported by the National Research Fund and the Ministry of Higher Education and Research of Luxembourg.

The TTM-trial and the TTM-trial biobank were funded by independent research grants from: Swedish Heart Lung Foundation; Arbetsmarknadens försäkringsaktiebolag (AFA)-insurance Foundation; The Swedish Research Council; Regional research support, Region Skåne; Governmental funding of clinical research within the Swedish NHS (National Health Services); Thelma Zoega Foundation; Krapperup Foundation; Thure Carlsson Foundation; Hans-Gabriel and Alice Trolle-Wachtmeister Foundation for Medical Research; Skåne University Hospital; Sweden, TrygFonden, Denmark, the European Clinical Research Infrastructures Network and the European Critical Care Research Network. There was no commercial funding. Funding organisms did not have any access to the data nor did they have any influence on their analysis or interpretation.

References

[1] Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation. 2017;135:e146-e603.

[2] Bougouin W, Lamhaut L, Marijon E, Jost D, Dumas F, Deye N, et al. Characteristics and prognosis of sudden cardiac death in Greater Paris: population-based approach from the Paris Sudden Death Expertise Center (Paris-SDEC). Intensive Care Med. 2014;40:846-54.

[3] Perkins GD, Jacobs IG, Nadkarni VM, Berg RA, Bhanji F, Biarent D, et al. Cardiac Arrest and Cardiopulmonary Resuscitation Outcome Reports: Update of the Utstein Resuscitation Registry Templates for Out-of-Hospital Cardiac Arrest: A Statement for Healthcare Professionals From a Task Force of the International Liaison Committee on Resuscitation (American Heart Association, European Resuscitation Council, Australian and New Zealand Council on Resuscitation, Heart and Stroke Foundation of Canada, InterAmerican Heart Foundation, Resuscitation Council of Southern Africa, Resuscitation Council of Asia); and the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee and the Council on Cardiopulmonary, Critical Care, Perioperative and Resuscitation. Resuscitation. 2015;96:328-40.

[4] Bougouin W, Mustafic H, Marijon E, Murad MH, Dumas F, Barbouttis A, et al. Gender and survival after sudden cardiac arrest: A systematic review and meta-analysis. Resuscitation. 2015;94:55-60.

[5] Nielsen N, Wetterslev J, Cronberg T, Erlinge D, Gasche Y, Hassager C, et al. Targeted temperature management at 33 degrees C versus 36 degrees C after cardiac arrest. N Engl J Med. 2013;369:2197-206.

[6] Grasner JT, Lefering R, Koster RW, Masterson S, Bottiger BW, Herlitz J, et al. EuReCa ONE-27 Nations, ONE Europe, ONE Registry: A prospective one month analysis of out-of-hospital cardiac arrest outcomes in 27 countries in Europe. Resuscitation. 2016;105:188-95.

[7] Dragancea I, Rundgren M, Englund E, Friberg H, Cronberg T. The influence of induced hypothermia and delayed prognostication on the mode of death after cardiac arrest. Resuscitation. 2013;84:337-42.

[8] Nolan JP, Soar J, Cariou A, Cronberg T, Moulaert VR, Deakin CD, et al. European Resuscitation Council and European Society of Intensive Care Medicine Guidelines for Post-resuscitation Care

2015: Section 5 of the European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015. Resuscitation. 2015;95:202-22.

[9] Frydland M, Kjaergaard J, Erlinge D, Stammet P, Nielsen N, Wanscher M, et al. Usefulness of Serum B-Type Natriuretic Peptide Levels in Comatose Patients Resuscitated from Out-of-Hospital Cardiac Arrest to Predict Outcome. The American journal of cardiology. 2016;118:998-1005.

[10] Gilje P, Koul S, Thomsen JH, Devaux Y, Friberg H, Kuiper M, et al. High-sensitivity troponin-T as a prognostic marker after out-of-hospital cardiac arrest - A targeted temperature management (TTM) trial substudy. Resuscitation. 2016;107:156-61.

[11] Goretti E, Wagner DR, Devaux Y. miRNAs as biomarkers of myocardial infarction: a step forward towards personalized medicine? Trends Mol Med. 2014;20:716-25.

[12] Devaux Y, Stammet P, Cardiolinc n. What's new in prognostication after cardiac arrest: microRNAs? Intensive Care Med. 2018;44:897-9.

[13] Devaux Y, Stammet P, Friberg H, Hassager C, Kuiper MA, Wise MP, et al. MicroRNAs: new biomarkers and therapeutic targets after cardiac arrest? Crit Care. 2015;19:54.

[14] Gilje P, Gidlof O, Rundgren M, Cronberg T, Al-Mashat M, Olde B, et al. The brain-enriched microRNA miR-124 in plasma predicts neurological outcome after cardiac arrest. Crit Care. 2014;18:R40.

[15] Devaux Y, Salgado-Somoza A, Dankiewicz J, Boileau A, Stammet P, Schritz A, et al. Incremental Value of Circulating MiR-122-5p to Predict Outcome after Out of Hospital Cardiac Arrest. Theranostics. 2017;7:2555-64.

[16] Stammet P, Goretti E, Vausort M, Zhang L, Wagner DR, Devaux Y. Circulating microRNAs after cardiac arrest. Crit Care Med. 2012;40:3209-14.

[17] Gilje P, Frydland M, Bro-Jeppesen J, Dankiewicz J, Friberg H, Rundgren M, et al. The association between plasma miR-122-5p release pattern at admission and all-cause mortality or shock after out-of-hospital cardiac arrest. Biomarkers. 2018:1-25.

[18] Devaux Y, Dankiewicz J, Salgado-Somoza A, Stammet P, Collignon O, Gilje P, et al. Association of Circulating MicroRNA-124-3p Levels With Outcomes After Out-of-Hospital Cardiac Arrest: A Substudy of a Randomized Clinical Trial. JAMA Cardiol. 2016;1:305-13.

[19] Zhou J, Shao G, Chen X, Yang X, Huang X, Peng P, et al. miRNA 206 and miRNA 574-5p are highly expression in coronary artery disease. Biosci Rep. 2015;36:e00295.

[20] Zaman S, Kovoor P. Sudden cardiac death early after myocardial infarction: pathogenesis, risk stratification, and primary prevention. Circulation. 2014;129:2426-35.

[21] World Medical A. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. JAMA. 2013;310:2191-4.

[22] Nielsen N, Wetterslev J, al-Subaie N, Andersson B, Bro-Jeppesen J, Bishop G, et al. Target Temperature Management after out-of-hospital cardiac arrest--a randomized, parallel-group, assessor-blinded clinical trial--rationale and design. Am Heart J. 2012;163:541-8.

[23] Nielsen N, Winkel P, Cronberg T, Erlinge D, Friberg H, Gasche Y, et al. Detailed statistical analysis plan for the target temperature management after out-of-hospital cardiac arrest trial. Trials. 2013;14:300.

[24] Booth CM, Boone RH, Tomlinson G, Detsky AS. Is this patient dead, vegetative, or severely neurologically impaired? Assessing outcome for comatose survivors of cardiac arrest. JAMA. 2004;291:870-9.

[25] Stammet P, Collignon O, Hassager C, Wise MP, Hovdenes J, Aneman A, et al. Neuron-Specific Enolase as a Predictor of Death or Poor Neurological Outcome After Out-of-Hospital Cardiac Arrest and Targeted Temperature Management at 33 degrees C and 36 degrees C. Journal of the American College of Cardiology. 2015;65:2104-14.

[26] Stammet P, Dankiewicz J, Nielsen N, Fays F, Collignon O, Hassager C, et al. Protein S100 as outcome predictor after out-of-hospital cardiac arrest and targeted temperature management at 33 degrees C and 36 degrees C. Crit Care. 2017;21:153.

[27] Eskla KL, Porosk R, Reimets R, Visnapuu T, Vasar E, Hundahl CA, et al. Hypothermia augments stress response in mammalian cells. Free Radic Biol Med. 2018;121:157-68.

[28] Xie Y, Li W, Feng J, Wu T, Li J. MicroRNA-363 and GATA-1 are regulated by HIF-1alpha in K562 cells under hypoxia. Molecular medicine reports. 2016;14:2503-10.

[29] Sogut O, Guloglu C, Orak M, Sayhan MB, Gokdemir MT, Ustundag M, et al. Trauma scores and neuron-specific enolase, cytokine and C-reactive protein levels as predictors of mortality in patients with blunt head trauma. J Int Med Res. 2010;38:1708-20.

[30] Thelin EP, Nelson DW, Bellander BM. A review of the clinical utility of serum S100B protein levels in the assessment of traumatic brain injury. Acta Neurochir (Wien). 2017;159:209-25.

[31] Zhang W, Thevapriya S, Kim PJ, Yu WP, Je HS, Tan EK, et al. Amyloid precursor protein regulates neurogenesis by antagonizing miR-574-5p in the developing cerebral cortex. Nat Commun. 2014;5:3330.

[32] Ku T, Li B, Gao R, Zhang Y, Yan W, Ji X, et al. NF-kappaB-regulated microRNA-574-5p underlies synaptic and cognitive impairment in response to atmospheric PM2.5 aspiration. Part Fibre Toxicol. 2017;14:34.

[33] Gourash L, Puig-Antich J. Medical and biologic aspects of adolescent depression. Semin Adolesc Med. 1986;2:299-310.

[34] Gan CS, Wang CW, Tan KS. Circulatory microRNA-145 expression is increased in cerebral ischemia. Genet Mol Res. 2012;11:147-52.

[35] Jeyaseelan K, Lim KY, Armugam A. MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion. Stroke. 2008;39:959-66.

[36] Winther-Jensen M, Kjaergaard J, Wanscher M, Nielsen N, Wetterslev J, Cronberg T, et al. No difference in mortality between men and women after out-of-hospital cardiac arrest. Resuscitation. 2015;96:78-84.

[37] Herlitz J, Engdahl J, Svensson L, Young M, Angquist KA, Holmberg S. Is female sex associated with increased survival after out-of-hospital cardiac arrest? Resuscitation. 2004;60:197-203.

[38] Waldo SW, Armstrong EJ, Kulkarni A, Hoffmayer K, Kinlay S, Hsue P, et al. Comparison of clinical characteristics and outcomes of cardiac arrest survivors having versus not having coronary angiography. The American journal of cardiology. 2013;111:1253-8.

[39] Winther-Jensen M, Hassager C, Kjaergaard J, Bro-Jeppesen J, Thomsen JH, Lippert FK, et al. Women have a worse prognosis and undergo fewer coronary angiographies after out-of-hospital cardiac arrest than men. Eur Heart J Acute Cardiovasc Care. 2018;7:414-22.

[40] Bosson N, Kaji AH, Fang A, Thomas JL, French WJ, Shavelle D, et al. Sex Differences in Survival From Out-of-Hospital Cardiac Arrest in the Era of Regionalized Systems and Advanced Post-Resuscitation Care. J Am Heart Assoc. 2016;5.

Figures

Figure 1. Plasma levels of miR-574-5p according to targeted temperature and neurological outcome. Plasma levels of miR-574-5p were measured in 590 patients 48h after ROSC using quantitative PCR and were compared between patients with good (CPC 1-2) and poor (CPC 3-5) neurological outcome in all patients (**A)**, patients treated at 33°C (**B**) and patients treated at 36°C (**C**). **D.** Levels of miR-574-5p between patients treated at 33°C and patients treated at 36°C. Box plots represent the median and quartiles. Levels of miR-574-5p are expressed as number of copies per microliter of plasma and are log-scaled.

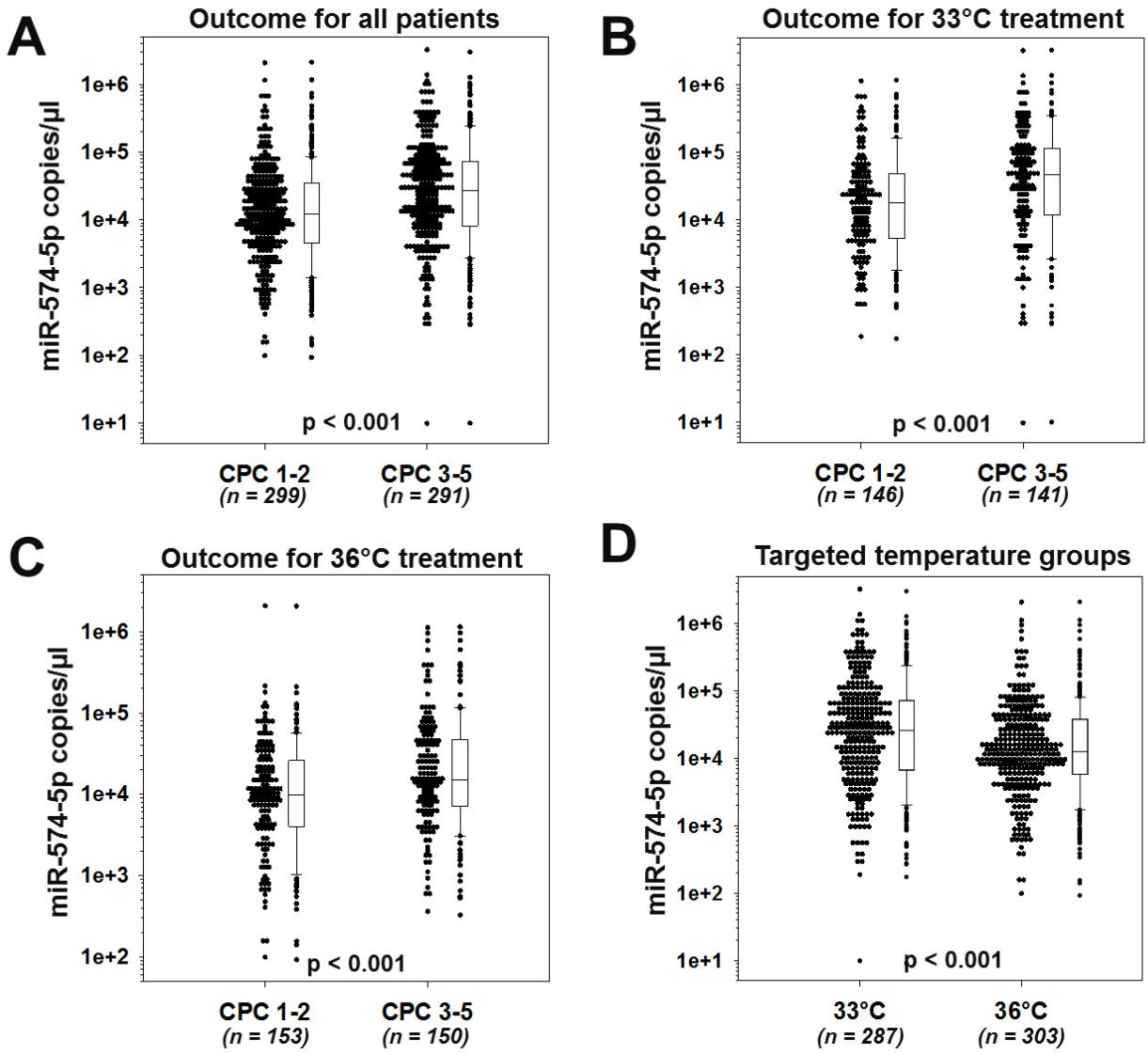
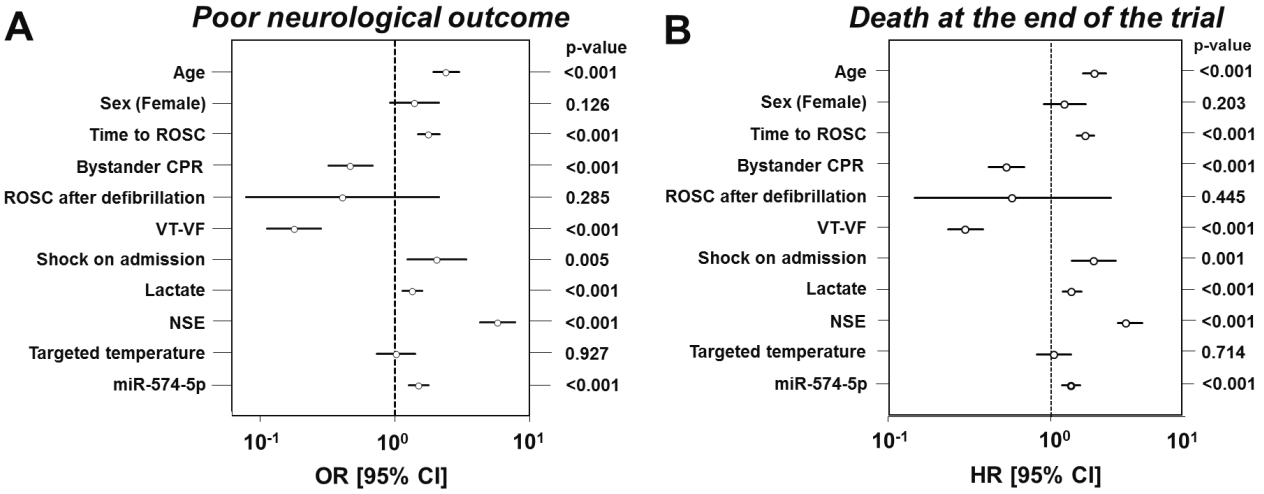
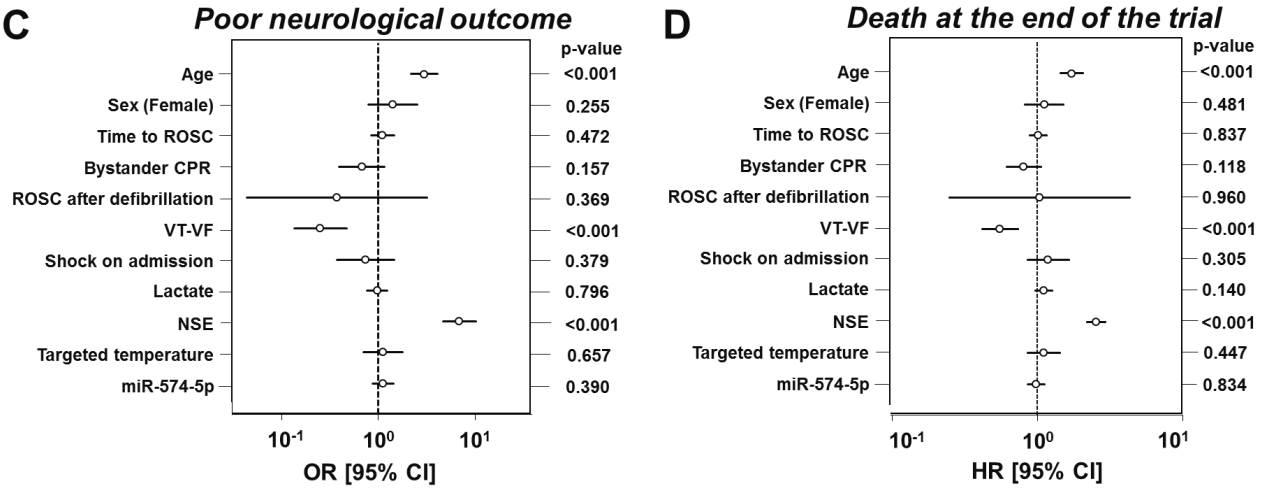


Figure 2. Association between miR-574-5p levels, neurological outcome and survival in 590 patients. Univariate analyses (**A-B**) and multivariable analyses (**C-D**) were performed for the association between miR-574-5p and neurological outcome (**A, C**), and between miR-574-5p and death at the end of the trial (**B, D**). Odds ratios (OR) ± 95% confidence intervals (95% CI) are shown for the prediction of poor neurological outcome 6 months after OHCA. Hazard ratios (HR) ± 95% CI are shown for the prediction of death at the end of the trial. Variables included in the models are: age, sex (female), time from cardiac arrest to ROSC, bystander cardiopulmonary resuscitation (CPR), first monitored rhythm [ROSC after defibrillation or ventricular tachycardia (VT)-ventricular fibrillation (VF)], circulatory shock on admission, initial serum lactate levels, NSE levels at 48h, targeted temperature regimen and miR-574-5p levels.. **E.** Survival analysis: Kaplan Meier curve displays the survival of 590 patients according to their levels of miR-574-5p divided into tertiles. For each tertile, ranges of miR-574-5p are indicated in number of copies per µl of plasma. P value of the Log-Rank test is shown. For each tertile, the number of patients at risk is indicated.

Univariate analysis



Multivariable analysis



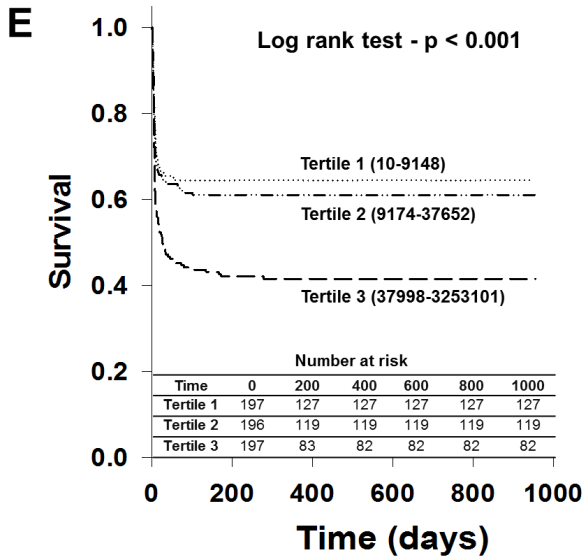


Figure 3. Sex-specific association between miR-574-5p levels and neurological outcome. Univariate (**A-B**) and multivariable analyses (**C-D**) of the association between plasma miR-574-5p levels measured 48h after OHCA and neurological outcome in 481 men and 109 women. Odds ratios (OR) ± 95% confidence intervals (95% CI) are shown for the prediction of poor neurological outcome 6 months after OHCA. Variables included in the models: age, time from cardiac arrest to ROSC, bystander cardiopulmonary resuscitation (CPR), first monitored rhythm (ROSC after defibrillation or ventricular tachycardia (VT)-ventricular fibrillation (VF)), circulatory shock on admission, initial serum lactate levels, NSE levels at 48h, targeted temperature regimen and miR-574-5p levels. No female had ROSC after defibrillation.

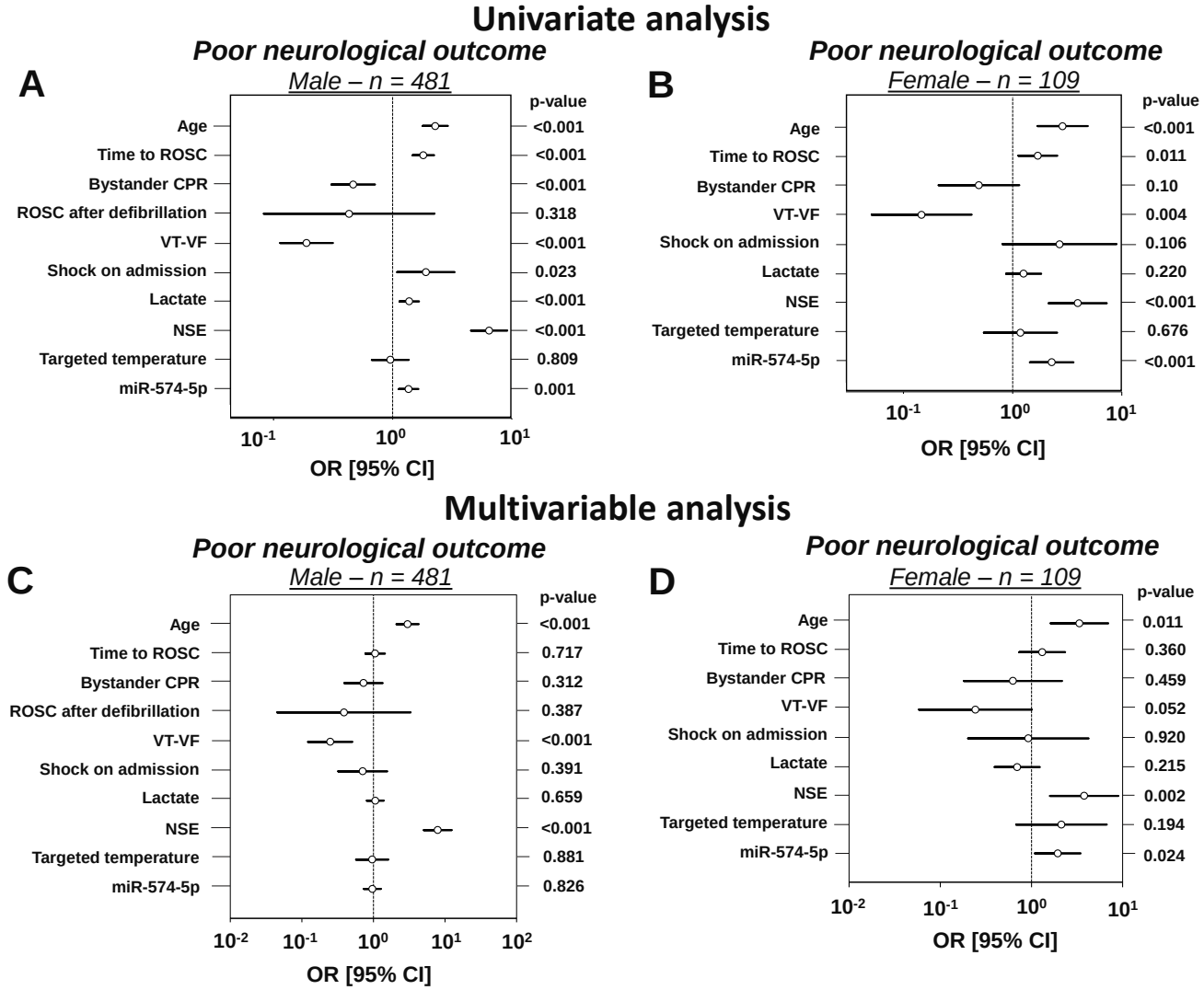
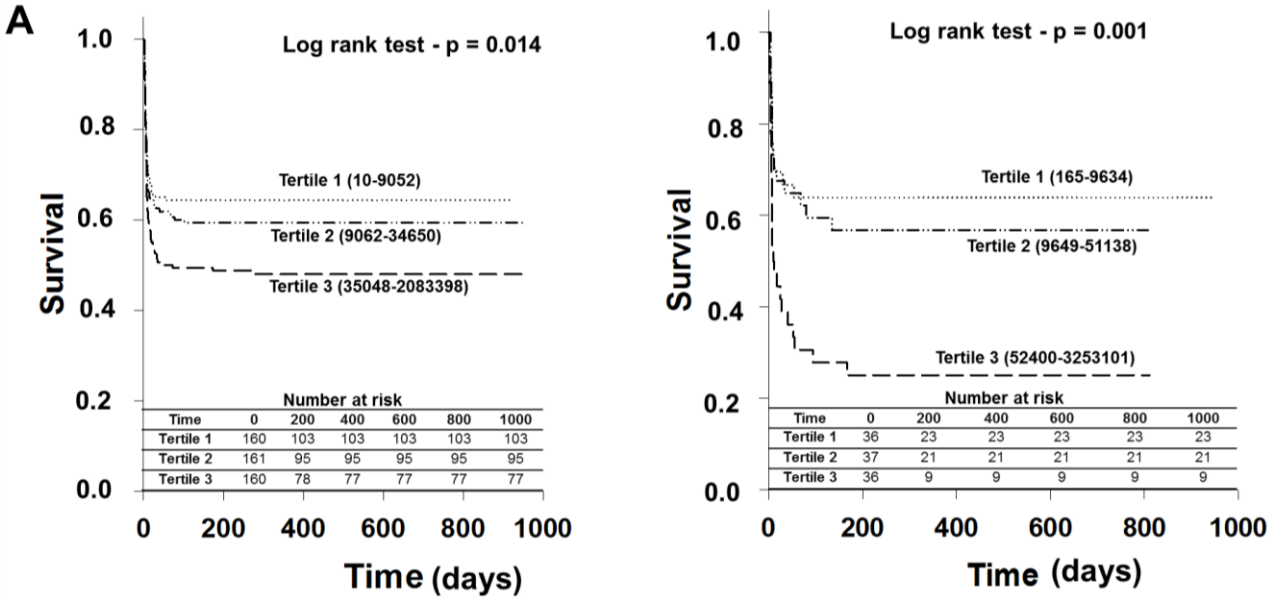
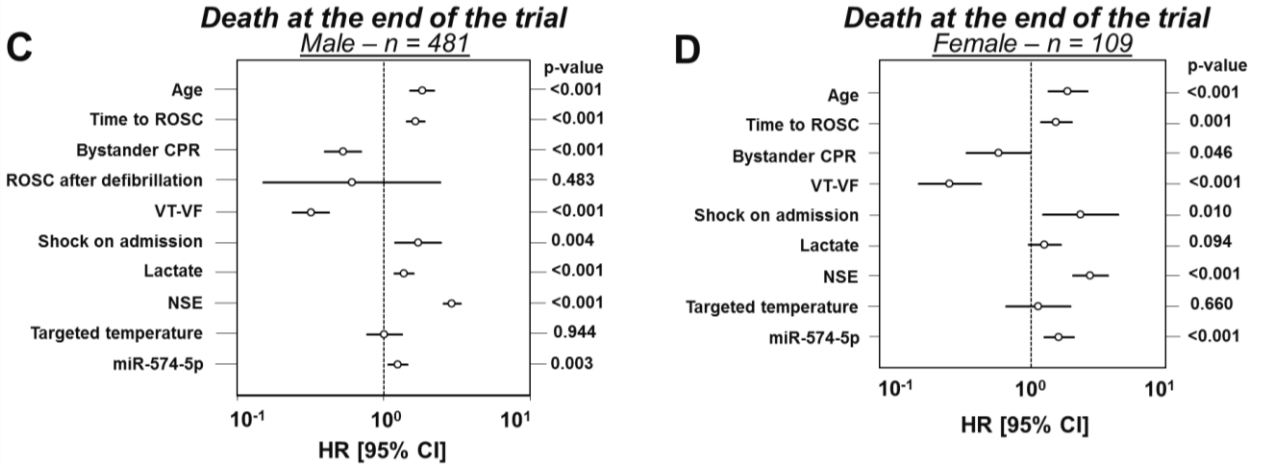


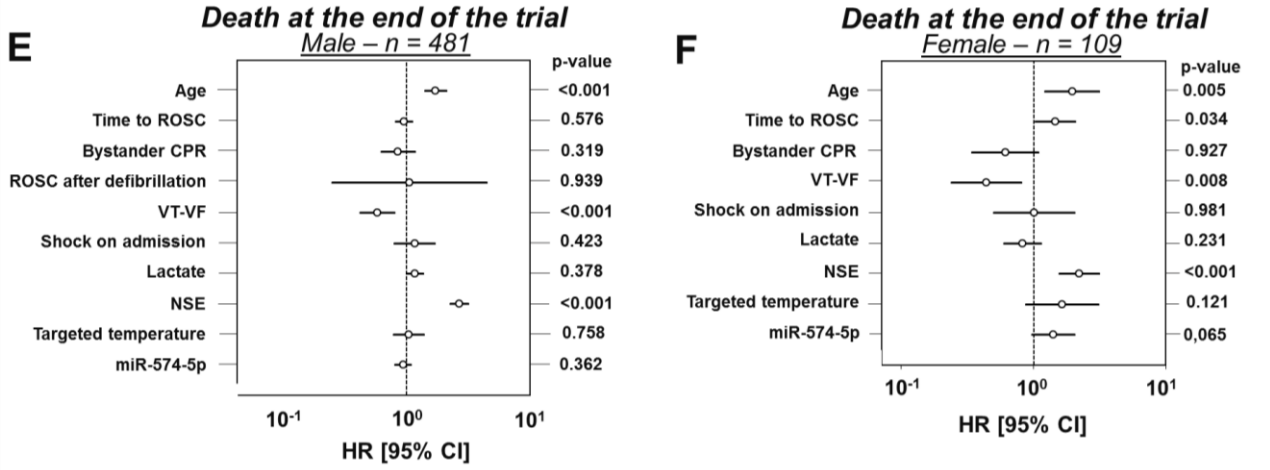
Figure 4. Sex-specific association between miR-574-5p levels and death at the end of the trial. Kaplan Meier curves display the survival of 481 males (**A**) and 109 females (**B**) according to their plasma levels of miR-574-5p measured 48h after OHCA and divided into tertiles. For each tertile, ranges of miR-574-5p values are indicated in number of copies per µl of plasma. P value of the Log-Rank test is shown. Univariate and multivariate associations between demographic and clinical characteristics, miR-574-5p and death at the end of the trial are shown in males (**C**, **E**) and females (**D**, **F**). Hazard ratios (HR) ± 95% confidence intervals (95%CI) are plotted. No female had ROSC after defibrillation.



Univariate analysis



Multivariable analysis



Supplementary Materials

Methods

Measurement of circulating miR-574-5p levels

. *RNA extraction*

MiRNeasy Serum/plasma kit and the semi-automated QIAcube system (Qiagen, Hilden, Germany) were used to extract total RNA from 200µl of plasma, following the manufacturer's instructions. Briefly, 200µl of plasma was mixed with 1ml of Qiazol. After 5 minutes of incubation, 3.5µl of spike-in working solution containing $1.6x10^8$ copies of cel-miR-39 per µl (Qiagen) was added to the sample, to correct for extraction efficiency. 200µl of chloroform were added and incubated for 3 minutes, followed by a centrifugation step at 10,000xg for 20min at 4°C. The aqueous phase obtained was recovered and was added on a silica column-based system, introduced into the QIAcube, which performed several washing steps with solutions containing increasing ethanol concentrations. 18µl of water were used to finally elute total RNA.

a. RT-qPCR

Reverse transcription was performed with miScript II reverse transcription kit (Qiagen) using 12µl of total RNA and HiSpec buffer. MiScript SYBR-green PCR kit (Qiagen), specific primers designed for miRNA (Qiagen) and CFX96 thermocycler (Bio-Rad) were used to perform quantitative PCR. Variations between PCR runs were adjusted using an inter-run calibrator in each PCR plate.

b. Absolute quantification

A stock solution (20µM, $1.204x10^{13}$ copies/µl) of synthetic miR-574-5p mimics (Qiagen) was used to prepare a working solution at 10^{10} copies/µl, followed by 10-fold serial dilution to obtain solutions ranging from 10^{10} copies/µl to 10^2 copies/µl. 5µl of each solution of miR-574-5p mimic was reverse transcribed using the miScript II reverse transcription kit and HiSpec buffer (Qiagen). 50ng of carrier RNA (Qiagen) was used as negative reverse transcription control. Obtained cDNA was diluted 10-fold, and 4µl of diluted cDNA were used in quantitative PCR, performed with MiScript SYBR-green PCR kit (Qiagen). The CFX96 Manager 3.1 software (Bio-Rad) allowed the determination of the slope of the standard curve (b=-3.204) as well as the Y-axis intercept (m=42.996). MiR-574-5p quantity per well in PCR plate was determined using the following formula: $10^{((Cq\ miR\text{-}574\text{-}5p\text{-}b)/m)}$. MiR-574-5p quantity per samples was determined by multiplying this last value with a correction factor of 75 to account for dilutions during the process. This corrected value was divided by the starting volume of plasma (200µl) to obtain the number of copies of miR-574-5p per µl of plasma.

c. Normalization

Normalization of the number of copies of miR-574-5p by µl of plasma was performed by multiplication with a normalization factor, as described previously [1]. This factor was obtained for each plasma sample using the formula: $1/[2^{(\text{median cel-miR-39 Cq value})-(\text{cel-miR-39 Cq value of the given sample})}]$, in which the median cel-miR-39 Cq value was calculated from the median of cel-miR-39 Cq values of all samples to be compared.

Overall, the following formula was used to obtain normalized miR-574-5p values in copies of miR-574-5p per µl of plasma:

$10^{((\text{Cq miR-574-5p-b})/m)}$ x dilution factor x normalization factor;

in which dilution factor is 75/200

and normalization factor is $1/[2^{(\text{median cel-miR-39 Cq value})-(\text{cel-miR-39 Cq value of the given sample})}]$.

Statistical analysis

Demographic and clinical data

The Mann-Whitney test was used to compare two groups of continuous variables. The Chi-square test or the Fisher exact tests were used to compare two groups of categorical variables. A p value <0.05 was considered as statistically significant.

Levels of miR-574-5p

The Mann-Whitney test was used to compare miR-574-5p levels between two groups of patients. Logistic regression was used to assess association between miR-574-5p levels and clinical variables in the model. Spearman correlation test on ranks was used to correlate miR-574-5p levels with age, time from CA to ROSC, levels of lactate, NSE, S100b, NT-proBNP, hs-TnT, miR-122-5p and miR-124-3p.

Prediction of neurological outcome

Univariate and multivariable analysis with logistic regression allowed to estimate the association between miR-574-5p levels (log10-transformed and scaled) and neurological outcome at 6 month after OHCA, which was dichotomized: CPC 1 or 2 were considered as good outcome (0 value) and CPC 3, 4 or 5 were considered as poor outcome (1 value). 150-fold multiple imputation was used for missing values. Odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI) were computed for an increase of 1 unit for continuous variables and were centered and scaled. The Akaike information criterion (AIC) was used to estimate the prediction value of multivariable models: a low AIC indicates a better

model fit. The likelihood ratio test was used to compare two AIC values. The AIC is penalized by the number of variables included in the model allowing to avoid model over fitting due to the multiplication of co-variates. Incremental predictive value of miR-574-5p to the baseline model (including or not NSE and other clinical variables) was evaluated by a decrease of AIC and the integrated discrimination improvement (IDI).

Survival analysis

The association between levels of miR-574-5p and survival until the end of the trial was estimated using Cox proportional hazards models and Kaplan-Meier curves. 150-fold multiple imputation was used for missing values. Continuous variables were log10-transformed and scaled. Levels of miR-574-5p were divided in tertiles for Kaplan-Meier analysis.

Software

SigmaPlot version 12.5 was used for statistical analysis related to descriptive results as demographic and clinic feature of the patients, comparison between two groups of patients, correlations, logistic regression, and Kaplan-Meier analysis. R software was used with the following packages (PredictABEL, rms, lmtest, bootStepAIC, matrixStats and survival) for univariate and multivariable analysis.

Supplementary Table 1: Comparison between demographic and clinical features of the patients included in the present sub-study and the patients of the whole TTM cohort.

Characteristic	TTM (n= 939)	Sub-study (n= 590)	P value
Age, years	65 (20-94)	65 (20-94)	0.939
Sex, female	178 (19%)	109 (18.5%)	0.867
Neurological outcome			
Good outcome (CPC 1-2)	446 (47.5%)	299 (50.8%)	0.247
Co-morbidities			
Hypertension	374 (40%)	240 (40.8%)	0.783
Diabetes mellitus	141 (15%)	86 (14.6%)	0.872
Known ischemic heart disease	260 (27.7%)	163 (27.6%)	0.974
Previous MI	193 (21%)	118 (20%)	0.844
Heart Failure	61 (6%)	36 (6.1%)	0.841
COPD	97 (10%)	55 (9.3%)	0.580
Renal failure	6 (1%)	5 (0.8%)	0.874
Previous cerebral stroke	73 (8%)	50 (8.5%)	0.694
Alcohol abuse	37 (4%)	11 (1.9%)	0.034
First monitored rhythm			0.905
VF or non-perfusing VT	729 (78%)	467 (799.4%)	
Asystole or PEA	178 (19%)	104 (17.6%)	
ROSC after bystander defibrillation	13 (1%)	7 (1.2%)	
Unknown	19 (2%)	12 (2%)	
Witnessed arrest	838 (89%)	529 (90%)	0.863
Bystander CPR	683 (73%)	433 (73.4%)	0.825
Time from CA to ROSC, min	25 (0-170)	25 (0-170)	0.324
Initial serum lactate (mmol/l)	6.0 (0.5-25)	6.1 (0.5-25)	0.609
Shock on admission	137 (15%)	76 (12.9%)	0.388

Continuous variables are indicated as median (range) and categorical variables are indicated as number (frequency). CA: cardiac arrest; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; CPR: cardio-

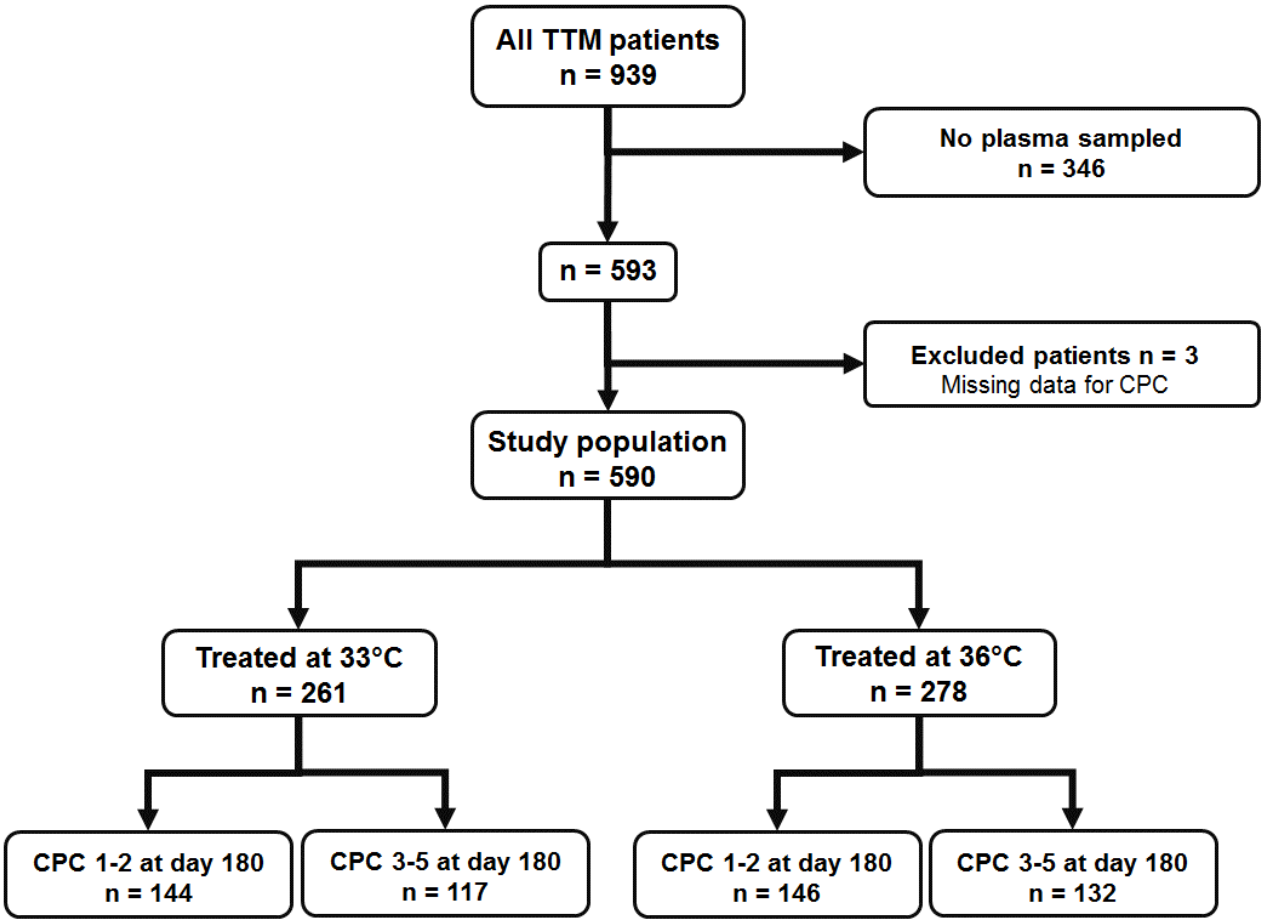
pulmonary resuscitation; MI: myocardial infarction; PEA: pulseless electric activity; ROSC: return of spontaneously circulation; VF: ventricular fibrillation; VT: ventricular tachycardia. Missing information: CPC status for 6 patients (in the TTM cohort, none in the sub-study), hypertension status for 4 patients, diabetes mellitus status for 7 patients, ischemic heart disease status for 3 patients, previous MI status for 2 patients, heart failure status for 3 patients, COPD status for 1 patient, renal status for 1 patient, previous cerebral stroke status for 4 patients, alcohol abuse status for 2 patients, witnessed arrest status for 1 patient, bystander CPR status for 2 patients, time from CA to ROSC for 1 patient, initial serum lactate for 62 patients and shock on admission status for 1 patient.

Supplementary Table 2: Comparison of demographic and clinical characteristics between males and females

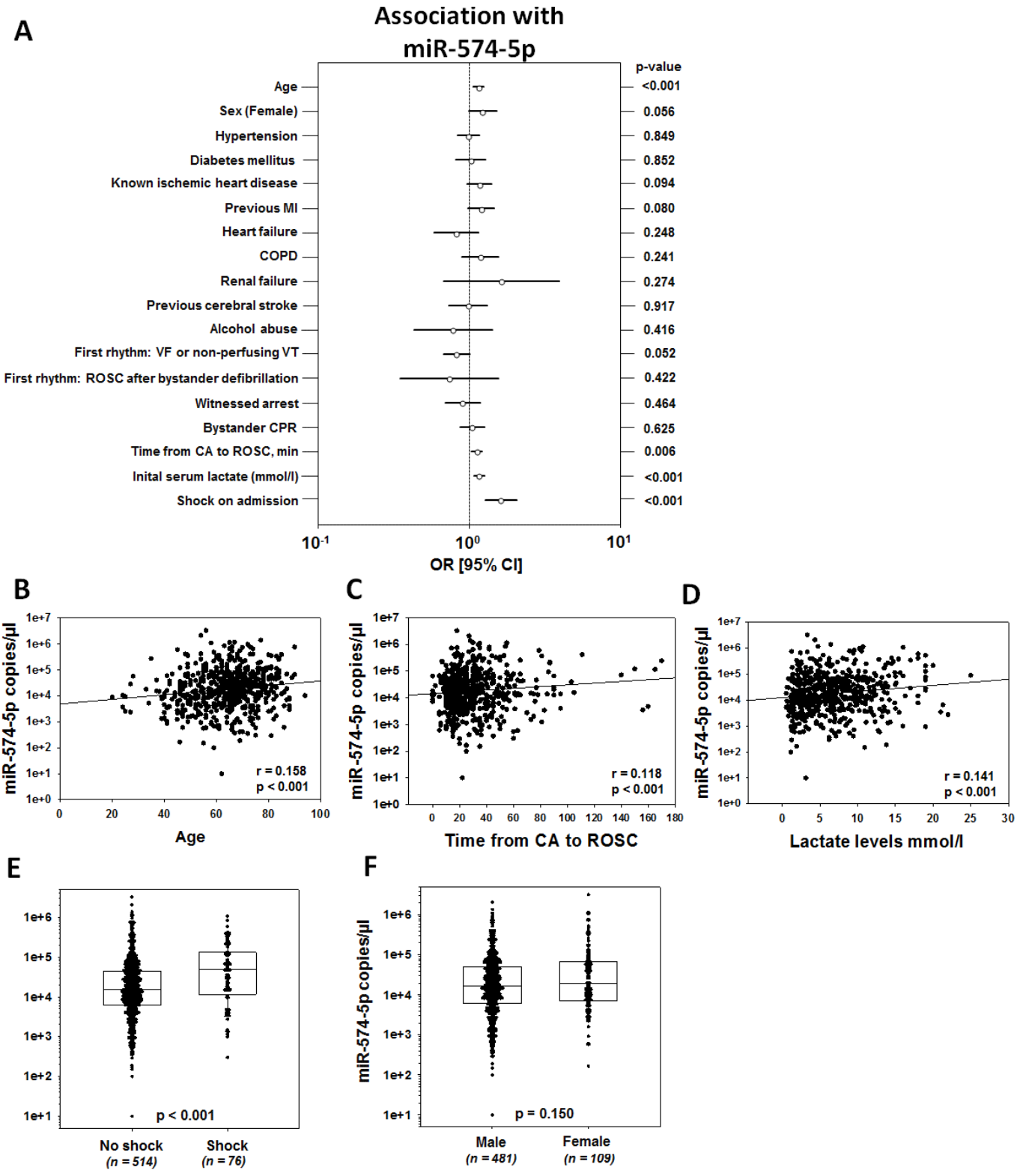
Characteristic	Male (n= 481)	Female (n= 109)	P value
Age, years	65 (20-94)	66 (24-88)	0.410
Neurological outcome			
Good outcome (CPC 1-2)	251 (52.2%)	48 (44%)	0.153
Co-morbidities			
Hypertension	193 (40.1%)	47 (43.1%)	0.641
Diabetes mellitus	68 (14.1%)	18 (16.5%)	0.628
Known ischemic heart disease	139 (28.9%)	24 (22%)	0.183
Previous MI	102 (21.2%)	16 (14.7%)	0.160
Heart Failure	29 (6%)	7 (6.4%)	0.947
COPD	42 (8.7%)	13 (11.9%)	0.393
Renal failure	3 (0.6%)	2 (1.8%)	0.505
Previous cerebral stroke	38 (7.9%)	12 (11%)	0.389
Alcohol abuse	9 (1.9%)	2 (1.8%)	0.714
First monitored rhythm			0.088
VF or non-perfusing VT	388 (80.7%)	79 (72.5%)	
Asystole or PEA	77 (16%)	27 (24.8%)	
ROSC after bystander defibrillation	7 (1.5%)	0 (0%)	
Unknown	9 (1.9%)	3 (2.8%)	
Witnessed arrest	437 (90.9%)	92 (84.4%)	0.068
Bystander CPR	358 (74.4%)	75 (68.8%)	0.281
Time from CA to ROSC, min	25 (0-170)	23 (0-156)	0.325
Initial serum lactate (mmol/l)	6.2 (0.5-25)	6 (0.8-21)	0.901
Shock on admission	60 (12.5%)	16 (14.7%)	0.644

Continuous characteristics are indicated as median (range) and categorical characteristics are indicated as number (frequency). CA: cardiac arrest; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; CPR: cardio-pulmonary resuscitation; MI: myocardial infarction; PEA: pulseless electric activity; ROSC: return of spontaneously circulation; VF: ventricular fibrillation; VT: ventricular tachycardia. Missing information: heart failure status for 2 patients, hypertension status for 1 patient, previous cerebral stroke status for 1 patient, diabetes mellitus status for 3 patients and alcohol abuse status for 1 patient.

Supplementary Figure 1: Study workflow

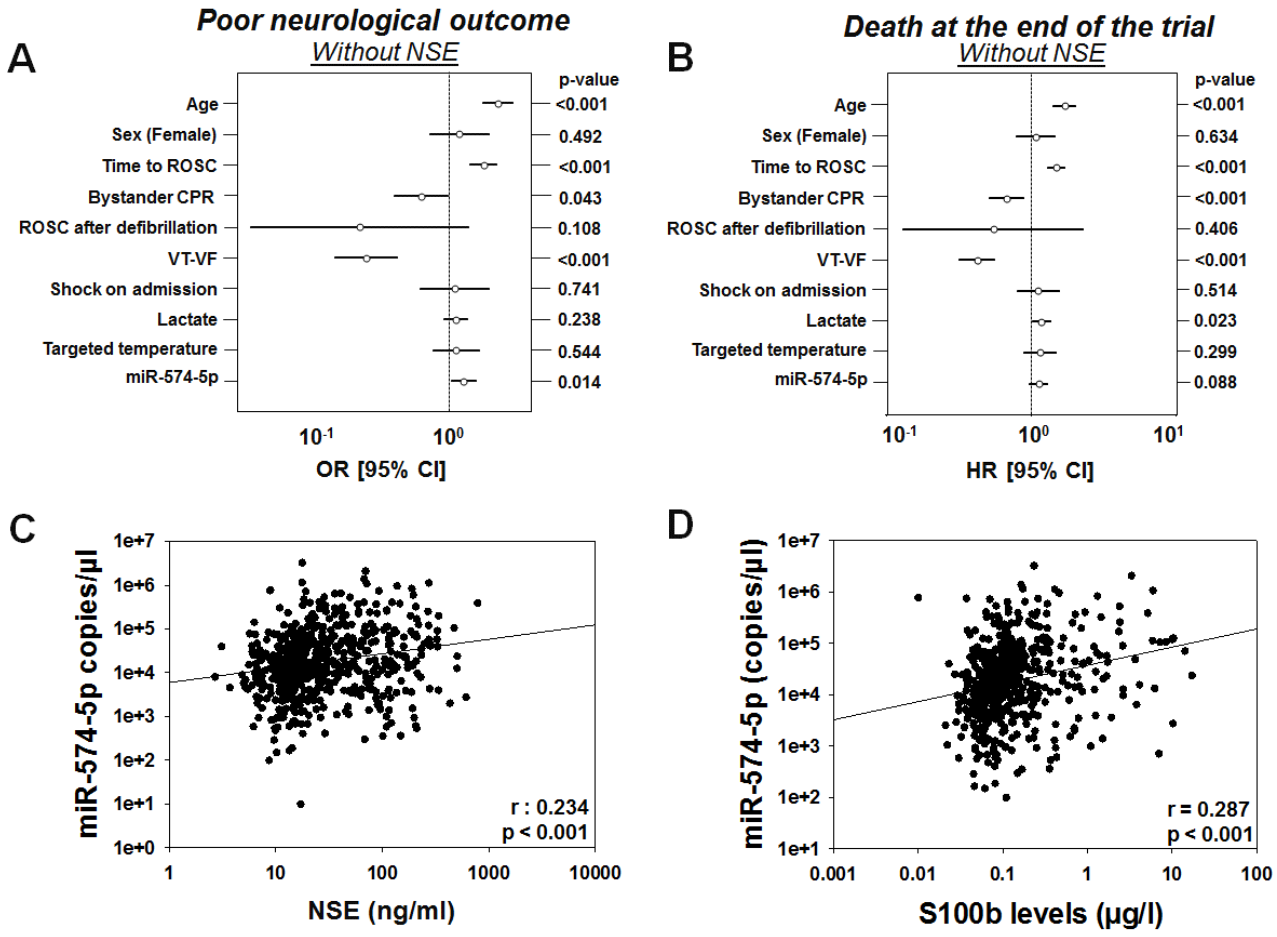


Supplementary Figure 2: Association between circulating levels of miR-574-5p and demographic and clinical variables. A. Univariate analysis for the association between miR-574-5p and demographic and clinical variables. **B.** Spearman correlation between miR-574-5p levels and age. **C.** Spearman correlation between miR-574-5p levels and time between cardiac arrest (CA) to return to spontaneous circulation (ROSC). **D.** Spearman correlation between miR-574-5p levels and initial serum lactate levels. Plasma levels of miR-574-5p according to shock at admission (**E**) and sex (**F**). r: correlation coefficient.

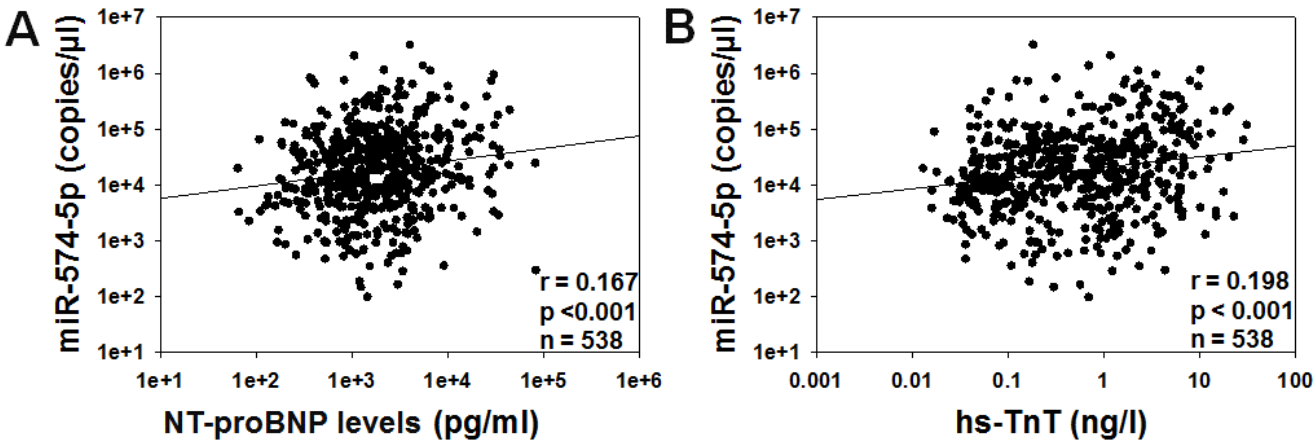

A
Association with miR-574-5p
p-value
Age
Sex (Female)
Hypertension
Diabetes mellitus
Known ischemic heart disease
Previous MI
Heart failure
COPD
Renal failure
Previous cerebral stroke
Alcohol abuse
First rhythm: VF or non-perfusing VT
First rhythm: ROSC after bystander defibrillation
Witnessed arrest
Bystander CPR
Time from CA to ROSC, min
Inital serum lactate (mmol/l)
Shock on admission
<0.001
0.056
0.849
0.852
0.094
0.080
0.248
0.241
0.274
0.917
0.416
0.052
0.422
0.464
0.625
0.006
<0.001
<0.001
10-1
100
101
OR [95% CI]
B
miR-574-5p copies/µl
r = 0.158
p < 0.001
Age
C
r = 0.118
p < 0.001
Time from CA to ROSC
D
r = 0.141
p < 0.001
Lactate levels mmol/l
E
p < 0.001
No shock
(n = 514)
Shock
(n = 76)
F
p = 0.150
Male
(n = 481)
Female
(n = 109)

Supplementary Figure 3. Association between miR-574-5p levels and NSE levels in 590 patients

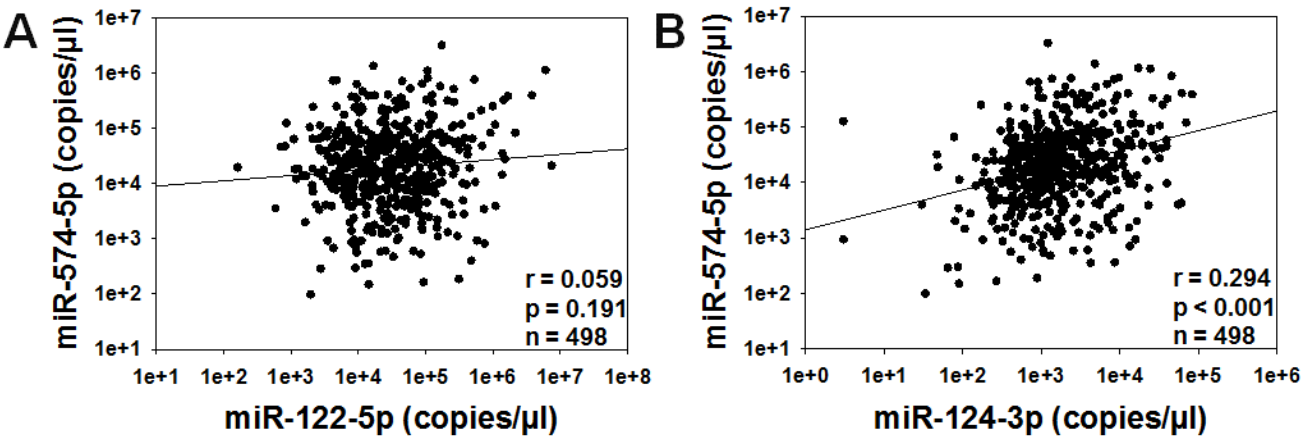
Multivariable analyses without NSE levels were performed for the association between miR-574-5p and neurological outcome (**A**), and between miR-574-5p and death at the end of the trial (**B**). Odds ratios (OR) ± 95% confidence intervals (95% CI) are shown for the prediction of poor neurological outcome 6 months after OHCA. Hazard ratios (HR) ± 95% CI are shown for the prediction of death at the end of the trial. **C-D.** Spearman correlation between levels of miR-574-5p, NSE and S100b measured 48h after OHCA, r: correlation coefficient. Note that S100b values were missing for 50 patients.



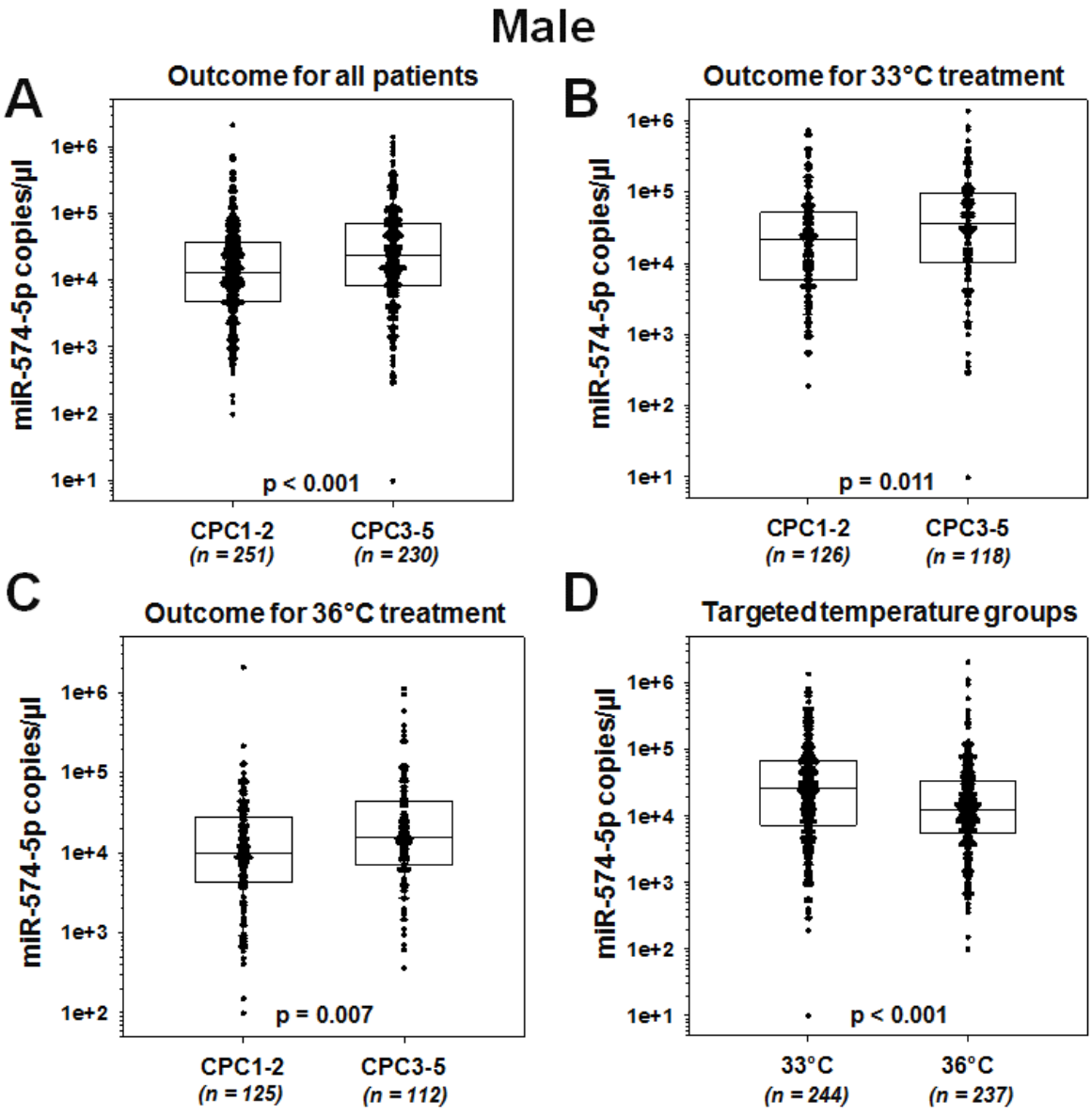
Supplementary Figure 4. Spearman correlation between circulating levels of miR-574-5p and cardiac markers NT-proBNP (**A**) and hs-TnT (**B**) measured 48h post-OHCA. Levels of NT-proBNP and hs-TnT were measured in serum and are log-scaled. Levels of miR-574-5p are expressed as number of copies per microliter of plasma and are log-scaled. Note that NT-proBNP and hs-TnT values were missing for 52 patients.



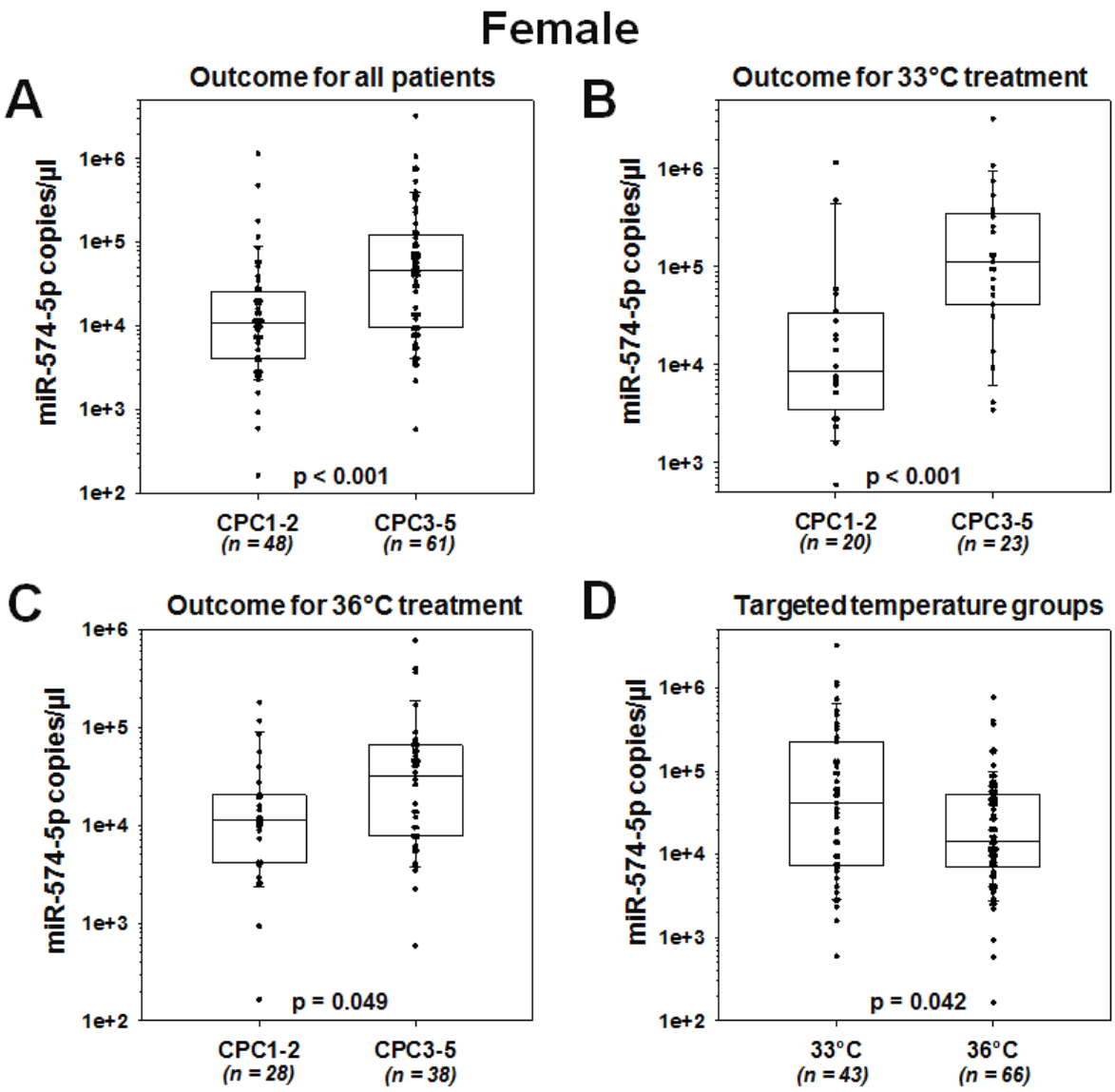
Supplementary Figure 5. Spearman correlation between circulating levels of miR-574-5p, miR-122-5p (**A**) and miR-124-3p (**B**), measured 48h post-OHCA. Levels of miRNAs are expressed as number of copies per microliter of serum and are log-scaled. Note that miR-122-5p and miR-124-3p values were missing for 92 patients.



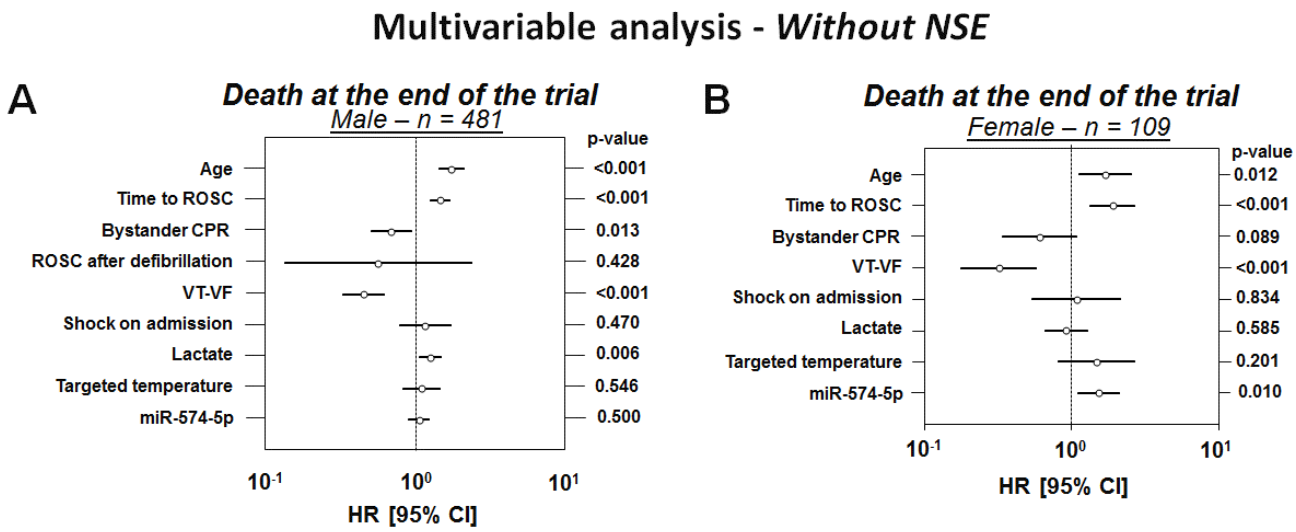
Supplementary Figure 6. Circulating levels of miR-574-5p according to targeted temperature and neurological outcome in males. Plasma levels of miR-574-5p were measured 48h after ROSC using quantitative PCR in 481 male patients. Displayed are levels of miR-574-5p between males with good and poor neurological outcome independently of targeted temperature management regimen (**A**), in the 33°C group (**B**) and in the 36°C group (**C**). **D.** Levels of miR-574-5p between males treated at 33°C and males treated at 36°C. Levels of miR-574-5p are expressed as number of copies per microliter of plasma and are log-scaled.



Supplementary Figure 7. Circulating levels of miR-574-5p according to targeted temperature and neurological outcome in females. Plasma levels of miR-574-5p were measured 48h after ROSC using quantitative PCR in 109 female patients. Displayed are levels of miR-574-5p between females with good and poor neurological outcome independently of targeted temperature management regimen (**A**), in the 33°C group (**B**) and in the 36°C group (**C**). **D.** Levels of miR-574-5p between females treated at 33°C and females treated at 36°C. Levels of miR-574-5p are expressed as number of copies per microliter of plasma and are log-scaled.



Supplementary Figure 8. Multivariable analyses without NSE levels were performed for the association between miR-574-5p and death at the end of the trial for male (**A**) and female (**B**). Hazard ratios (HR) ± 95% confidence intervals (95%CI) are plotted.



References

[1] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008;105:10513-8.

DISCUSSION

Dans le contexte des MCV, l'obtention d'un diagnostic précis et du pronostic après la survenue d'une de ces maladies restent un enjeu de taille. Les biomarqueurs protéiques actuels sont couramment utilisés pour aider à confirmer un diagnostic d'IM [195], à estimer l'évolution de la fonction cardiaque après un IM [192] ou encore pour aider les médecins à estimer l'évolution neurologique et la survie des patients ayant subi un AC. Ces biomarqueurs ont permis une amélioration du traitement des patients souffrant de MCV. Toutefois, ces biomarqueurs présentent également des limites, et la nécessité de découvrir de nouveaux biomarqueurs complémentaires de ceux déjà existants est primordiale. Elle est nécessaire pour améliorer le traitement et la prise en charge des patients, vers une médecine de plus en plus personnalisée.

Le but de ce travail était d'identifier des molécules ARN, présentes dans le sang et montrant un potentiel comme nouveaux biomarqueurs diagnostiques ou pronostiques des MCV. Nous nous sommes intéressés à deux types de transcrits en particuliers : les ARNm présents dans les cellules sanguines et les miARN circulants, présents dans le plasma ou le sérum. Ces transcrits ont tous été mesurés par transcription inverse et PCR quantitative, avec extraction d'ARN effectuée au préalable, dans des cohortes de patients de taille variable. Cette technique, bien que très majoritairement utilisée par les laboratoires de recherche pour la mesure de l'expression des transcrits, présente certaines limites. Par ailleurs, la technique utilisée pour mesurer l'expression d'un ou plusieurs transcrits est importante car elle peut également conditionner l'utilisation des biomarqueurs transcriptomiques en clinique.

Ainsi, ce travail débute par une étude plus technique, qui visait à explorer l'une des limites de la technique de la transcription inverse couplée à la PCR quantitative.

❖ Enjeux et limites des techniques utilisées pour mesurer l'expression du transcriptome sanguin (Etude 1)

L'inhibition de la transcription inverse et de la PCR quantitative induite par l'héparine exogène dans les échantillons sanguins est bien connue [290]. L'héparine exogène peut provenir du tube de prélèvement utilisé, mais également d'un traitement anticoagulant administré au patient [198]. Plus

surprenant encore, une inhibition de transcription inverse et de PCR a été observée dans les tissus (de poumon) de patients auxquels de l'héparine avait été administrée [290].

Au cours de notre première étude, nous avons observé que l'héparine présente à de très faibles concentrations (similaires à celle de l'héparine endogène) est capable d'inhiber (partiellement voir totalement) les réactions de transcription inverse et de PCR quantitative. De plus, cette inhibition touchait inégalement les miARN mesurés. Les miARN synthétiques ajoutés dans les échantillons dans un but de normalisation comme le cel-miR-39 étaient plus sensibles à l'action de l'héparine que les miARN endogènes, comme montré précédemment [198].

Dans des échantillons de sérum provenant de patients souffrant d'un AAT, les niveaux d'héparine endogène étaient responsables d'une inhibition totale de la transcription inverse et de la PCR. En ce qui concerne d'autres cohortes, nous supposons que les taux d'héparine peuvent varier en fonction des patients et de la conservation des échantillons, induisant une inhibition plus ou moins complète de la transcription inverse et de la PCR quantitative, ajoutant ainsi un biais technique important.

Face à ce problème une solution proposée serait un traitement systématique des échantillons avec de l'héparinase, afin d'éliminer l'héparine présente dans l'échantillon. Toutefois, nous avons observé ici que le traitement à l'héparinase n'est pas non plus sans effets sur les réactions de transcription inverse et de PCR quantitative, car il ne permet pas d'éliminer de manière homogène l'inhibition causée par l'héparine. De plus, le traitement à l'héparinase ajoute une étape potentiellement génératrice de biais techniques supplémentaires. Face à ce problème, la solution idéale serait alors de vérifier que les niveaux d'héparine sont inférieurs à 0,02IU/ml dans les échantillons sanguins avant l'utilisation de la technique de transcription inverse et PCR quantitative.

Cette étude présente une limite : nous ne pouvons pas exclure que l'interférence entre l'héparine et la technique de transcription inverse et PCR quantitative n'est pas modulée par d'autres facteurs présents naturellement dans le sang. Toutefois, cette étude souligne une limite importante de la technique de de transcription inverse et PCR quantitative, observée ici lors de la mesure de miARN. Nous pensons que ces résultats peuvent être extrapolés à la mesure d'autres transcrits par transcription inverse et PCR quantitative. Cette technique présente d'autres limites déjà bien établies : elle est également longue, nécessite de nombreuses étapes (chacune pouvant introduire un biais technique) et elle peut être associée à des problèmes de normalisation [291].

La technique de transcription inverse et de PCR quantitative est toutefois utilisée dans un test *in vitro* commercialisé aux Etats-Unis par la firme CardioDx™, pour le diagnostic de la coronaropathie obstructive. Ce test mesure l'expression de 23 transcrits (de type ARNm) présents dans le sang total, puis un algorithme permet de transformer les résultats en une échelle de 1 à 40 [14]. Nous ignorons cependant si l'influence des substances présentes dans le sang interagissant avec la transcription inverse et la PCR quantitative ont été prise en compte dans la mise au point de ce test, qui semble suffisamment fiable pour que son utilité diagnostique soit reconnue par l'AHA [292]. Ces résultats représentent la première étape vers l'utilisation réelle en clinique des biomarqueurs transcriptomiques sanguins dans les MCV, et montrent que malgré toutes ses limites, la technique de transcription inverse et de PCR pourrait être utile en clinique pour la mesure de biomarqueurs transcriptomiques.

Toutefois, le temps nécessaire pour obtenir un résultat (ici jusqu'à 24h pour ce test diagnostique) représente un obstacle à l'utilisation de cette technique en clinique pour mesurer l'expression d'un biomarqueur diagnostique d'une MCV aigue. En effet, le diagnostic de l'IM ou encore de la dissection aortique ont besoin d'être perfectionnés, et nécessitent des marqueurs mesurables facilement et très rapidement. Pour envisager une utilisation réelle en clinique du transcriptome sanguin comme biomarqueur diagnostique des MCV aigues, des techniques plus directes, plus simples et rapides d'utilisation que la transcription inverse et la PCR quantitative sont nécessaires. La simplicité et la rapidité pourraient être améliorées par l'utilisation directe du fluide corporel d'intérêt et non de l'ARN total extrait à partir de ce dernier. L'utilisation directe des fluides corporels nécessitera cependant le développement de techniques plus sensibles [293].

Des techniques de mesure de l'expression des transcrits et en particulier des miARN sont développées dans les laboratoires de recherche. Elles comprennent généralement deux étapes : une étape d'amplification [294], [295] et une étape de détection utilisant des techniques telles que l'éléctrochemiluminescence [296] qui peut être couplée à des points quantiques [297], la spectrométrie de masse [298], ou l'utilisation de billes de silice [299]. Toutefois, ces techniques nécessitent l'utilisation d'une polymérase, et pourraient également être biaisées par des interactions entre les différents composants sanguins ou tissulaires et la polymérase.

D'autres techniques ne nécessitant pas d'étape d'amplification (et donc pas de polymérase) et ayant une sensibilité similaire à la transcription inverse et PCR quantitative ont également été mises au point. Certaines sont déjà commercialisées. Par exemple, NanoString technologies propose le *nCounter® miRNA Expression assay*. Ce test permet de mesurer l'expression de plusieurs centaines

de miARN simultanément, sans étape d'amplification. Toutefois, il est effectué à partir d'ARN total et non directement à partir de l'échantillon non traité. HTG Molecular Diagnostic Inc. propose le *HTG EdgeSeq system*, qui utilise une technique dérivée du séquençage et permet de mesurer l'expression de plusieurs milliers de transcrits directement à partir d'échantillons non modifiés (sang, plasma ou sérum). Les résultats sont disponibles en 36h, de manière automatisée. Enfin, Quanterix propose le *SR-X ultra-sensitive Biomarker Detection System,* qui peut détecter simultanément des protéines et des transcrits, jusqu'à 6 cibles par échantillon, de manière entièrement automatisée.

Actuellement, quelques techniques non dépendantes de la transcription inverse ou de la PCR quantitative sont disponibles sur le marché et permettent de mesurer plusieurs transcrits simultanément (et en particulier les miARN). De plus, elles sont simples d'utilisation et permettent d'obtenir des résultats relativement rapidement. Ces techniques s'affranchissent de toutes les limites de la transcription inverse et de la PCR, et des obstacles qu'elles représentaient pour l'utilisation des transcrits en clinique. Ainsi, la démocratisation de ces nouvelles techniques devrait permettre de faciliter l'utilisation des biomarqueurs transcriptomiques sanguins en clinique.

❖ Le transcriptome dans les cellules sanguines et l'IM (Etude 2)

Plusieurs études ont rapporté une modulation du transcriptome dans le sang total de patients ayant subi un IM [206], [16], [207]. Une autre étude a démontré que l'étendue de la sténose coronarienne était corrélée avec le profil d'expression des transcrits des cellules sanguines [201]. Après un IM, une partie des cellules sanguines, les cellules immunitaires (en particulier les macrophages et les monocytes) sont recrutées dans le tissu cardiaque pour participer activement au phénomène de cicatrisation et de remodelage ventriculaire.

Au cours de l'étude 2, nous avons observé que les 3 transcrits codant pour les gènes *LTBP4, TGFBR1* et *TNXB* étaient des prédicteurs indépendants de la fonction cardiaque à 4 mois post-IM. L'expression des transcrits codant pour *TGFBR1* et *TNXB* était positivement associée avec une faible FE à 4 mois post-IM. De plus, le transcrit codant pour *TGFBR1* était surexprimé dans le sang total des patients ayant développé une dysfonction cardiaque post-IM. Ces résultats laissent suggérer que ces transcrits pourraient jouer un rôle délétère dans la cicatrisation post-IM et être impliqués dans la mise de place du remodelage ventriculaire.

Le gène *TGFBR1* est impliqué dans la voie de signalisation du TGF-β. Dans les fibroblastes cardiaques, l'activation du *TGFBR1* conduit à une augmentation de sécrétion de protéines impliquées dans la fibrose [300]. Une fibrose cardiaque trop importante correspond à une mauvaise cicatrisation post-IM, associée à une forte perte de pouvoir contractile et semble confirmer le rôle délétère du gène *TGFBR1* dans l'évolution cardiaque post-IM. D'autre part, le gène codant pour la TNXB, une grande protéine exprimée dans la MEC, est associé au syndrome d'Ehler-Danlos, qui affecte les tissus conjonctifs (caractérisé par une hypermobilité, des vaisseaux sanguins plus fragiles et une capacité de cicatrisation amoindrie) [301]. Une déficience en TNXB semblerait apporter une protection cardiovasculaire en empêchant la paroi aortique de se rigidifier et la lumière coronaire d'être obstruée [302]. Le rôle cardio-délétère de la TNXB a été également observé dans un modèle murin de cardiomyopathie induit par l'alcool : les souris déficientes en TNXB bénéficiaient d'une meilleure fonction cardiaque que les souris Wt [303].

Inversement, l'expression du transcrit codant pour *LTBP4* était négativement associée avec la dysfonction cardiaque post-IM. De plus, ce transcrit était sous-exprimé dans le sang total de patient ayant une faible FE à 4 mois post-IM. Ces résultats suggèrent ainsi un rôle plutôt cardio-protecteur pour ce transcrit. Le gène *LTBP4* code pour une glycoprotéine associée à la voie de signalisation du TGF-β et est exprimé en particulier dans le cœur, le squelette et les muscles. La protéine LTBP4 a un rôle de régulation de la voie du TGF-β. Elle se lie avec le TGF-β et le séquestre sous une forme inactive dans la MEC, empêchant ainsi ce dernier d'interagir avec ces récepteurs [304]. A l'inverse, la protéolyse de la LTBP4 permet la libération du TGF-β précédemment séquestré [305] suivie par une activation de la voie de signalisation. Au niveau cardiaque, certains polymorphismes sur le gène *LTBP4* sont associés avec la cardiomyopathie dilatée [304]. Le rôle de la LTBP4 semble opposé à celui du TGFBR1.

Toutes ces observations et informations renforcent l'idée que l'association entre ces trois transcrits et la fonction cardiaque post-IM est fonctionnelle et qu'ils pourraient jouer un rôle actif dans le remodelage ventriculaire, en particulier dans le processus de cicatrisation-fibrose. Toutefois, aucune analyse présentée dans ce travail ne permet de démontrer cette association. Pour vérifier cela, d'autres expériences mécanistiques devraient être menées.

Avant d'envisager l'utilisation clinique des 3 transcrits présentés ici, leur association avec la fonction cardiaque post-IM devrait être répliquée dans des populations indépendantes, à grande échelle. Ces trois transcrits pourraient également constituer la base d'un test similaire au test développé par

CardioDx™ pour le diagnostic de la coronaropathie obstructive mais conçu pour prédire l'évolution de la fonction cardiaque après un IM. Les biomarqueurs actuels n'étant pas capables de prédire cette évolution avec suffisamment de précision, un tel test permettrait d'améliorer le pronostic de chaque patient ayant subi un IM.

L'étude 2 présente certaines limites : en premier lieu, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que d'autres transcrits présentent une valeur prédictive supérieure à celle des 3 transcrits que nous avons étudiés. Ensuite, les indices angiographiques d'obstruction microvasculaire des coronaires et les volumes des ventricules gauches n'étaient pas disponibles pour cette étude. Ces informations auraient pu apporter d'autres indices importants concernant le remodelage ventriculaire des patients.

❖ Valeur diagnostique et prédictive des miARN dans les MCV

Après avoir observé la valeur prédictive de transcrits exprimés dans le sang total dans le contexte de l'IM, nous nous sommes intéressés à la valeur diagnostique et pronostique des miARN circulants, présents dans le plasma ou le sérum de patients souffrant d'AAT ou d'AC au cours de 3 études.

Ces études présentent des points communs. En premier lieu, si elles nous ont permis de mettre en lumière des miARN ayant un potentiel de biomarqueur diagnostique ou pronostique d'une MCV, nous ne pouvons pas exclure le fait que d'autres miARN pourraient disposer d'une valeur diagnostique ou pronostique supérieure à celle des miARN présentés au cours de ce travail.

Ensuite, l'utilisation clinique des biomarqueurs potentiels présentés ci-dessous ne pourra être envisagée avant validation dans une ou plusieurs cohortes indépendantes de grande taille.

Enfin, nos études sont limitées par un manque d'études mécanistiques, concernant notamment l'origine des miARN identifiés. Ces derniers ont été identifiés dans la circulation sanguine, et nous avons proposé des hypothèses expliquant leur présence dans le sang. Toutefois, nous ne présentons ici pas de données permettant d'affirmer l'origine cellulaire des miARN étudiés. De plus, leur mécanisme d'action, dans le contexte de la maladie dans laquelle ils ont été identifiés, n'est pas forcément connu. Cette faiblesse mécanistique devra être comblée par des études ultérieures.

- Valeur du miR-574-5p dans l'AAT (Etude 3)

L'incidence réelle de l'AAT est très probablement sous-estimée à cause de l'absence de symptômes de cette maladie [306]. L'AAT reste une maladie silencieuse mais menaçante, associée à la survenue de complications aortiques sévères [307]. Les patients présentant un diamètre aortique supérieur à 4.5cm ont un risque 6000 fois plus élevé de subir une dissection aortique que les patients porteurs d'aortes de petit diamètre (<3,4cm) [308]. La survenue de telles complications aortique est limitée par un suivi très régulier de l'évolution de la taille de l'aorte, les traitements appropriés et une intervention prophylactique si nécessaire. Actuellement, en accord avec les principes d'équilibre bénéfice/risque, l'intervention prophylactique est effectuée uniquement lorsque les risques de dissection aortique deviennent supérieurs aux risques associés à l'opération elle-même. L'identification de tous les patients porteurs d'AAT permettrait leur prise en charge adéquate. Ainsi, au cours de cette étude, notre but était d'étudier le potentiel des miARN comme biomarqueurs de l'AAT. Nous avons observé que les niveaux sériques du miR-574-5p étaient capables de discriminer les patients porteurs d'un AAT des personnes saines, suggérant une utilisation potentielle de ce miARN comme biomarqueur diagnostique de l'AAT.

Des dissections aortiques peuvent également se produire chez des patients présentant un diamètre aortique inférieur à cette limite [309], démontrant bien la nécessité de trouver de nouveaux moyens de stratifier les patients à risque de développer une dissection aortique, au-delà de la simple surveillance du diamètre aortique. Les biomarqueurs sanguins et en particulier les miARN pourraient avoir ce potentiel de prédiction à l'égard du risque de dissection aortique. Par ailleurs, une étude a montré que les niveaux plasmatiques de miR-718 étaient corrélés avec la dilatation aortique chez les patients, toutefois la valeur de cette prédiction et l'origine cellulaire du miR-718 n'ont pas été reportés [252].

Au cours de cette étude, l'étude du profil à haut débit de l'expression des miARN dans les biopsies aortiques a été combinée avec un réseau d'interactions protéine-gène-miARN. Cette approche permet de mettre en valeur des miARN fonctionnellement associés avec la maladie comparée à une analyse ne s'intéressant qu'à l'expression différentielle. En ayant comme perspective la recherche de biomarqueurs, une telle approche est essentielle pour identifier des cibles qui pourraient être fonctionnellement associés à la maladie. Ainsi, les analyses bio-informatiques suggéraient le rôle potentiel du miR-574-5p dans la pathogénèse de l'AAT

Les outils informatiques basés sur les gènes cibles prédits du miR-574-5p et les voies de signalisation associées à ces gènes suggèrent que ce miARN pourrait être impliqué dans la « régulation de la

prolifération des CML », la « régulation positive de la prolifération cellulaire » et « la régulation positive du mouvement cellulaire ». Ces prédictions vont dans le sens d'une augmentation de prolifération et de migration des CML, caractéristique d'un changement de phénotype depuis un phénotype musculaire vers un phénotype sécrétoire [310], observé dans les tissus aortiques anévrismaux [311]. Un autre argument soutien l'hypothèse de l'implication du miR-574-5p dans le changement phénotypique des CML : le miR-574-5p diminue l'apoptose et induit la prolifération de CML issues de patients souffrant d'une maladie coronarienne [312]. De plus, au cours de notre étude, les CML qui ont reçu des VE provenant de souris porteuses d'un AAT ont montré une augmentation de l'expression du miR-574-5p et une formation de nouvelles VE. A notre connaissance, la production de VE par les CML n'a pas été documentée dans le contexte de l'AAT. Cependant, dans le processus de calcification vasculaire, les CML subissent également un changement phénotypique, depuis un état sécrétoire vers un état chondrogénique qui est associé à une sécrétion de VE [313]. Tous ces résultats soutiennent ainsi l'hypothèse que le miR-574-5p pourrait être impliqué dans la formation de l'AAT.

A partir du réseau d'interaction, nous avons observé que le miR-574-5p était associé aux gènes *SMAD2* et *SMAD4* : le miR-574-5p était prédit pour diminuer l'expression de ces deux gènes codants pour deux facteurs de transcription impliqués dans la voie du TGF-β, connue pour être impliquée dans la pathogénèse de l'AAT [314,315]. Récemment, il a été montré qu'un variant du gène *SMAD4* augmentait le risque d'AAT et de dissection en augmentation l'apoptose des CML et la dégradation des protéoglycanes [316]. L'activation et la surexpression de SMAD4 ont toutes les deux été associées avec le remodelage de l'aorte thoracique anévrismale et pourraient également participer au changement de phénotype des CML [316]. De plus, une déficience en SMAD4 dans les CML induit une dégradation d'élastase accrue et déclenche la formation de l'AAT [317]. En régulant l'expression de SMAD4, le miR-574-5p pourrait ainsi participer au changement de phénotype des CML et à la dégradation de la MEC observée dans l'AAT.

Les niveaux d'expression du miR-574-5p étaient inversement régulés entre les échantillons de tissus aortiques et ceux de sérum. Une baisse d''expression est observée dans la media anévrismale comparée à la media saine, alors que les niveaux de sérum du miR-574-5p étaient augmentés chez les patients porteurs d'AAT. Ce profil d'expression a également été observé chez les souris $Fbn1^{C1039G/+,}$ qui développent des AAT spontanés. Bien que ce modèle ne mime que le syndrome de Marfan et que les patients présentaient de nombreuses étiologies, ces résultats suggèrent une forte implication du miR-574-5p dans la pathogénèse de l'AAT. Les niveaux sanguins de miR-574-5p étaient corrélés avec la dilatation aortique des souris $Fbn1^{C1039G/+}$, mais n'étaient pas associés avec la

sévérité de la maladie chez les patients. Nous suggérons que cette différence pourrait être expliquée par l'hétérogénéité de l'étiologie des patients, alors que les souris présentent toutes la même étiologie.

Nous avons observé que le miR-574-5p était exprimé dans le plasma et les VE provenant de de souris Fbn1$^{C1039G/+}$. Une proportion de miR-574-5p semble ainsi transportée dans des vésicules, chez les souris porteuses d'un AAT. L'inclusion et le transport du miR-574-5p dans les VE nécessite de l'énergie, et prouve sa sécrétion active dans le sang [318] par des cellules ou un tissu « donneur », envers un tissu ou des cellules cibles, « receveuses ». Il a été démontré que des miARN encapsulés dans des VE étaient capables de modifier l'expression de leur gène cible dans des cellules cibles[319,320]. En particulier, le phénotype des CML peut être modifié par des miARN présents dans les exosomes (tels que les miR-143, miR-145 [321] ou miR-206 [322]) secrétés par des cellules endothéliales. Tous ces résultats laissent suggérer un rôle « paracrine » pour le miR-574-5p dans le contexte de l'AAT.

Toutefois, au cours de cette étude, nous n'avons pas déterminé l'origine du miR-574-5p circulant, et nous n'avons pas non plus identifié de cellules « réceptrices » de ce signal paracrine. L'observation des tissus de souris Fbn1$^{C1039G/+}$ a montré que le miR-574-5p est modulé dans plusieurs organes et est particulièrement exprimé dans les reins. Ces derniers sont fortement sensibles aux modulations de pression sanguine et à l'hypertension [323]. De plus, les patients avec AAT ont un risque plus élevé de développer une maladie rénale que les personnes saines [324]. L'AAT induit en effet des modifications hémodynamiques dans tout le système circulatoire [325], ce qui peut impacter d'autres organes. Nous avons émis l'hypothèse que la surexpression du miR-574-5p dans les reins de souris Fbn1$^{C1039G/+}$ pourrait être une réponse face aux modulations de pression sanguine. Parmi les nombreuses manifestations du syndrome de Marfan, il n'y a pas d'atteinte rénale, et la structure rénale des souris Fbn1$^{C1039G/+}$ est semblable à celle des souris Wt. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que la surexpression du miR-574-5p dans les reins n'est pas une conséquence de la mutation du gène fbn1.

Une autre étude a rapporté que les niveaux circulants de miR-574-5p étaient aussi augmentés chez les patients souffrant de maladie coronarienne et que ce miARN stimulait la croissance de CML obtenues depuis ces patients [312]. Au sein de notre étude, aucun des 28 patients inclus dans la cohorte sérum n'avait de maladie coronarienne identifiée. Ainsi, la sur-régulation des niveaux circulants de miR-574-5p que nous avons observée ne semble pas associée à la présence d'une maladie coronarienne et semble être spécifique de l'AAT.

Cette étude présente certaines limites : 1. Le nombre de participants dans les différentes cohortes est relativement faible, et il y avait des différences importantes entre les groupes contrôle et patients dans la cohorte sérum. 2. L'association entre le miR-574-5p et l'AAT a été observée dans deux cohortes de taille modeste. 3. L'association fonctionnelle entre le miR-574-5p et l'AAT est fortement suggérée par nos analyses bio-informatiques et la sécrétion du miARN dans les VE, mais devrait être étudiée de manière plus approfondie.

- Valeur du miR-122-5p dans l'AC (Etude 4)

Au cours de l'étude 4, nous souhaitions déterminer la capacité du miR-122-5p à prédire l'évolution neurologique et la survie à moyen terme post-AC, dans une grande cohorte de patients.

L'association entre le miR-122-5p et le pronostique post-AC avait déjà été étudiée par notre équipe, mais à petite échelle (28 patients). Ces résultats préliminaires avaient montré que le miR-122-5p pouvait prédire l'évolution post-AC avec une AUC de 0,73 [260] et était positivement associé avec le risque de mauvaise évolution neurologique post-AC. Toutefois, au cours de l'étude présentée dans ce mémoire, nous avons observé la tendance inverse : le miR-122-5p était négativement associé avec le risque de mauvaise évolution neurologique et de mort post-AC. Cette différence peut s'expliquer par le fait que deux cohortes de taille et caractéristiques très différentes ont été utilisées dans ces deux études.

Le miR-122-5p est connu pour être le miARN le plus exprimé dans le foie. Cependant, au cours de l'étude présentée ici, nous n'avons observé aucune association entre les niveaux de miR-122-5p et la présence de choc à l'admission (qui induit des dommages à de nombreux organes, y compris le foie), ou avec le sous-score hépatique du score de mesure des dommages organiques. Ce score est basé sur les données cliniques et mesures biochimiques, et permet une prédiction du décès en unité de soins intensifs [326]. Le sous-score hépatique a été calculé à partir du niveau de bilirubine le plus élevé chaque jour. Ces informations ne soutiennent pas l'hypothèse d'une cause hépatique sous-jacente responsable de la valeur prédictive du miR-122-5p.

Dans la population normale, les niveaux de miR-122-5p circulants moyens sont de 2000 copies/µl, avec une valeur haute normale de 13 000 copies/µl [327]. Dans notre cohorte de patients ayant subi un AC, 77% des patients ayant une bonne évolution neurologique avaient des niveaux de miR-122-5p supérieurs à 13 000 copies/µl ; alors que seulement 38% des patients ayant une mauvaise évolution

neurologique avaient des niveaux aussi élevés. Nous suggérons que les patients ayant une mauvaise évolution neurologique ne semblent pas capables d'augmenter leurs niveaux de miR-122-5p en réponse aux blessures.

Au cours de travaux antérieurs, notre équipe avait également démontré la valeur prédictive du miR-124-3p envers l'évolution neurologique post-AC dans une cohorte de 579 patients (AUC = 0,77) [262]. Le miR-124-3p était positivement associé avec une dégradation des conditions neurologiques post-AC. Au cours de l'étude présentée ici, nous avons compilé les valeurs prédictives des miR-122-5p et miR-124-3p dans un modèle de prédiction. Le fait que ces 2 miARN soient inversement associés avec l'évolution neurologique post-AC pourrait expliquer le fait que miR-122-5p ajoute une valeur prédictive supplémentaire à un modèle contenant le miR-124-3p. Cette information renforce le concept qu'un ensemble de miARN, chacun associé à des fonctions et une régulation différente dans un contexte pathophysiologique, a des chances d'avoir une valeur diagnostique ou prédictive plus élevée qu'un miARN unique.

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'expression des miARN. Ici, les niveaux circulants de miR-122-5p étaient inversement corrélés avec l'âge. Cependant, le miR-122-5p était un prédicteur indépendant de l'évolution neurologique post-AC dans un modèle comprenant l'âge comme covariable. L'association entre l'âge et le miR-122-5p ne semble pas être responsable de la valeur prédictive du miR-122-5p. Toutefois, il serait intéressant de comprendre le mécanisme sous-jacent induisant cette différence d'expression entre les personnes d'âge différent.

Le miR-122-5p est exprimé dans les cellules cérébrales (en culture) [260], mais une forte expression du miR-122-5p dans le sang est associée avec une bonne évolution neurologique. Le miR-122-5p ne semble donc pas être libéré depuis les cellules cérébrales endommagées. En revanche, la diminution des niveaux de miR-122-5p dans les 3 jours suivant l'AC pourrait indiquer une diminution progressive des niveaux hépatiques de miR-122-5p post-AC. Les niveaux de miR-122-5p étaient également diminués chez les patients souffrant d'insuffisance rénale [328]. Seule une très faible proportion de patients présente des antécédents d'insuffisance rénale mais la proportion de patients développant une insuffisance rénale après leur AC n'est pas connue dans notre cohorte. Dans une autre cohorte de patients ayant subi un AC hors hôpital, plus d'un tiers des patients a développé une dysfonction rénale post-AC. Toutefois, l'insuffisance rénale n'était pas associée à la survie post-AC chez ces patients [329]. Ces résultats permettent de suggérer que la sous-expression du miR-122-5p chez les patients ayant un mauvais pronostic pourrait dépendre de la présence d'une dysfonction rénale

post-AC. Cette hypothèse reste cependant à confirmer et ne permet pas d'identifier la source de miR-122-5p circulant.

L'hypothermie thérapeutique modifie l'expression des miARN dans le cerveau (données obtenues *in vivo* et *in vitro*) [330,331]. En particulier, l'hypothermie testée dans un modèle porcin de choc cardiogénique était associée à une diminution des niveaux plasmatiques de miR-122-5p [332]. Dans notre cohorte, nous observons une tendance inverse : les niveaux de miR-122-5p sont légèrement plus élevés chez les patients traités avec 33°C que ceux traités avec une hypothermie à 36°C. De plus, la différence de température de traitement n'est pas associée avec l'évolution neurologique post-AC et n'affecte pas l'association existante entre le miR-122-5p et cette évolution.

Cette étude présente des limites : la cohorte utilisée au cours de cette étude est une sous-cohorte de la cohorte TTM. Toutefois, il n'y avait pas de différences de caractéristiques cliniques ou démographiques entre les deux cohortes. D'autres analyses devront être effectuées pour établir le meilleur moment (dans les 3 jours post-AC) pour mesurer le miR-122-5p pour optimiser ses qualités prédictives.

- Valeur du miR-574-5p dans l'AC (Etude 5)

Le but de cette étude était d'évaluer la valeur prédictive pronostique post-AC du miR-574-5p dans une grande cohorte de patients. Nous avons pu identifier le miR-574-5p comme prédicteur univarié de l'évolution neurologique et de la survie post-AC. De plus, les niveaux circulants du miR-574-5p étaient un prédicteur indépendant de l'évolution neurologique post-AC chez les femmes, mais pas chez les hommes.

Nous avions choisi d'étudier ce miARN car une étude à moyenne échelle (134 patients) montrait qu'il était surexprimé dans le plasma de patients porteurs d'une cardiopathie ischémique comparée à des personnes saines [287]. Les cardiopathies ischémiques sont une cause d'AC. Dans notre cohorte, nous n'avons pas observé de modulation de l'expression plasmatique du miR-574-5p chez les patients ayant des antécédents de cardiopathie ischémique. Le fait que le premier rythme monitoré post-AC soit une TV ou une FV, représente une manifestation de cardiopathie ischémique. Toutefois, dans notre étude, l'expression du miR-574-5p n'était pas significativement associée avec le premier rythme monitoré après l'AC. Parallèlement, les niveaux de miR-574-5p étaient faiblement corrélés avec les marqueurs cardiaques NT-proBNP et c-TnT-us. Ces résultats semblent contradictoires à ceux

reportés dans la littérature. Cette différence pourrait être expliquée par le fait que notre cohorte ne contient que des patients ayant subi un AC de type cardiaque et que tous les patients ont été inclus, indépendamment de la présence d'une ischémie.

Les niveaux circulants de miR-574-5p étaient associés avec l'âge, qui était également un prédicteur indépendant de l'évolution neurologique et de la survie post-AC. Pour les hommes, le miR-574-5p ne semble pas être indépendamment associé avec l'évolution neurologique et la survie post-AC, car il n'est pas un prédicteur significatif dans un modèle contenant l'âge comme co-variable. En revanche, pour les femmes, le miR-574-5p est un prédicteur indépendant de l'évolution neurologique post-AC, même après ajustement par l'âge. Le miR-574-5p apparaît ainsi comme un marqueur pronostique robuste de l'évolution neurologique post-AC chez les femmes.

Les niveaux circulants de miR-574-5p étaient également associés avec le temps écoulé entre l'AC et le RACS, la présence d'un état de choc à l'admission et les niveaux initiaux de lactate sériques. Ces trois variables sont associées à l'ischémie et au temps passé en conditions hypoxiques. Les niveaux de lactate sont également élevés en cas de choc septique et sont prédicteurs de la mort chez ces patients [333]. Les niveaux circulants de miR-574-5p étaient également prédicteurs de la mort après un choc septique [334], suggérant un lien entre ce miARN et l'hypoxie. De plus, le miR-574-5p était surexprimé dans les cellules K562 (cellules issues de leucémie myéloïde chronique) sur-exprimant la sous-unité alpha du facteur 1 inductible par l'hypoxie (HIF-1a ou *hypoxia inducible factor 1a)*, un facteur de transcription régulant les réponses cellulaires et systémiques à l'hypoxie. En revanche, dans cette étude, le miR-574-5p n'était pas surexprimé en conditions hypoxiques [335]. Nous avons également observé que les niveaux circulants de miR-574-5p étaient plus élevés chez les patients ayant reçu une hypothermie thérapeutique à 33°C que ceux traités à 36°C. Au cours de cette hypothermie, l'utilisation d'une température de 33°C n'a pas amélioré l'évolution neurologique ou la survie comparée à l'utilisation de 36°C [120]. Cependant, une hypothermie (32°C pendant 24h) dans les cellules HeLa induit une surexpression de HIF-1a [336]. Ces résultats suggèrent une possible implication du miR-574-5p dans la voie de signalisation de HIF1-a, qui devra être étudiée de manière plus approfondie dans le futur.

Les niveaux de miR-574-5p étaient également corrélés avec ceux de la NSE et de la protéine S100b. Cette dernière est exprimée par les cellules gliales, alors que la NSE est exprimée par les neurones. Ces deux protéines sont libérées lors de dommages cérébraux de causes diverses [337-339]. Par ailleurs, le miR-574-p peut promouvoir la différentiation de cellules neuronales progénitrices en neurones [340].

Les niveaux cérébraux de miR-574-5p sont diminués chez les souris ayant subi des dommages cérébraux par exposition aux particules fines [341]. Dans ce modèle, une augmentation induite des niveaux cérébraux de miR-574-5p permettait de restaurer les dommages synaptiques et cognitifs dus à l'exposition aux particules fines. Le miR-574-5p apparait ainsi comme impliqué dans la réparation synaptique et pourrait être libéré par le tissu cérébral endommagé, mais à un degré bien moindre que la NSE ou la protéine S100b. De plus, l'affaiblissement de la barrière hémato-encéphalique provoquée par une ischémie [342] facilite la libération de miARN depuis le cerveau vers la circulation sanguine [343,344]. Au cours d'études antérieures menées par notre laboratoire, d'autres miARN ont été étudiés dans le contexte de l'AC hors hôpital. Les miR-122-5p et 124-3p ont montré une forte association avec l'évolution neurologique et la survie post-AC, dans la cohorte TTM. En particulier, le miR-124-3p est fortement exprimé dans le cerveau, alors que le miR-122-5p est plus exprimé dans le foie. La corrélation positive entre les niveaux de miR-124-3p et de miR-574-5p renforce l'idée qu'une des sources de miR-574-5p plasmatique pourrait être le cerveau. Cependant, nous n'avons ici pas de preuves que le miR-574-5p est effectivement libéré depuis le cerveau dans la circulation sanguine. Cela nécessiterait une étude plus approfondie.

Une autre étude a rapporté que les niveaux circulants de miR-574-5p étaient augmentés chez les patients souffrant d'un cancer du poumon à petites cellules [345]. Il aurait même une valeur diagnostique chez ces patients. La BPCO est un facteur de risque de cancer du poumon, mais en est également un pour l'AC et est associée avec des variations du rythme cardiaque [346]. Cependant, nous n'avons pas observé d'association entre le miR-574-5p et la BPCO au cours de cette étude, et aucune autre étude, à notre connaissance, ne rapporte une telle information.

Dans le contexte de l'AC, plusieurs différences ont été rapportées entre hommes et femmes [347]: par exemple, les femmes présentent une proportion plus faible d'AC survenant en présence de témoin, et les femmes ont moins d'AC d'étiologie cardiaque que les hommes [348]. Des différences de traitement (comme l'utilisation de l'angiographie coronaire) ont même été rapportées entre les deux sexes [349,350]. Dans une étude effectuée sur l'ensemble de la cohorte TTM, les femmes avaient un taux de mortalité post-AC supérieur aux hommes. Cette mortalité était également associée à d'autres facteurs tels que les circonstances de l'AC ou le traitement à l'hôpital, et n'était plus associée au sexe féminin après ajustement avec les co-variables. Cette étude suggère ainsi que la différence de mortalité entre les femmes et les hommes serait ainsi plutôt liée aux circonstances de l'AC plutôt qu'au genre féminin en lui-même [351].

Parallèlement, différences études présentées et citées dans les directives du Conseil Européen de Réanimation (*ou European Resuscitation Council*), et notamment celles impliquées dans le choix de mesure de la NSE, présentent des proportions d'hommes entre 46,6 et 79,7% [286]. Cette sous-représentation générale des femmes dans les études portant sur l'AC a ainsi conduit à une extrapolation des résultats obtenus des populations essentiellement masculines aux femmes [286]. A notre connaissance, il n'y a pas d'association décrite entre le miR-574-5p et le genre, bien que les niveaux circulants de miR-574-5p soient augmentés chez les femmes souffrant de pré-éclampsie [352].

Nous avons identifié le miR-574-5p comme un prédicteur de l'évolution neurologique à 6 mois post-AC spécifique pour les femmes, dans une sous-cohorte de la cohorte TTM. Dans le contexte de l'AC, les femmes représentent une population minoritaire pour laquelle moins d'études ont été effectuées. Ainsi, pour cette population, moins d'informations sont disponibles que pour les hommes, qui constituent le plus grand nombre de patients subissant un AC. La découverte de biomarqueurs spécifiques des hommes ou des femmes est essentielle dans le contexte de la médecine personnalisée.

La limite principale de cette étude est que la valeur pronostique spécifique aux femmes du miR-574-5p devra être validée dans de grandes cohortes indépendantes avant d'envisager son utilisation en clinique. Une autre limite de cette étude est que la cohorte utilisée ici est une sous-cohorte de la cohorte TTM. Les différences entre la sous-cohorte plasma et la cohorte totale ont été étudiées : seule la proportion de patients alcooliques diffère entre les deux cohortes. Ainsi, la sous-cohorte utilisée ici semble être représentative de la cohorte TTM entière. Egalement, le choix du miR-574-5p reposait sur son association avec la cardiopathie ischémique. Toutefois, de nombreux miARN sont impliqués dans cette maladie, et il serait également intéressant d'étudier leur éventuelle implication dans l'AC. Enfin, il existe une différence de pouvoir statistique entre les groupes hommes (n=481) et femmes (n=109).

❖ Accent porté sur la spécificité des miARN

Au cours de ce travail, nous avons observé que le miR-574-5p montre des capacités de biomarqueur diagnostique de l'AAT, mais également un potentiel de biomarqueur prédictif de l'évolution neurologique post-AC, spécifiquement pour les femmes. Bien que ces deux maladies restent des MCV avec une influence importante sur le système circulatoire (modification de l'hémodynamisme pour l'AAT, arrêt ou fortes modifications du flux sanguin pour l'AC) et que la rupture d'un AAT

puisse mener à un AC, ces maladies restent différentes. Si, parmi la sous-cohorte TTM utilisée dans l'étude 5, nous avions des patients ayant subi un AC en relation avec un AAT, il aurait été intéressant d'observer si l'expression du miR-574-5p était différente ou non de celle des autres patients. Cependant, cette information n'était pas disponible.

Dans la littérature, le miR-574-5p est également connu comme étant un potentiel biomarqueur du cancer du poumon à petites cellules [345], est sous-exprimé dans le sérum des patients décédés comparés aux survivants d'un choc septique [334] et surexprimé dans le plasma de patients souffrant d'une cardiopathie ischémique comparée à des personnes saines [287] (bien que nous n'ayons pas observé cela dans la sous-cohorte TTM).

Nous avons également observé un potentiel prédictif pour le miR-122-5p après un AC. Dans la littérature, ce miARN est pourtant rapporté sur [220] et sous-exprimé [211] dans le sang de patients après un IM. Il semble également présenter une valeur prédictive dans le cancer colorectal [353], et pour le carcinome rénal [354]. Enfin, il était surexprimé dans le sérum de patients souffrant de septicémie, et était capable de prédire la survie à 30 jours de ces patients avec une AUC de 0,74 [355].

Ces résultats soulèvent la question de la spécificité de ces biomarqueurs potentiels. Idéalement, un biomarqueur serait uniquement spécifique de la maladie à laquelle il est associé. Toutefois, les miARN ne sont généralement pas confinés à une seule fonction, dans une seule maladie précise et sont rarement exprimés dans un seul tissu. Aussi, plusieurs miARN sont différentiellement exprimés dans différentes MCV. Le miR-21 est surexprimé dans le sang de patients ayant eu un IM [215,216], à 48h post-AC[260], mais diminué chez les patients porteurs d'un AAT [20] ou souffrant de fibrillation auriculaire [257]. Le miR-133a est surexprimé dans le sang de patients après un IM [209,211,221], de ceux porteurs d'un AAT [20] et d'enfants souffrant de TV [255]. En parallèle, le miR-133b est fortement exprimé dans le sang de personnes ayant subi un IM [211] et de ceux ayant eu un AC [263].

Les niveaux circulants de ces miARN sont également modulés dans le contexte d'autres maladies. Par exemple, le miR-21-5p semble également être un biomarqueur diagnostic du cancer du pancréas [356], du cancer du poumon à petites cellules [357], du cancer du sein [358]. Le miR-133a semble être associé à une valeur prédictive de la survie de patients souffrant d'un cancer du poumon à petites cellules [359].

Plusieurs considérations permettent d'expliquer tant de résultats différents. En premier lieu, certains miARN ont été beaucoup étudiés (comme par exemple le miR-21 ou le miR-133a) et cela dans

plusieurs domaines, menant à l'obtention d'une grande quantité de résultats. Le miR-21 est impliqué dans la fibrose, est fortement exprimé dans les fibroblastes cardiaques, et il est également impliqué dans les modifications de la MEC [360]. Ces caractéristiques peuvent justifier son rôle dans les MCV, et en particulier la cicatrisation post-IM ou les modifications de la MEC observées au cours de l'AAT, tout comme dans le cancer. Le miR-133 est impliqué dans la prolifération cellulaire [361], mais est également spécifiquement exprimé dans les muscles et une altération de son expression conduit à une altération de la fonction cardiaque (arythmie, IC) [362]. Ces fonctions peuvent expliquer son rôle dans les MCV mais également dans le cancer.

Les gènes cibles et fonctions du miR-574-5p ont été moins explorés que pour le miR-21. Le miR-574-5p est associé à une augmentation de la prolifération cellulaire pour les CML [312], les cellules cancéreuses de la thyroïde [363], les cellules cancéreuses colorectales [364], bien qu'une autre étude rapporte son association avec une diminution de la prolifération dans des cellules cancéreuses colorectales [365]. L'association entre le miR-574-5p et la prolifération cellulaire n'est pas encore totalement élucidée, toutefois le miR-574-5p est capable de réguler négativement les protéines Quaking [363,364]. Ces protéines sont des protéines qui se lient à l'ARN, et qui régulent l'épissage des pré-ARNm, leur export depuis le noyau, leur stabilité et la traduction. Elles sont associées à la détermination de la destinée cellulaire, de l'apoptose, de la progression du cycle cellulaire et à la différentiation [363]. Or, le miR-574-5p peut promouvoir la différentiation de cellules neuronales progénitrices en neurones [340]. L'expression du miR-574-5p était également modulée dans les cellules K562 en réponse à la surexpression de HIF1a. Au cours de l'étude 3, le miR-574-5p était exprimé dans le cœur, dans le foie et dans le rein des souris. Considérées ensemble, toutes ces informations laissent suggérer que le miR-574-5p n'est pas exprimé spécifiquement dans un seul organe, mais qu'il pourrait réguler le cycle cellulaire de nombreuses cellules et éventuellement en réponse à certains stimuli (tels que la surexpression d'HIF1a).

De même, la fonction du miR-122-5p a été relativement peu étudiée, bien que ce miARN soit le miARN le plus exprimé dans le foie. Il participe au métabolisme des lipides [366] et à la réponse au stress des cellules hépatiques [367]. Il est également associé à une inhibition de la prolifération des hépatocytes chez la souris [368], d'hépato-carcinome [369], de cellules cancéreuses du sein [370] et de cellules cancéreuses gastriques [371]. De plus, il semble agir comme un suppresseur de tumeur pour ces deux types de cancer. Tout comme pour le miR-574-5p, ces résultats laissent suggérer un rôle dans le cycle cellulaire pour le miR-122-5p.

De plus, si les miARN circulants peuvent provenir de nombreux tissus, et remplir plusieurs fonctions, la spécificité des miARN circulants pour une maladie donnée peut également être altérée par des conditions spécifiques environnementales ou associées au patient (telles que l'âge).

Par exemple, une récente étude à très grande échelle impliquant 5221 personnes a montré que 127 miARN étaient différentiellement exprimés dans le sang total selon l'âge [372]. Une autre étude s'est également intéressée aux variations des niveaux plasmatiques de miARN selon divers facteurs tels que l'âge, le sexe ou l'IMC. Sept miARN ont été identifiés comme associés avec l'âge (y compris les miR-126-3p et miR-21-5p), 15 étaient associés avec l'IMC (y compris le miR-122-5p, le miR-148a-3p et le miR-505-3p) et enfin 35 miARN étaient associés avec le sexe, dont en particulier les miR-145-5p, miR-451a et miR-143-3p [373]. Dans cette étude, le sexe module l'expression de nombreux miARN et de manière plus importante que l'âge ou l'IMC. Le sexe induit des modifications en profondeur dans l'organisme, qui ont des conséquences au point de vue physiologique mais également pathologique. Ces différences longtemps sous-estimées commencent actuellement à être prises en compte.

Par ailleurs, les variations journalières modifient également l'expression des miARN : les niveaux plasmatiques de 26 miARN sont rythmiques, ils sont modulés en fonction du rythme circadien [374]. De nombreux miARN sont également modulés par des facteurs de risque des MCV tels que l'hypertension, le diabète, l'hyperlipidémie ou encore l'obésité [192].

Enfin, des facteurs environnementaux tels que les traitements médicamenteux utilisés modifient aussi l'expression des miARN, tels que les facteurs pris en compte dans les scores GRACE et Framingham [192]. Ainsi, les expressions des miR-17, miR-145 et miR-155 ont été modifiées par les statines, les inhibiteurs du système rénine-angiotensine et l'aspirine, chez des patients souffrant de maladie coronarienne [375]. Les niveaux d'expression de 33 miARN ont été modifiés dans le sang total de patients traités avec des statines [376]. Une autre étude rapporte une modification de l'expression de 22 miARN dans le sang total, et 19 dans le plasma chez les patients sous statine [377]. De plus, différents types de statines ne modulent pas les miARN de la même façon. Chez des patients souffrant d'hypercholestérolémie, l'atorvastatine a induit une sous-régulation de 6 miARN circulants, alors que la simvastatine ne modifiait pas leur expression [378]. Les niveaux plasmatiques des miR-126, miR-223, miR-150, miR-96 étaient modifiés lors d'un changement de traitement antiplaquettaire (Clopidogrel remplacé par Ticagrelor) [379]. Les niveaux circulants de miR-126 et de miR-92a sont, quant à eux, diminués par l'aspirine [380,381]. En particulier, l'expression du miR-92a semble être

associée avec l'efficacité de l'aspirine et est moins diminuée chez les patients résistants à cette dernière [381].

La variabilité importante d'expression des miARN, dans des conditions physiologiques mais également pathologiques laisse entrevoir leur immense potentiel régulateur et leur immense implication dans de nombreux processus biologiques. Le corps humain reste un ensemble, et, lorsque nous prenons l'exemple du miR-21-5p : il est associé à l'âge, au cancer, aux MCV et impliqué dans les mécanismes de fibrose et aux modifications de la MEC (entre autres). Toutes ces associations pourraient remettre en cause la spécificité de ce miARN envers l'une de ces maladies. Toutefois, elles ne sont pas illogiques au vu des changements des tissus conjonctifs dans l'âge, les processus cancéreux et les remodelages cardiaques et vasculaires observés dans les MCV.

Le moyen le plus efficace de valider et de sécuriser l'utilisation d'un miARN comme biomarqueur d'une maladie est d'étudier et de comprendre le rôle qu'il joue dans cette maladie. Cette partie est essentielle, et ainsi l'utilisation des miR-122-5p et le miR-574-5p décrits ici ne sera envisageable qu'après une investigation de leur implication dans la pathogénèse de l'AC, et du rôle paracrine du miR-574-5p dans l'AAT : de son origine cellulaire et surtout, des modifications qu'il induit dans son tissu cible. Ce raisonnement s'applique également aux nombreux miARN présentés dans la littérature comme ayant un potentiel de biomarqueur des MCV. L'étude et la compréhension de l'influence et de la fonction des miARN n'en est actuellement qu'à ses débuts et de nombreux efforts devraient être menés dans les années à venir pour élucider l'origine et le rôle des miARN présentant les potentiels de biomarqueurs les plus prometteurs.

❖ Potentiel thérapeutique du transcriptome sanguin

Le transcriptome sanguin (et en particulier les ARN non-codants) représente un réservoir de biomarqueurs, mais également un réservoir de cibles thérapeutiques. En premier lieu, les transcrits dérégulés qui contribuent au développement et à la progression d'une MCV représentent des cibles potentielles. En second lieu, les transcrits secrétés dans les VE puis libérés dans la circulation sanguine ne sont pas des marqueurs « passifs » de la mort cellulaire [127]. Enfin, les transcrits sanguins sont plus facile d'accès (pour être modulés) que les transcrits tissulaires.

L'expression des transcrits peut être modulée via l'utilisation d'oligo-nucléotides : certains miment la séquence de l'ARN d'intérêt, tel que les *mimics*, qui miment un miARN ; alors que d'autres sont complémentaires de la séquence de l'ARN d'intérêt et s'y lient pour aboutir à la suppression de son expression. C'est le cas des *antimiRs*, qui inhibent l'expression d'un miARN ou encore des *GapmeRs* capables d'inhiber l'expression d'un lncARN.

Les molécules ARN non endogènes sont exposées aux RNAses dans le sang et dans les tissus et doivent être protégées de la dégradation pour atteindre leur cible. Des systèmes de libération ont ainsi été mis en place pour protéger ces molécules exogènes. Ils reposent sur l'utilisation :

- De polymères tels que la cyclodextrine [382], le chitosan [383], le poly(lactide-co-glyoclide) [384], le polyethylenimine [385] et le polye(ethyleène glycol) [386] qui peuvent s'associer au nucléotides pour les protéger
- De lipides [387] ou de nanoparticules à base de lipides [388] qui peuvent englober les oligonucléotides
- De vecteurs adénovirus qui encodent la séquence pour les ARN d'intérêt [389,390].

Plusieurs essais cliniques en cours visent à évaluer l'utilisation thérapeutique des miARN. Deux de ces essais visent à diminuer l'expression du miR-122 (par utilisation d'*antimiR-122*) dans le contexte de l'hépatite C chronique [391,392]. Ces deux essais utilisent des systèmes de libération de l'*antimiR* différentes. D'autres essais visent à augmenter l'expression de certains miARN, dans le contexte de la sclérodermie et de divers cancers. A notre connaissance, aucun essai clinique en cours ne vise à utiliser des lncARN [393]. Cependant, leur utilisation est étudiée *in vitro* et *in vivo* [394].

L'utilisation thérapeutique des ARN non-codants en est actuellement à ses débuts. Elle conduira probablement à la mise en place de nombreux nouveaux traitements. Grâce au rôle épigénétique des ARN non codants, ces traitements permettront de réguler l'expression génétique sans modification de l'acide désoxyribonucléique (ADN) cellulaire et de manière ciblée, limitant les effets secondaires.

L'utilisation réelle des biomarqueurs transcriptomiques dans les MCV en est à ses prémices. Elle était jusque-là fortement limitée par l'hétérogénéité des résultats obtenus, inhérente aux faiblesses des différentes techniques utilisées pour mesurer les transcrits, une grande absence de normalisation des pratiques entre les laboratoires et la taille variable des cohortes utilisées [395].

De nouvelles technologies ont été développées et vont maintenant rendre possible la mesure de n'importe quel transcrit directement dans le sang avec fiabilité. Ces nouvelles techniques permettront également la mise en place d'une homogénéisation des pratiques et vont faciliter la mesure de nouveaux biomarqueurs transcriptomiques potentiels sur de grandes cohortes de patients. En attendant, ces techniques sont encore peu utilisées et une pharmacopée de nouveaux biomarqueurs transcriptomiques potentiels est en cours de développement.

Ce travail de thèse a participé à l'établissement de cette pharmacopée, et au formidable effort commun effectué pour caractériser le profil, la signature d'expression de transcrits spécifiques de chacune des maladies étudiées. Il a également montré qu'une combinaison de biomarqueurs complémentaires permet d'augmenter leur valeur de prédiction. Cette information laisse suggérer qu'une amélioration de la prédiction ou du diagnostic serait permise par les nouvelles techniques développées afin de mesurer simultanément plusieurs biomarqueurs [197].

Toutefois, les résultats présentés ici devront être validés dans de grandes cohortes (et idéalement avec des techniques de mesure plus directes que la transcription inverse et la PCR quantitative) avant de pouvoir envisager leur utilisation dans un contexte clinique. Enfin la majeure faiblesse de ce travail, ainsi que de nombreux autres travaux liés aux biomarqueurs, repose sur l'absence d'études mécanistiques permettant de comprendre l'origine et la fonction des biomarqueurs identifiés dans le contexte de leur maladie, qui sont essentielles pour confirmer la spécificité du biomarqueur envers la maladie qu'il diagnostique ou prédit.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence l'existence d'un biais technique d'un outil de mesure du transcriptome sanguin ; ainsi que la caractérisation de la valeur diagnostique ou pronostique de transcrits sanguins et de miARN dans le cadre de trois MCV: l'IM, l'AAT et l'AC.

Dans une première étude, nous nous sommes intéressés aux limites techniques associées à l'étude du transcriptome sanguin. Nous avons pu démontrer que l'héparine présente à des taux endogènes dans le sang pouvait interférer avec la mesure par transcription inverse et PCR quantitative de l'expression de miARN circulants, dans le sérum et le plasma. Cette technique est largement utilisée pour les études du transcriptome sanguin, et ces résultats mettent en valeur un biais technique jusque-là non reconnu. Ce biais représente une limite supplémentaire interindividuelle, en plus des limites préexistantes de cette technique, qui la rendent relativement peu attractive pour une utilisation clinique.
Le développement d'autres techniques, directes, rapides et simples à mettre en œuvre faciliterait l'étude du transcriptome sanguin et son utilisation en clinique.

Au cours d'une seconde étude, nous avons évalué le potentiel pronostique de l'évolution cardiaque post-IM de l'expression de 5 transcrits (codants pour les gènes *LMNB1, MMP9, TGFBR1, LTBP4* et *TNXB*). Les transcrits ont été mesurés dans le sang total de 449 patients. Parmi eux, les transcrits codants pour les gènes *LTBP4, TGFBR1* et *TNXB* étaient des prédicteurs indépendants de la fonction cardiaque après un IM. De plus, l'utilisation combinée de ces 3 transcrits permettait d'améliorer la valeur prédictive d'un modèle de prédiction contenant les paramètres cliniques connus pour être associés avec la fonction cardiaque.
Cette étude montre que la combinaison de plusieurs biomarqueurs (transcriptomiques en outre) peut améliorer la valeur de prédiction.

La troisième étude visait à identifier des miARN associés à l'AAT et capables de diagnostiquer cette maladie. Cette étude comportait une première étape de découverte menée dans le tissu aortique anévrismal ou sain et a permis d'identifier le miR-574-5p comme miARN d'intérêt. Les niveaux sériques de ce miARN sont capables de discriminer les patients souffrant d'un AAT des contrôles sains. Dans un modèle de souris développant des AAT, les souris $Fbn1^{C1039G/+}$, le miR-574-5p est inclus dans des VE dans le sang, suggérant son rôle paracrine dans cette maladie.

Des études complémentaires devraient être effectuées pour approfondir l'étude de l'association entre le miR-574-5p et la dissection aortique, qui peut survenir suite à un AAT.

Lors des quatrième et cinquième études, nous avons évalué le potentiel de prédiction de l'évolution neurologique post-AC de miARN. Pour l'étude 4, l'expression du miR-122-5p dans le sérum de patients ayant subi un AC était un prédicteur indépendant de l'évolution neurologique et de la survie. De plus, son inclusion dans un modèle prédictif contenant d'autres paramètres cliniques et un autre miARN précédemment associé à l'AC permet une amélioration de la valeur prédictive.
Pour l'étude 5, l'expression du miR-574-5p mesurée dans le plasma de patients ayant eu un AC était un prédicteur indépendant de l'évolution neurologique pour les femmes, mais pas pour les hommes. *La découverte d'un biomarqueur potentiel spécifique des femmes constitue un pas de plus vers la médecine personnalisée, menant à l'avènement de biomarqueurs prenant en compte les variabilités de l'individu.*

Pour toutes ces études, le potentiel diagnostique ou pronostique des transcrits et miARN présentés ici devra être validé dans une ou plusieurs études indépendantes à grande échelle avant de pouvoir envisager leur utilisation effective en clinique.

De plus, l'origine des biomarqueurs potentiels présentés ici n'a pas été définie avec exactitude. Déterminer l'origine et le mécanisme de ces biomarqueurs potentiels permettrait d'affirmer ou d'incriminer leur association spécifique avec la maladie qu'ils semblent être capables de diagnostiquer ou pour laquelle ils semblent être capable de prédire le pronostic. Cela permettrait également d'envisager leur utilisation de manière thérapeutique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Site Officiel de l'Organisation Mondiale de la Santé. 2018; http://www.who.int/fr/home.
2. Moriwaki Y, Tahara Y, Kosuge T, Suzuki N. Etiology of out-of-hospital cardiac arrest diagnosed via detailed examinations including perimortem computed tomography. *J Emerg Trauma Shock.* 2013;62:87-94.
3. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2012;3320:2551-2567.
4. Torabi A, Cleland JG, Khan NK, Loh PH, Clark AL, Alamgir F, Caplin JL, Rigby AS, Goode K. The timing of development and subsequent clinical course of heart failure after a myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2008;297:859-870.
5. Goldfinger JZ, Halperin JL, Marin ML, Stewart AS, Eagle KA, Fuster V. Thoracic aortic aneurysm and dissection. *Journal of the American College of Cardiology.* 2014;6416:1725-1739.
6. Coady MA, Rizzo JA, Hammond GL, Mandapati D, Darr U, Kopf GS, Elefteriades JA. What is the appropriate size criterion for resection of thoracic aortic aneurysms? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1997;1133:476-491; discussion 489-491.
7. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation.* 2017;13510:e146-e603.
8. Grasner JT, Lefering R, Koster RW, et al. EuReCa ONE-27 Nations, ONE Europe, ONE Registry: A prospective one month analysis of out-of-hospital cardiac arrest outcomes in 27 countries in Europe. *Resuscitation.* 2016;105:188-195.
9. Consortium EP. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012;4897414:57-74.
10. Devaux Y. Transcriptome of blood cells as a reservoir of cardiovascular biomarkers. *Biochim Biophys Acta.* 2017;18641:209-216.
11. Thum T, Condorelli G. Long noncoding RNAs and microRNAs in cardiovascular pathophysiology. *Circulation research.* 2015;1164:751-762.
12. Gustafson D, Veitch S, Fish JE. Extracellular Vesicles as Protagonists of Diabetic Cardiovascular Pathology. *Front Cardiovasc Med.* 2017;4:71.
13. Ramakrishnan DP, Hajj-Ali RA, Chen Y, Silverstein RL. Extracellular Vesicles Activate a CD36-Dependent Signaling Pathway to Inhibit Microvascular Endothelial Cell Migration

and Tube Formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2016;363:534-544.

14. Vargas J, Lima JA, Kraus WE, Douglas PS, Rosenberg S. 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.
15. Crespo-Leiro MG, Stypmann J, Schulz U, et al. Performance of gene-expression profiling test score variability to predict future clinical events in heart transplant recipients. *BMC Cardiovasc Disord.* 2015;15:120.
16. Kiliszek M, Burzynska B, Michalak M, Gora M, Winkler A, Maciejak A, Leszczynska A, Gajda E, Kochanowski J, Opolski G. Altered gene expression pattern in peripheral blood mononuclear cells in patients with acute myocardial infarction. *PloS one.* 2012;711:e50054.
17. Gidlof O, Andersson P, van der Pals J, Gotberg M, Erlinge D. Cardiospecific microRNA plasma levels correlate with troponin and cardiac function in patients with ST elevation myocardial infarction, are selectively dependent on renal elimination, and can be detected in urine samples. *Cardiology.* 2011;1184:217-226.
18. Kuwabara Y, Ono K, Horie T, Nishi H, Nagao K, Kinoshita M, Watanabe S, Baba O, Kojima Y, Shizuta S, Imai M, Tamura T, Kita T, Kimura T. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circulation Cardiovascular genetics.* 2011;44:446-454.
19. Vausort M, Wagner DR, Devaux Y. Long noncoding RNAs in patients with acute myocardial infarction. *Circulation research.* 2014;1157:668-677.
20. Ikonomidis JS, Ivey CR, Wheeler JB, Akerman AW, Rice A, Patel RK, Stroud RE, Shah AA, Hughes CG, Ferrari G, Mukherjee R, Jones JA. Plasma biomarkers for distinguishing etiologic subtypes of thoracic aortic aneurysm disease. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013;1455:1326-1333.
21. Moushi A, Michailidou K, Soteriou M, Cariolou M, Bashiardes E. MicroRNAs as possible biomarkers for screening of aortic aneurysms: a systematic review and validation study. *Biomarkers.* 2018;233:253-264.
22. Eun JW, Yang HD, Kim SH, Hong S, Park KN, Nam SW, Jeong S. Identification of novel biomarkers for prediction of neurological prognosis following cardiac arrest. *Oncotarget.* 2017;810:16144-16157.
23. Gilje P, Gidlof O, Rundgren M, Cronberg T, Al-Mashat M, Olde B, Friberg H, Erlinge D. The brain-enriched microRNA miR-124 in plasma predicts neurological outcome after cardiac arrest. *Crit Care.* 2014;182:R40.

24. BRIF BB-0033-00029; Thoracic Aneurysm Aorta (TAA); BBMRI-EU/infrastructure BIOBANQUE; No Access: 38, Last: January 2,2013.[BIORESOURCE]. In.
25. Pfisterer ME, Battler A, Zaret BL. Range of normal values for left and right ventricular ejection fraction at rest and during exercise assessed by radionuclide angiocardiography. *Eur Heart J.* 1985;68:647-655.
26. Back M, Gasser TC, Michel JB, Caligiuri G. Biomechanical factors in the biology of aortic wall and aortic valve diseases. *Cardiovasc Res.* 2013;992:232-241.
27. Vriz O, Driussi C, Bettio M, Ferrara F, D'Andrea A, Bossone E. Aortic root dimensions and stiffness in healthy subjects. *The American journal of cardiology.* 2013;1128:1224-1229.
28. McComb BL, Munden RF, Duan F, Jain AA, Tuite C, Chiles C. Normative reference values of thoracic aortic diameter in American College of Radiology Imaging Network (ACRIN 6654) arm of National Lung Screening Trial. *Clin Imaging.* 2016;405:936-943.
29. Kalsch H, Lehmann N, Mohlenkamp S, Becker A, Moebus S, Schmermund A, Stang A, Mahabadi AA, Mann K, Jockel KH, Erbel R, Eggebrecht H. Body-surface adjusted aortic reference diameters for improved identification of patients with thoracic aortic aneurysms: results from the population-based Heinz Nixdorf Recall study. *Int J Cardiol.* 2013;1631:72-78.
30. Belz GG. Elastic properties and Windkessel function of the human aorta. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1995;91:73-83.
31. Andersson C, Vasan RS. Epidemiology of cardiovascular disease in young individuals. *Nat Rev Cardiol.* 2018;154:230-240.
32. Foxwell R, Morley C, Frizelle D. Illness perceptions, mood and quality of life: a systematic review of coronary heart disease patients. *J Psychosom Res.* 2013;753:211-222.
33. Rohde LE, Bertoldi EG, Goldraich L, Polanczyk CA. Cost-effectiveness of heart failure therapies. *Nat Rev Cardiol.* 2013;106:338-354.
34. Sokoreli I, de Vries JJ, Pauws SC, Steyerberg EW. Depression and anxiety as predictors of mortality among heart failure patients: systematic review and meta-analysis. *Heart Fail Rev.* 2016;211:49-63.
35. Carney RM, Freedland KE. Depression and coronary heart disease. *Nat Rev Cardiol.* 2017;143:145-155.
36. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation.* 1998;9718:1837-1847.
37. Granger CB, Goldberg RJ, Dabbous O, Pieper KS, Eagle KA, Cannon CP, Van De Werf F, Avezum A, Goodman SG, Flather MD, Fox KA, Global Registry of Acute Coronary Events

I. Predictors of hospital mortality in the global registry of acute coronary events. *Arch Intern Med.* 2003;16319:2345-2353.

38. McAllister DA, Halbesma N, Carruthers K, Denvir M, Fox KA. GRACE score predicts heart failure admission following acute coronary syndrome. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care.* 2015;42:165-171.
39. Alvarez-Alvarez B, Raposeiras-Roubin S, Abu-Assi E, Cambeiro-Gonzalez C, Gestal-Romani S, Lopez-Lopez A, Bouzas-Cruz N, Castineira-Busto M, Saidhodjayeva O, Redondo-Dieguez A, Pereira Lopez E, Garcia-Acuna JM, Gonzalez-Juanatey JR. Is 6-month GRACE risk score a useful tool to predict stroke after an acute coronary syndrome? *Open Heart.* 2014;11:e000123.
40. Writing Group M, Mozaffarian D, Benjamin EJ, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation.* 2016;1334:e38-360.
41. Anand SS, Islam S, Rosengren A, Franzosi MG, Steyn K, Yusufali AH, Keltai M, Diaz R, Rangarajan S, Yusuf S, Investigators I. Risk factors for myocardial infarction in women and men: insights from the INTERHEART study. *Eur Heart J.* 2008;297:932-940.
42. Raso I, Passarelli I, Valenti G, Crimi G, de Servi S. The diagnostic process of stable angina: still many doubts since Heberden's first description 250 years ago. *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* 2018;192:45-50.
43. Giannitsis E, Kurz K, Hallermayer K, Jarausch J, Jaffe AS, Katus HA. Analytical validation of a high-sensitivity cardiac troponin T assay. *Clinical chemistry.* 2010;562:254-261.
44. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology.* 2012;6016:1581-1598.
45. Niccoli G, Burzotta F, Galiuto L, Crea F. Myocardial no-reflow in humans. *Journal of the American College of Cardiology.* 2009;544:281-292.
46. Wu KC, Zerhouni EA, Judd RM, Lugo-Olivieri CH, Barouch LA, Schulman SP, Blumenthal RS, Lima JA. Prognostic significance of microvascular obstruction by magnetic resonance imaging in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 1998;978:765-772.
47. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *Journal of the American College of Cardiology.* 2000;353:569-582.

48. Gombozhapova A, Rogovskaya Y, Shurupov V, Rebenkova M, Kzhyshkowska J, Popov SV, Karpov RS, Ryabov V. Macrophage activation and polarization in post-infarction cardiac remodeling. *J Biomed Sci.* 2017;241:13.

49. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SA, Zornoff LA. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol.* 2016;1061:62-69.

50. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC)Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J.* 2016;3727:2129-2200.

51. Association TCCotNYH. *Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of the Heart and Great Vessels. 9th ed* Little, Brown & Co; 1994.

52. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2017 ACC/AHA/HFSA Focused Update of the 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Failure Society of America. *Circulation.* 2017;1366:e137-e161.

53. Hall C. NT-ProBNP: the mechanism behind the marker. *J Card Fail.* 2005;115 Suppl:S81-83.

54. Kittleson MM, Kobashigawa JA. Cardiac Transplantation: Current Outcomes and Contemporary Controversies. *JACC Heart Fail.* 2017;512:857-868.

55. Libby ROBDMDZP. *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, Single Volume 9th Edition.* Saunders; 2011.

56. van Bogerijen GH, Tolenaar JL, Grassi V, Lomazzi C, Segreti S, Rampoldi V, Elefteriades JA, Trimarchi S. Biomarkers in TAA-the Holy Grail. *Prog Cardiovasc Dis.* 2013;561:109-115.

57. Milewicz DM, Regalado E. Heritable Thoracic Aortic Disease Overview. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews((R)).* Seattle (WA)1993.

58. Daily PO, Trueblood HW, Stinson EB, Wuerflein RD, Shumway NE. Management of acute aortic dissections. *Ann Thorac Surg.* 1970;103:237-247.

59. Olin JW, Fuster V. Acute aortic dissection: the need for rapid, accurate, and readily available diagnostic strategies. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2003;2310:1721-1723.

60. de Figueiredo Borges L, Jaldin RG, Dias RR, Stolf NA, Michel JB, Gutierrez PS. Collagen is reduced and disrupted in human aneurysms and dissections of ascending aorta. *Hum Pathol.* 2008;393:437-443.
61. Lindsay ME, Dietz HC. Lessons on the pathogenesis of aneurysm from heritable conditions. *Nature.* 2011;4737347:308-316.
62. Nagasawa A, Yoshimura K, Suzuki R, Mikamo A, Yamashita O, Ikeda Y, Tsuchida M, Hamano K. Important role of the angiotensin II pathway in producing matrix metalloproteinase-9 in human thoracic aortic aneurysms. *J Surg Res.* 2013;1831:472-477.
63. Cook JR, Carta L, Galatioto J, Ramirez F. Cardiovascular manifestations in Marfan syndrome and related diseases; multiple genes causing similar phenotypes. *Clin Genet.* 2015;871:11-20.
64. Michel JB, Jondeau G, Milewicz DM. From genetics to response to injury: vascular smooth muscle cells in aneurysms and dissections of the ascending aorta. *Cardiovasc Res.* 2018.
65. Gomez D, Coyet A, Ollivier V, Jeunemaitre X, Jondeau G, Michel JB, Vranckx R. Epigenetic control of vascular smooth muscle cells in Marfan and non-Marfan thoracic aortic aneurysms. *Cardiovasc Res.* 2011;892:446-456.
66. Moltzer E, Essers J, van Esch JH, Roos-Hesselink JW, Danser AH. The role of the renin-angiotensin system in thoracic aortic aneurysms: clinical implications. *Pharmacol Ther.* 2011;1311:50-60.
67. Michelena HI, Della Corte A, Prakash SK, Milewicz DM, Evangelista A, Enriquez-Sarano M. Bicuspid aortic valve aortopathy in adults: Incidence, etiology, and clinical significance. *Int J Cardiol.* 2015;201:400-407.
68. Vapnik JS, Kim JB, Isselbacher EM, Ghoshhajra BB, Cheng Y, Sundt TM, 3rd, MacGillivray TE, Cambria RP, Lindsay ME. Characteristics and Outcomes of Ascending Versus Descending Thoracic Aortic Aneurysms. *The American journal of cardiology.* 2016;11710:1683-1690.
69. Magenis RE, Maslen CL, Smith L, Allen L, Sakai LY. Localization of the fibrillin (FBN) gene to chromosome 15, band q21.1. *Genomics.* 1991;112:346-351.
70. Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, Maslen CL, Sakai LY, Corson GM, Puffenberger EG, Hamosh A, Nanthakumar EJ, Curristin SM, et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature.* 1991;3526333:337-339.
71. Merk DR, Chin JT, Dake BA, Maegdefessel L, Miller MO, Kimura N, Tsao PS, Iosef C, Berry GJ, Mohr FW, Spin JM, Alvira CM, Robbins RC, Fischbein MP. miR-29b participates

in early aneurysm development in Marfan syndrome. *Circulation research.* 2012;1102:312-324.

72. Lindsay ME, Schepers D, Bolar NA, et al. Loss-of-function mutations in TGFB2 cause a syndromic presentation of thoracic aortic aneurysm. *Nat Genet.* 2012;448:922-927.
73. Bertoli-Avella AM, Gillis E, Morisaki H, et al. Mutations in a TGF-beta Ligand, TGFB3, Cause Syndromic Aortic Aneurysms and Dissections. *Journal of the American College of Cardiology.* 2015;6513:1324-1336.
74. Loeys BL, Chen J, Neptune ER, et al. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet.* 2005;373:275-281.
75. van de Laar IM, Oldenburg RA, Pals G, et al. Mutations in SMAD3 cause a syndromic form of aortic aneurysms and dissections with early-onset osteoarthritis. *Nat Genet.* 2011;432:121-126.
76. Prakash SK, Bosse Y, Muehlschlegel JD, Michelena HI, Limongelli G, Della Corte A, Pluchinotta FR, Russo MG, Evangelista A, Benson DW, Body SC, Milewicz DM, Investigators BA. A roadmap to investigate the genetic basis of bicuspid aortic valve and its complications: insights from the International BAVCon (Bicuspid Aortic Valve Consortium). *Journal of the American College of Cardiology.* 2014;648:832-839.
77. Guo DC, Pannu H, Tran-Fadulu V, et al. Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. *Nat Genet.* 2007;3912:1488-1493.
78. Zhu L, Vranckx R, Khau Van Kien P, Lalande A, Boisset N, Mathieu F, Wegman M, Glancy L, Gasc JM, Brunotte F, Bruneval P, Wolf JE, Michel JB, Jeunemaitre X. Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus. *Nat Genet.* 2006;383:343-349.
79. Huang J, Davis EC, Chapman SL, Budatha M, Marmorstein LY, Word RA, Yanagisawa H. Fibulin-4 deficiency results in ascending aortic aneurysms: a potential link between abnormal smooth muscle cell phenotype and aneurysm progression. *Circulation research.* 2010;1063:583-592.
80. Lee VS, Halabi CM, Hoffman EP, Carmichael N, Leshchiner I, Lian CG, Bierhals AJ, Vuzman D, Brigham Genomic M, Mecham RP, Frank NY, Stitziel NO. Loss of function mutation in LOX causes thoracic aortic aneurysm and dissection in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2016;11331:8759-8764.

81. Barbier M, Gross MS, Aubart M, et al. MFAP5 loss-of-function mutations underscore the involvement of matrix alteration in the pathogenesis of familial thoracic aortic aneurysms and dissections. *American journal of human genetics.* 2014;956:736-743.
82. Guo DC, Regalado E, Casteel DE, et al. Recurrent gain-of-function mutation in PRKG1 causes thoracic aortic aneurysms and acute aortic dissections. *American journal of human genetics.* 2013;932:398-404.
83. Vaughan CJ, Casey M, He J, Veugelers M, Henderson K, Guo D, Campagna R, Roman MJ, Milewicz DM, Devereux RB, Basson CT. Identification of a chromosome 11q23.2-q24 locus for familial aortic aneurysm disease, a genetically heterogeneous disorder. *Circulation.* 2001;10320:2469-2475.
84. Guo D, Hasham S, Kuang SQ, Vaughan CJ, Boerwinkle E, Chen H, Abuelo D, Dietz HC, Basson CT, Shete SS, Milewicz DM. Familial thoracic aortic aneurysms and dissections: genetic heterogeneity with a major locus mapping to 5q13-14. *Circulation.* 2001;10320:2461-2468.
85. Cripe L, Andelfinger G, Martin LJ, Shooner K, Benson DW. Bicuspid aortic valve is heritable. *Journal of the American College of Cardiology.* 2004;441:138-143.
86. Lino Cardenas CL, Kessinger CW, MacDonald C, Jassar AS, Isselbacher EM, Jaffer FA, Lindsay ME. Inhibition of the methyltranferase EZH2 improves aortic performance in experimental thoracic aortic aneurysm. *JCI Insight.* 2018;35.
87. Alegret JM, Masana L, Martinez-Micaelo N, Heras M, Beltran-Debon R. LDL cholesterol and apolipoprotein B are associated with ascending aorta dilatation in bicuspid aortic valve patients. *QJM.* 2015;10810:795-801.
88. Hiratzka LF, Bakris GL, Beckman JA, et al. 2010 ACCF/AHA/AATS/ACR/ASA/SCA/SCAI/SIR/STS/SVM Guidelines for the diagnosis and management of patients with thoracic aortic disease. A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, American Association for Thoracic Surgery, American College of Radiology,American Stroke Association, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society of Thoracic Surgeons,and Society for Vascular Medicine. *Journal of the American College of Cardiology.* 2010;5514:e27-e129.
89. Mahadevia R, Barker AJ, Schnell S, Entezari P, Kansal P, Fedak PW, Malaisrie SC, McCarthy P, Collins J, Carr J, Markl M. Bicuspid aortic cusp fusion morphology alters aortic

three-dimensional outflow patterns, wall shear stress, and expression of aortopathy. *Circulation.* 2014;1296:673-682.

90. Guzzardi DG, Barker AJ, van Ooij P, et al. Valve-Related Hemodynamics Mediate Human Bicuspid Aortopathy: Insights From Wall Shear Stress Mapping. *Journal of the American College of Cardiology.* 2015;668:892-900.
91. Elefteriades JA, Sang A, Kuzmik G, Hornick M. Guilt by association: paradigm for detecting a silent killer (thoracic aortic aneurysm). *Open Heart.* 2015;21:e000169.
92. Erbel R, Aboyans V, Boileau C, et al. 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases: Document covering acute and chronic aortic diseases of the thoracic and abdominal aorta of the adult. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Aortic Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2014;3541:2873-2926.
93. Kubota H. Endovascular stent graft repair of the ascending aorta-final frontier in the endovascular treatment of the aorta. *J Thorac Dis.* 2016;810:E1358-E1360.
94. Priori SG, Blomstrom-Lundqvist C, Mazzanti A, et al. [2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac Death. The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology]. *G Ital Cardiol (Rome).* 2016;172:108-170.
95. Adabag AS, Luepker RV, Roger VL, Gersh BJ. Sudden cardiac death: epidemiology and risk factors. *Nat Rev Cardiol.* 2010;74:216-225.
96. Solomon SD, Zelenkofske S, McMurray JJ, et al. Sudden death in patients with myocardial infarction and left ventricular dysfunction, heart failure, or both. *N Engl J Med.* 2005;35225:2581-2588.
97. Koyak Z, Harris L, de Groot JR, Silversides CK, Oechslin EN, Bouma BJ, Budts W, Zwinderman AH, Van Gelder IC, Mulder BJ. Sudden cardiac death in adult congenital heart disease. *Circulation.* 2012;12616:1944-1954.
98. Narayanan K, Uy-Evanado A, Teodorescu C, Reinier K, Nichols GA, Gunson K, Jui J, Chugh SS. Mitral valve prolapse and sudden cardiac arrest in the community. *Heart Rhythm.* 2016;132:498-503.
99. Shen WK, Edwards WD, Hammill SC, Bailey KR, Ballard DJ, Gersh BJ. Sudden unexpected nontraumatic death in 54 young adults: a 30-year population-based study. *The American journal of cardiology.* 1995;763:148-152.
100. Primavesi R. A shocking episode: care of electrical injuries. *Can Fam Physician.* 2009;557:707-709.

101. Claesson A, Lindqvist J, Herlitz J. Cardiac arrest due to drowning--changes over time and factors of importance for survival. *Resuscitation.* 2014;855:644-648.
102. Yanagawa Y, Sakamoto T. Characteristics of patients that experience cardiopulmonary arrest following aortic dissection and aneurysm. *J Emerg Trauma Shock.* 2013;63:159-163.
103. Lee SY, Lee SC, Shin SD, Song KJ, Ro YS, Park JH, Kong SY. Epidemiology and outcomes of anaphylaxis-associated out-of-hospital cardiac arrest. *PloS one.* 2018;133:e0194921.
104. Durila M. Reversible causes of cardiac arrest 4 "Ts" and 4 "Hs" can be easily diagnosed and remembered following general ABC rule, Motol University Hospital approach. *Resuscitation.* 2018;126:e7.
105. Low LS, Kern KB. Importance of coronary artery disease in sudden cardiac death. *J Am Heart Assoc.* 2014;35:e001339.
106. Ott P, Marcus FI. Electrocardiographic markers of sudden death. *Cardiol Clin.* 2006;243:453-469, x.
107. Myerburg RJ. Scientific gaps in the prediction and prevention of sudden cardiac death. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2002;137:709-723.
108. Priori SG. Genetic testing to predict sudden cardiac death: current perspectives and future goals. *Indian Heart J.* 2014;66 Suppl 1:S58-60.
109. Mazzanti A, O'Rourke S, Ng K, Miceli C, Borio G, Curcio A, Esposito F, Napolitano C, Priori SG. The usual suspects in sudden cardiac death of the young: a focus on inherited arrhythmogenic diseases. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2014;124:499-519.
110. Greif R, Lockey AS, Conaghan P, Lippert A, De Vries W, Monsieurs KG, Education, implementation of resuscitation section C, Collaborators. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015: Section 10. Education and implementation of resuscitation. *Resuscitation.* 2015;95:288-301.
111. Matsuyama T, Kitamura T, Kiyohara K, Nishiyama C, Nishiuchi T, Hayashi Y, Kawamura T, Ohta B, Iwami T. Impact of cardiopulmonary resuscitation duration on neurologically favourable outcome after out-of-hospital cardiac arrest: A population-based study in Japan. *Resuscitation.* 2017;113:1-7.
112. Bossaert LL, Perkins GD, Askitopoulou H, Raffay VI, Greif R, Haywood KL, Mentzelopoulos SD, Nolan JP, Van de Voorde P, Xanthos TT, ethics of r, end-of-life decisions section C. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015: Section 11. The ethics of resuscitation and end-of-life decisions. *Resuscitation.* 2015;95:302-311.

113. Kjaergaard J, Nielsen N, Winther-Jensen M, et al. Impact of time to return of spontaneous circulation on neuroprotective effect of targeted temperature management at 33 or 36 degrees in comatose survivors of out-of hospital cardiac arrest. *Resuscitation.* 2015;96:310-316.

114. Perkins GD, Jacobs IG, Nadkarni VM, et al. Cardiac Arrest and Cardiopulmonary Resuscitation Outcome Reports: Update of the Utstein Resuscitation Registry Templates for Out-of-Hospital Cardiac Arrest: A Statement for Healthcare Professionals From a Task Force of the International Liaison Committee on Resuscitation (American Heart Association, European Resuscitation Council, Australian and New Zealand Council on Resuscitation, Heart and Stroke Foundation of Canada, InterAmerican Heart Foundation, Resuscitation Council of Southern Africa, Resuscitation Council of Asia); and the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee and the Council on Cardiopulmonary, Critical Care, Perioperative and Resuscitation. *Resuscitation.* 2015;96:328-340.

115. Nolan JP, Neumar RW, Adrie C, et al. Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. A Scientific Statement from the International Liaison Committee on Resuscitation; the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; the Council on Stroke. *Resuscitation.* 2008;793:350-379.

116. Nolan JP, Soar J, Cariou A, Cronberg T, Moulaert VR, Deakin CD, Bottiger BW, Friberg H, Sunde K, Sandroni C. European Resuscitation Council and European Society of Intensive Care Medicine Guidelines for Post-resuscitation Care 2015: Section 5 of the European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015. *Resuscitation.* 2015;95:202-222.

117. Dragancea I, Rundgren M, Englund E, Friberg H, Cronberg T. The influence of induced hypothermia and delayed prognostication on the mode of death after cardiac arrest. *Resuscitation.* 2013;843:337-342.

118. Callaway CW, Donnino MW, Fink EL, Geocadin RG, Golan E, Kern KB, Leary M, Meurer WJ, Peberdy MA, Thompson TM, Zimmerman JL. Part 8: Post-Cardiac Arrest Care: 2015 American Heart Association Guidelines Update for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation.* 2015;13218 Suppl 2:S465-482.

119. Bernard SA, Gray TW, Buist MD, Jones BM, Silvester W, Gutteridge G, Smith K. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med.* 2002;3468:557-563.

120. Nielsen N, Wetterslev J, Cronberg T, et al. Targeted temperature management at 33 degrees C versus 36 degrees C after cardiac arrest. *N Engl J Med.* 2013;36923:2197-2206.
121. Nolan JP, Soar J, Cariou A, Cronberg T, Moulaert VR, Deakin CD, Bottiger BW, Friberg H, Sunde K, Sandroni C, European Resuscitation C, European Society of Intensive Care M. European Resuscitation Council and European Society of Intensive Care Medicine 2015 guidelines for post-resuscitation care. *Intensive Care Med.* 2015;4112:2039-2056.
122. Stammet P, Collignon O, Hassager C, et al. Neuron-Specific Enolase as a Predictor of Death or Poor Neurological Outcome After Out-of-Hospital Cardiac Arrest and Targeted Temperature Management at 33 degrees C and 36 degrees C. *Journal of the American College of Cardiology.* 2015;6519:2104-2114.
123. Stammet P, Dankiewicz J, Nielsen N, et al. Protein S100 as outcome predictor after out-of-hospital cardiac arrest and targeted temperature management at 33 degrees C and 36 degrees C. *Crit Care.* 2017;211:153.
124. Frydland M, Kjaergaard J, Erlinge D, et al. Usefulness of Serum B-Type Natriuretic Peptide Levels in Comatose Patients Resuscitated from Out-of-Hospital Cardiac Arrest to Predict Outcome. *The American journal of cardiology.* 2016;1187:998-1005.
125. Gilje P, Koul S, Thomsen JH, et al. High-sensitivity troponin-T as a prognostic marker after out-of-hospital cardiac arrest - A targeted temperature management (TTM) trial substudy. *Resuscitation.* 2016;107:156-161.
126. Booth CM, Boone RH, Tomlinson G, Detsky AS. Is this patient dead, vegetative, or severely neurologically impaired? Assessing outcome for comatose survivors of cardiac arrest. *JAMA.* 2004;2917:870-879.
127. Devaux Y, Stammet P, Cardiolinc n. What's new in prognostication after cardiac arrest: microRNAs? *Intensive Care Med.* 2018;446:897-899.
128. Bougouin W, Lamhaut L, Marijon E, Jost D, Dumas F, Deye N, Beganton F, Empana JP, Chazelle E, Cariou A, Jouven X, Co-Investigators S. Characteristics and prognosis of sudden cardiac death in Greater Paris: population-based approach from the Paris Sudden Death Expertise Center (Paris-SDEC). *Intensive Care Med.* 2014;406:846-854.
129. Crick FH. On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol.* 1958;12:138-163.
130. Watson J. *Molecular Biology of the Gene, 1st Edition.* W. A. Benjamin; 1965.
131. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;462:3-5.
132. Keyel PA. Dnases in health and disease. *Dev Biol.* 2017;4291:1-11.

133. Sorrentino S. The eight human "canonical" ribonucleases: molecular diversity, catalytic properties, and special biological actions of the enzyme proteins. *FEBS Lett.* 2010;58411:2194-2200.
134. Viereck J, Thum T. Circulating Noncoding RNAs as Biomarkers of Cardiovascular Disease and Injury. *Circulation research.* 2017;1202:381-399.
135. Karijolich J, Yu YT. Spliceosomal snRNA modifications and their function. *RNA Biol.* 2010;72:192-204.
136. Dieci G, Preti M, Montanini B. Eukaryotic snoRNAs: a paradigm for gene expression flexibility. *Genomics.* 2009;942:83-88.
137. Jady BE, Kiss T. A small nucleolar guide RNA functions both in 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of the U5 spliceosomal RNA. *The EMBO journal.* 2001;203:541-551.
138. Saikia M, Hatzoglou M. The Many Virtues of tRNA-derived Stress-induced RNAs (tiRNAs): Discovering Novel Mechanisms of Stress Response and Effect on Human Health. *J Biol Chem.* 2015;29050:29761-29768.
139. Feil R, Fraga MF. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nature reviews Genetics.* 2012;132:97-109.
140. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* 2004;4296990:457-463.
141. Lucas T, Bonauer A, Dimmeler S. RNA Therapeutics in Cardiovascular Disease. *Circulation research.* 2018;1232:205-220.
142. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal.* 2004;2320:4051-4060.
143. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology.* 2006;1312:1097-1101.
144. Mulrane L, McGee SF, Gallagher WM, O'Connor DP. miRNA dysregulation in breast cancer. *Cancer Res.* 2013;7322:6554-6562.
145. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2014;158:509-524.
146. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development.* 2003;1724:3011-3016.
147. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C. elegans developmental timing. *Cell.* 2001;1061:23-34.

148. Leuschner PJ, Ameres SL, Kueng S, Martinez J. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO reports.* 2006;73:314-320.
149. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009;1362:215-233.
150. Ryan B, Joilin G, Williams JM. Plasticity-related microRNA and their potential contribution to the maintenance of long-term potentiation. *Front Mol Neurosci.* 2015;8:4.
151. Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2007;81:23-36.
152. Oliveto S, Mancino M, Manfrini N, Biffo S. Role of microRNAs in translation regulation and cancer. *World J Biol Chem.* 2017;81:45-56.
153. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nature reviews Genetics.* 2011;1212:861-874.
154. Davis-Dusenbery BN, Hata A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J Biochem.* 2010;1484:381-392.
155. Consortium EP, Birney E, Stamatoyannopoulos JA, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature.* 2007;4477146:799-816.
156. Marchese FP, Raimondi I, Huarte M. The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function. *Genome Biol.* 2017;181:206.
157. Devaux Y, Zangrando J, Schroen B, Creemers EE, Pedrazzini T, Chang CP, Dorn GW, 2nd, Thum T, Heymans S, Cardiolinc n. Long noncoding RNAs in cardiac development and ageing. *Nat Rev Cardiol.* 2015;127:415-425.
158. Marchese FP, Huarte M. Long non-coding RNAs and chromatin modifiers: their place in the epigenetic code. *Epigenetics.* 2014;91:21-26.
159. Orom UA, Derrien T, Beringer M, Gumireddy K, Gardini A, Bussotti G, Lai F, Zytnicki M, Notredame C, Huang Q, Guigo R, Shiekhattar R. Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. *Cell.* 2010;1431:46-58.
160. Kino T, Hurt DE, Ichijo T, Nader N, Chrousos GP. Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Sci Signal.* 2010;3107:ra8.
161. Clemson CM, Hutchinson JN, Sara SA, Ensminger AW, Fox AH, Chess A, Lawrence JB. An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Mol Cell.* 2009;336:717-726.

162. Anantharaman A, Jadaliha M, Tripathi V, Nakagawa S, Hirose T, Jantsch MF, Prasanth SG, Prasanth KV. Paraspeckles modulate the intranuclear distribution of paraspeckle-associated Ctn RNA. *Sci Rep.* 2016;6:34043.

163. Boque-Sastre R, Soler M, Oliveira-Mateos C, Portela A, Moutinho C, Sayols S, Villanueva A, Esteller M, Guil S. Head-to-head antisense transcription and R-loop formation promotes transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2015;11218:5785-5790.

164. Santos-Pereira JM, Aguilera A. R loops: new modulators of genome dynamics and function. *Nature reviews Genetics.* 2015;1610:583-597.

165. Romero-Barrios N, Legascue MF, Benhamed M, Ariel F, Crespi M. Splicing regulation by long noncoding RNAs. *Nucleic acids research.* 2018;465:2169-2184.

166. Carrieri C, Cimatti L, Biagioli M, et al. Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat. *Nature.* 2012;4917424:454-457.

167. Yoon JH, Abdelmohsen K, Srikantan S, Yang X, Martindale JL, De S, Huarte M, Zhan M, Becker KG, Gorospe M. LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation. *Mol Cell.* 2012;474:648-655.

168. Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ, Pandolfi PP. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature.* 2010;4657301:1033-1038.

169. Wang K, Long B, Zhou LY, Liu F, Zhou QY, Liu CY, Fan YY, Li PF. CARL lncRNA inhibits anoxia-induced mitochondrial fission and apoptosis in cardiomyocytes by impairing miR-539-dependent PHB2 downregulation. *Nat Commun.* 2014;5:3596.

170. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical chemistry.* 2010;5611:1733-1741.

171. Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008;1810:997-1006.

172. Arita T, Ichikawa D, Konishi H, Komatsu S, Shiozaki A, Shoda K, Kawaguchi T, Hirajima S, Nagata H, Kubota T, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Circulating long non-coding RNAs in plasma of patients with gastric cancer. *Anticancer Res.* 2013;338:3185-3193.

173. Li Q, Shao Y, Zhang X, Zheng T, Miao M, Qin L, Wang B, Ye G, Xiao B, Guo J. Plasma long noncoding RNA protected by exosomes as a potential stable biomarker for gastric cancer. *Tumour Biol.* 2015;363:2007-2012.

174. Chen J, Hu C, Pan P. Extracellular Vesicle MicroRNA Transfer in Lung Diseases. *Front Physiol.* 2017;8:1028.

175. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology.* 2007;96:654-659.

176. Maas SLN, Breakefield XO, Weaver AM. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol.* 2017;273:172-188.

177. Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic acids research.* 2010;3820:7248-7259.

178. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic acids research.* 2011;3916:7223-7233.

179. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology.* 2011;134:423-433.

180. Fritz JV, Heintz-Buschart A, Ghosal A, Wampach L, Etheridge A, Galas D, Wilmes P. Sources and Functions of Extracellular Small RNAs in Human Circulation. *Annu Rev Nutr.* 2016;36:301-336.

181. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem.* 2010;28523:17442-17452.

182. Xu G, Cui Y, Jia Z, Yue Y, Yang S. The Values of Coronary Circulating miRNAs in Patients with Atrial Fibrillation. *PloS one.* 2016;1111:e0166235.

183. Sun T, Dong YH, Du W, Shi CY, Wang K, Tariq MA, Wang JX, Li PF. The Role of MicroRNAs in Myocardial Infarction: From Molecular Mechanism to Clinical Application. *International journal of molecular sciences.* 2017;184.

184. Ishii N, Ozaki K, Sato H, Mizuno H, Saito S, Takahashi A, Miyamoto Y, Ikegawa S, Kamatani N, Hori M, Saito S, Nakamura Y, Tanaka T. Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction. *J Hum Genet.* 2006;5112:1087-1099.

185. Broadbent HM, Peden JF, Lorkowski S, et al. Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p. *Hum Mol Genet.* 2008;176:806-814.

186. Jones JA, Stroud RE, O'Quinn EC, Black LE, Barth JL, Elefteriades JA, Bavaria JE, Gorman JH, 3rd, Gorman RC, Spinale FG, Ikonomidis JS. Selective microRNA suppression in human thoracic aneurysms: relationship of miR-29a to aortic size and proteolytic induction. *Circulation Cardiovascular genetics.* 2011;46:605-613.

187. Patuzzo C, Pasquali A, Malerba G, Trabetti E, Pignatti P, Tessari M, Faggian G. A Preliminary microRNA Analysis of Non Syndromic Thoracic Aortic Aneurysms. *Balkan journal of medical genetics : BJMG.* 2012;15Suppl:51-55.

188. Venkatesh P, Phillippi J, Chukkapalli S, Rivera-Kweh M, Velsko I, Gleason T, VanRyzin P, Aalaei-Andabili SH, Ghanta RK, Beaver T, Chan EKL, Kesavalu L. Aneurysm-Specific miR-221 and miR-146a Participates in Human Thoracic and Abdominal Aortic Aneurysms. *International journal of molecular sciences.* 2017;184.

189. Elia L, Quintavalle M, Zhang J, Contu R, Cossu L, Latronico MV, Peterson KL, Indolfi C, Catalucci D, Chen J, Courtneidge SA, Condorelli G. The knockout of miR-143 and -145 alters smooth muscle cell maintenance and vascular homeostasis in mice: correlates with human disease. *Cell death and differentiation.* 2009;1612:1590-1598.

190. Boileau A, Lindsay ME, Michel JB, Devaux Y. Epigenetics in Ascending Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection. *Aorta (Stamford).* 2018;61:1-12.

191. Li Y, Liu Y, Liu S, Wu F, Li S, Yang F, Gu Y, Xu Z, Wang G. Differential expression profile of long non-coding RNAs in human thoracic aortic aneurysm. *Journal of cellular biochemistry.* 2018.

192. Goretti E, Wagner DR, Devaux Y. miRNAs as biomarkers of myocardial infarction: a step forward towards personalized medicine? *Trends Mol Med.* 2014;2012:716-725.

193. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS.* 2010;56:463-466.

194. Krankel N, Blankenberg S, Zeller T. Early detection of myocardial infarction-microRNAs right at the time? *Ann Transl Med.* 2016;424:502.

195. Cheng C, Wang Q, You W, Chen M, Xia J. MiRNAs as biomarkers of myocardial infarction: a meta-analysis. *PloS one.* 2014;92:e88566.

196. Arnadottir A, Falk Klein C, Iversen K. Head-to-head comparison of cardiac troponin T and troponin I in patients without acute coronary syndrome: a systematic review. *Biomarkers.* 2017;228:701-708.

197. Adamcova M, Simko F. Multiplex biomarker approach to cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol Sin.* 2018.

198. Kaudewitz D, Lee R, Willeit P, McGregor R, Markus HS, Kiechl S, Zampetaki A, Storey RF, Channon KM, Mayr M. Impact of intravenous heparin on quantification of circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Thrombosis and haemostasis.* 2013;1103.

199. Sidstedt M, Hedman J, Romsos EL, Waitara L, Wadso L, Steffen CR, Vallone PM, Radstrom P. Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR. *Anal Bioanal Chem.* 2018;41010:2569-2583.

200. Li J, Hou R, Niu X, Liu R, Wang Q, Wang C, Li X, Hao Z, Yin G, Zhang K. Comparison of microarray and RNA-Seq analysis of mRNA expression in dermal mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett.* 2016;381:33-41.

201. Wingrove JA, Daniels SE, Sehnert AJ, Tingley W, Elashoff MR, Rosenberg S, Buellesfeld L, Grube E, Newby LK, Ginsburg GS, Kraus WE. Correlation of peripheral-blood gene expression with the extent of coronary artery stenosis. *Circulation Cardiovascular genetics.* 2008;11:31-38.

202. Bye A, Rosjo H, Nauman J, Silva GJ, Follestad T, Omland T, Wisloff U. Circulating microRNAs predict future fatal myocardial infarction in healthy individuals - The HUNT study. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2016;97:162-168.

203. Zampetaki A, Willeit P, Tilling L, et al. Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology.* 2012;604:290-299.

204. Karakas M, Schulte C, Appelbaum S, Ojeda F, Lackner KJ, Munzel T, Schnabel RB, Blankenberg S, Zeller T. Circulating microRNAs strongly predict cardiovascular death in patients with coronary artery disease-results from the large AtheroGene study. *Eur Heart J.* 2017;387:516-523.

205. Qu X, Du Y, Shu Y, Gao M, Sun F, Luo S, Yang T, Zhan L, Yuan Y, Chu W, Pan Z, Wang Z, Yang B, Lu Y. MIAT Is a Pro-fibrotic Long Non-coding RNA Governing Cardiac Fibrosis in Post-infarct Myocardium. *Sci Rep.* 2017;7:42657.

206. Kim J, Ghasemzadeh N, Eapen DJ, Chung NC, Storey JD, Quyyumi AA, Gibson G. Gene expression profiles associated with acute myocardial infarction and risk of cardiovascular death. *Genome Med.* 2014;65:40.

207. Muse ED, Kramer ER, Wang H, et al. A Whole Blood Molecular Signature for Acute Myocardial Infarction. *Sci Rep.* 2017;71:12268.

208. Devaux Y, Vausort M, Goretti E, Nazarov PV, Azuaje F, Gilson G, Corsten MF, Schroen B, Lair ML, Heymans S, Wagner DR. Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction. *Clinical chemistry.* 2012;583:559-567.

209. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen JA, Heymans S, Schroen B. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499

reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circulation Cardiovascular genetics.* 2010;36:499-506.

210. Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM, Bang C, Bauersachs J, Bethmann K, Kempf T, Wollert KC, Thum T. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2011;515:872-875.
211. D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2010;3122:2765-2773.
212. Liu X, Fan Z, Zhao T, Cao W, Zhang L, Li H, Xie Q, Tian Y, Wang B. Plasma miR-1, miR-208, miR-499 as potential predictive biomarkers for acute myocardial infarction: An independent study of Han population. *Exp Gerontol.* 2015;72:230-238.
213. Zhong J, He Y, Chen W, Shui X, Chen C, Lei W. Circulating microRNA-19a as a potential novel biomarker for diagnosis of acute myocardial infarction. *International journal of molecular sciences.* 2014;1511:20355-20364.
214. Wang KJ, Zhao X, Liu YZ, et al. Circulating MiR-19b-3p, MiR-134-5p and MiR-186-5p are Promising Novel Biomarkers for Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology.* 2016;383:1015-1029.
215. Zhang Y, Liu YJ, Liu T, Zhang H, Yang SJ. Plasma microRNA-21 is a potential diagnostic biomarker of acute myocardial infarction. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;202:323-329.
216. Grabmaier U, Clauss S, Gross L, Klier I, Franz WM, Steinbeck G, Wakili R, Theiss HD, Brenner C. 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;244:30-36.
217. Eryilmaz U, Akgullu C, Beser N, Yildiz O, Kurt Omurlu I, Bozdogan B. Circulating microRNAs in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Anatol J Cardiol.* 2016;166:392-396.
218. Jia K, Shi P, Han X, Chen T, Tang H, Wang J. Diagnostic value of miR-30d-5p and miR-125b-5p in acute myocardial infarction. *Molecular medicine reports.* 2016;141:184-194.
219. Lv P, Zhou M, He J, Meng W, Ma X, Dong S, Meng X, Zhao X, Wang X, He F. Circulating miR-208b and miR-34a are associated with left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *International journal of molecular sciences.* 2014;154:5774-5788.
220. Cortez-Dias N, Costa MC, Carrilho-Ferreira P, Silva D, Jorge C, Calisto C, Pessoa T, Robalo Martins S, de Sousa JC, da Silva PC, Fiuza M, Diogo AN, Pinto FJ, Enguita FJ. Circulating miR-122-5p/miR-133b Ratio Is a Specific Early Prognostic Biomarker in Acute Myocardial

Infarction. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society.* 2016;8010:2183-2191.

221. Wang R, Li N, Zhang Y, Ran Y, Pu J. Circulating microRNAs are promising novel biomarkers of acute myocardial infarction. *Intern Med.* 2011;5017:1789-1795.

222. He F, Lv P, Zhao X, Wang X, Ma X, Meng W, Meng X, Dong S. Predictive value of circulating miR-328 and miR-134 for acute myocardial infarction. *Mol Cell Biochem.* 2014;3941-2:137-144.

223. Zhang R, Lan C, Pei H, Duan G, Huang L, Li L. Expression of circulating miR-486 and miR-150 in patients with acute myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord.* 2015;15:51.

224. Zhu J, Yao K, Wang Q, Guo J, Shi H, Ma L, Liu H, Gao W, Zou Y, Ge J. Circulating miR-181a as a Potential Novel Biomarker for Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology.* 2016;406:1591-1602.

225. Coskunpinar E, Cakmak HA, Kalkan AK, Tiryakioglu NO, Erturk M, Ongen Z. Circulating miR-221-3p as a novel marker for early prediction of acute myocardial infarction. *Gene.* 2016;5911:90-96.

226. Devaux Y, Mueller M, Haaf P, Goretti E, Twerenbold R, Zangrando J, Vausort M, Reichlin T, Wildi K, Moehring B, Wagner DR, Mueller C. Diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs in patients with acute chest pain. *J Intern Med.* 2015;2772:260-271.

227. Peng L, Chun-guang Q, Bei-fang L, Xue-zhi D, Zi-hao W, Yun-fu L, Yan-ping D, Yang-gui L, Wei-guo L, Tian-yong H, Zhen-wen H. Clinical impact of circulating miR-133, miR-1291 and miR-663b in plasma of patients with acute myocardial infarction. *Diagn Pathol.* 2014;9:89.

228. Zhang J, Gao C, Meng M, Tang H. Long Noncoding RNA MHRT Protects Cardiomyocytes against H2O2-Induced Apoptosis. *Biomol Ther (Seoul).* 2016;241:19-24.

229. Yan Y, Zhang B, Liu N, Qi C, Xiao Y, Tian X, Li T, Liu B. Circulating Long Noncoding RNA UCA1 as a Novel Biomarker of Acute Myocardial Infarction. *BioMed research international.* 2016;2016:8079372.

230. Zhang Y, Sun L, Xuan L, et al. Reciprocal Changes of Circulating Long Non-Coding RNAs ZFAS1 and CDR1AS Predict Acute Myocardial Infarction. *Sci Rep.* 2016;6:22384.

231. Azuaje FJ, Rodius S, Zhang L, Devaux Y, Wagner DR. Information encoded in a network of inflammation proteins predicts clinical outcome after myocardial infarction. *BMC Med Genomics.* 2011;4:59.

232. Devaux Y, Bousquenaud M, Rodius S, Marie PY, Maskali F, Zhang L, Azuaje F, Wagner DR. Transforming growth factor beta receptor 1 is a new candidate prognostic biomarker after acute myocardial infarction. *BMC Med Genomics.* 2011;4:83.

233. Devaux Y, Azuaje F, Vausort M, Yvorra C, Wagner DR. Integrated protein network and microarray analysis to identify potential biomarkers after myocardial infarction. *Funct Integr Genomics.* 2010;103:329-337.

234. Azuaje F, Devaux Y, Vausort M, Yvorra C, Wagner DR. Transcriptional networks characterize ventricular dysfunction after myocardial infarction: a proof-of-concept investigation. *J Biomed Inform.* 2010;435:812-819.

235. Azuaje F, Devaux Y, Wagner DR. Integrative pathway-centric modeling of ventricular dysfunction after myocardial infarction. *PloS one.* 2010;53:e9661.

236. Goretti E, Vausort M, Wagner DR, Devaux Y. Association between circulating microRNAs, cardiovascular risk factors and outcome in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2013;1684:4548-4550.

237. Gidlof O, Smith JG, Miyazu K, Gilje P, Spencer A, Blomquist S, Erlinge D. Circulating cardio-enriched microRNAs are associated with long-term prognosis following myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord.* 2013;13:12.

238. Alavi-Moghaddam M, Chehrazi M, Alipoor SD, Mohammadi M, Baratloo A, Mahjoub MP, Movasaghi M, Garssen J, Adcock IM, Mortaz E. A Preliminary Study of microRNA-208b after Acute Myocardial Infarction: Impact on 6-Month Survival. *Dis Markers.* 2018;2018:2410451.

239. Eitel I, Adams V, Dieterich P, Fuernau G, de Waha S, Desch S, Schuler G, Thiele H. Relation of circulating MicroRNA-133a concentrations with myocardial damage and clinical prognosis in ST-elevation myocardial infarction. *Am Heart J.* 2012;1645:706-714.

240. Zile MR, Mehurg SM, Arroyo JE, Stroud RE, DeSantis SM, Spinale FG. Relationship between the temporal profile of plasma microRNA and left ventricular remodeling in patients after myocardial infarction. *Circulation Cardiovascular genetics.* 2011;46:614-619.

241. Matsumoto S, Sakata Y, Nakatani D, Suna S, Mizuno H, Shimizu M, Usami M, Sasaki T, Sato H, Kawahara Y, Hamasaki T, Nanto S, Hori M, Komuro I. A subset of circulating microRNAs are predictive for cardiac death after discharge for acute myocardial infarction. *Biochemical and biophysical research communications.* 2012;4272:280-284.

242. Devaux Y, Vausort M, McCann GP, Zangrando J, Kelly D, Razvi N, Zhang L, Ng LL, Wagner DR, Squire IB. MicroRNA-150: a novel marker of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Circulation Cardiovascular genetics.* 2013;63:290-298.

243. Devaux Y, Vausort M, McCann GP, Kelly D, Collignon O, Ng LL, Wagner DR, Squire IB. A panel of 4 microRNAs facilitates the prediction of left ventricular contractility after acute myocardial infarction. *PloS one.* 2013;88:e70644.

244. Maciejak A, Kostarska-Srokosz E, Gierlak W, et al. Circulating miR-30a-5p as a prognostic biomarker of left ventricular dysfunction after acute myocardial infarction. *Sci Rep.* 2018;81:9883.

245. Liu X, Dong Y, Chen S, Zhang G, Zhang M, Gong Y, Li X. Circulating MicroRNA-146a and MicroRNA-21 Predict Left Ventricular Remodeling after ST-Elevation Myocardial Infarction. *Cardiology.* 2015;1324:233-241.

246. Matsumoto S, Sakata Y, Suna S, Nakatani D, Usami M, Hara M, Kitamura T, Hamasaki T, Nanto S, Kawahara Y, Komuro I. Circulating p53-responsive microRNAs are predictive indicators of heart failure after acute myocardial infarction. *Circulation research.* 2013;1133:322-326.

247. Ounzain S, Pezzuto I, Micheletti R, et al. Functional importance of cardiac enhancer-associated noncoding RNAs in heart development and disease. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2014;76:55-70.

248. Vausort M, Salgado-Somoza A, Zhang L, Leszek P, Scholz M, Teren A, Burkhardt R, Thiery J, Wagner DR, Devaux Y. Myocardial Infarction-Associated Circular RNA Predicting Left Ventricular Dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology.* 2016;6811:1247-1248.

249. Zhao Y, Feng G, Wang Y, Yue Y, Zhao W. Regulation of apoptosis by long non-coding RNA HIF1A-AS1 in VSMCs: implications for TAA pathogenesis. *International journal of clinical and experimental pathology.* 2014;711:7643-7652.

250. Wang XJ, Huang B, Yang YM, Zhang L, Su WJ, Tian L, Lu TY, Zhang S, Fan XH, Hui RT. Differential expression of microRNAs in aortic tissue and plasma in patients with acute aortic dissection. *J Geriatr Cardiol.* 2015;126:655-661.

251. Xu Z, Wang Q, Pan J, Sheng X, Hou D, Chong H, Wei Z, Zheng S, Xue Y, Zhou Q, Cao H, Zhang CY, Wang D, Jiang X. Characterization of serum miRNAs as molecular biomarkers for acute Stanford type A aortic dissection diagnosis. *Sci Rep.* 2017;71:13659.

252. Martinez-Micaelo N, Beltran-Debon R, Baiges I, Faiges M, Alegret JM. Specific circulating microRNA signature of bicuspid aortic valve disease. *J Transl Med.* 2017;151:76.

253. Dong J, Bao J, Feng R, Zhao Z, Lu Q, Wang G, Li H, Su D, Zhou J, Jing Q, Jing Z. Circulating microRNAs: a novel potential biomarker for diagnosing acute aortic dissection. *Sci Rep.* 2017;71:12784.

254. Wang L, Zhang S, Xu Z, Zhang J, Li L, Zhao G. The diagnostic value of microRNA-4787-5p and microRNA-4306 in patients with acute aortic dissection. *Am J Transl Res.* 2017;911:5138-5149.

255. Sun L, Sun S, Zeng S, Li Y, Pan W, Zhang Z. Expression of circulating microRNA-1 and microRNA-133 in pediatric patients with tachycardia. *Molecular medicine reports.* 2015;116:4039-4046.

256. Lu Y, Hou S, Huang D, Luo X, Zhang J, Chen J, Xu W. Expression profile analysis of circulating microRNAs and their effects on ion channels in Chinese atrial fibrillation patients. *Int J Clin Exp Med.* 2015;81:845-853.

257. McManus DD, Tanriverdi K, Lin H, Esa N, Kinno M, Mandapati D, Tam S, Okike ON, Ellinor PT, Keaney JF, Jr., Donahue JK, Benjamin EJ, Freedman JE. Plasma microRNAs are associated with atrial fibrillation and change after catheter ablation (the miRhythm study). *Heart Rhythm.* 2015;121:3-10.

258. van den Berg NWE, Kawasaki M, Berger WR, Neefs J, Meulendijks E, Tijsen AJ, de Groot JR. MicroRNAs in Atrial Fibrillation: from Expression Signatures to Functional Implications. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2017;313:345-365.

259. Yamada S, Hsiao YW, Chang SL, et al. Circulating microRNAs in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with ventricular arrhythmia. *Europace.* 2018;20FI1:f37-f45.

260. Stammet P, Goretti E, Vausort M, Zhang L, Wagner DR, Devaux Y. Circulating microRNAs after cardiac arrest. *Crit Care Med.* 2012;4012:3209-3214.

261. Gilje P, Frydland M, Bro-Jeppesen J, Dankiewicz J, Friberg H, Rundgren M, Devaux Y, Stammet P, Al-Mashat M, Jogi J, Kjaergaard J, Hassager C, Erlinge D. The association between plasma miR-122-5p release pattern at admission and all-cause mortality or shock after out-of-hospital cardiac arrest. *Biomarkers.* 2018:1-25.

262. Devaux Y, Dankiewicz J, Salgado-Somoza A, et al. Association of Circulating MicroRNA-124-3p Levels With Outcomes After Out-of-Hospital Cardiac Arrest: A Substudy of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol.* 2016;13:305-313.

263. Wander PL, Enquobahrie DA, Pritchard CC, McKnight B, Rice K, Christiansen M, Lemaitre RN, Rea T, Siscovick D, Sotoodehnia N. Circulating microRNAs and sudden cardiac arrest outcomes. *Resuscitation.* 2016;106:96-101.

264. Nichani AK, Brown CG, Spooner RL. Revaccination with the same Theileria annulata infected cell line may not be feasible for boosting immunity against tropical theileriosis. *Trop Anim Health Prod.* 1997;294 Suppl:114S-118S.

265. World Medical A. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* 2013;31020:2191-2194.
266. Nielsen N, Wetterslev J, al-Subaie N, et al. Target Temperature Management after out-of-hospital cardiac arrest--a randomized, parallel-group, assessor-blinded clinical trial--rationale and design. *Am Heart J.* 2012;1634:541-548.
267. Nielsen N, Winkel P, Cronberg T, et al. Detailed statistical analysis plan for the target temperature management after out-of-hospital cardiac arrest trial. *Trials.* 2013;14:300.
268. Judge DP, Biery NJ, Keene DR, Geubtner J, Myers L, Huso DL, Sakai LY, Dietz HC. Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *J Clin Invest.* 2004;1142:172-181.
269. Li K, Wong DK, Hong KY, Raffai RL. Cushioned-Density Gradient Ultracentrifugation (C-DGUC): A Refined and High Performance Method for the Isolation, Characterization, and Use of Exosomes. *Methods Mol Biol.* 2018;1740:69-83.
270. de Hoon MJ, Imoto S, Nolan J, Miyano S. Open source clustering software. *Bioinformatics.* 2004;209:1453-1454.
271. Saldanha AJ. Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics.* 2004;2017:3246-3248.
272. Garcia DM, Baek D, Shin C, Bell GW, Grimson A, Bartel DP. Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of lsy-6 and other microRNAs. *Nature structural & molecular biology.* 2011;1810:1139-1146.
273. Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic acids research.* 2015;43Database issue:D146-152.
274. Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Kostoulas N, Vlachos IS, Vergoulis T, Reczko M, Filippidis C, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG. DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic acids research.* 2013;41Web Server issue:W169-173.
275. Orchard S, Ammari M, Aranda B, et al. The MIntAct project--IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction databases. *Nucleic acids research.* 2014;42Database issue:D358-363.
276. Goncalves JP, Graos M, Valente AX. POLAR MAPPER: a computational tool for integrated visualization of protein interaction networks and mRNA expression data. *J R Soc Interface.* 2009;639:881-896.
277. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;41:44-57.

278. Pencina MJ, D'Agostino RB, Sr., Demler OV. Novel metrics for evaluating improvement in discrimination: net reclassification and integrated discrimination improvement for normal variables and nested models. *Stat Med.* 2012;312:101-113.
279. Boeckel JN, Thome CE, Leistner D, Zeiher AM, Fichtlscherer S, Dimmeler S. Heparin selectively affects the quantification of microRNAs in human blood samples. *Clinical chemistry.* 2013;597:1125-1127.
280. Mayr M, Lee R, Kaudewitz D, Zampetaki A, Channon KM. Effects of heparin on temporal microRNA profiles. *Journal of the American College of Cardiology.* 2014;639:940-941.
281. Engelberg H. Plasma heparin levels in normal man. *Circulation.* 1961;23:578-581.
282. Hill M. Secretion of heparin by mast cells. *Nature.* 1957;1804587:654-655.
283. Shankar VK, Handa A, Hands L. Endogenous heparin activity is decreased in peripheral arterial occlusive disease. *Journal of vascular surgery.* 2008;475:1033-1038.
284. Azuaje FJ, Dewey FE, Brutsaert DL, Devaux Y, Ashley EA, Wagner DR. Systems-based approaches to cardiovascular biomarker discovery. *Circulation Cardiovascular genetics.* 2012;53:360-367.
285. Pape LA, Tsai TT, Isselbacher EM, et al. Aortic diameter >or = 5.5 cm is not a good predictor of type A aortic dissection: observations from the International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD). *Circulation.* 2007;11610:1120-1127.
286. Bougouin W, Mustafic H, Marijon E, Murad MH, Dumas F, Barbouttis A, Jabre P, Beganton F, Empana JP, Celermajer DS, Cariou A, Jouven X. Gender and survival after sudden cardiac arrest: A systematic review and meta-analysis. *Resuscitation.* 2015;94:55-60.
287. Zhou J, Shao G, Chen X, Yang X, Huang X, Peng P, Ba Y, Zhang L, Jehangir T, Bu S, Liu N, Lian J. miRNA 206 and miRNA 574-5p are highly expression in coronary artery disease. *Biosci Rep.* 2015;361:e00295.
288. Zaman S, Kovoor P. Sudden cardiac death early after myocardial infarction: pathogenesis, risk stratification, and primary prevention. *Circulation.* 2014;12923:2426-2435.
289. Devaux Y, Stammet P, Friberg H, Hassager C, Kuiper MA, Wise MP, Nielsen N, Biomarker subcommittee of TTMt. MicroRNAs: new biomarkers and therapeutic targets after cardiac arrest? *Crit Care.* 2015;19:54.
290. Bai X, Fischer S, Keshavjee S, Liu M. Heparin interference with reverse transcriptase polymerase chain reaction of RNA extracted from lungs after ischemia-reperfusion. *Transpl Int.* 2000;132:146-150.
291. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 2005;64:279-284.

292. Musunuru K, Ingelsson E, Fornage M, et al. The Expressed Genome in Cardiovascular Diseases and Stroke: Refinement, Diagnosis, and Prediction: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation Cardiovascular genetics.* 2017;104.

293. Cheng Y, Dong L, Zhang J, Zhao Y, Li Z. Recent advances in microRNA detection. *Analyst.* 2018;1438:1758-1774.

294. Zhang L, Wang J, Coetzer M, Angione S, Kantor R, Tripathi A. One-Step Ligation on RNA Amplification for the Detection of Point Mutations. *J Mol Diagn.* 2015;176:679-688.

295. Jonstrup SP, Koch J, Kjems J. A microRNA detection system based on padlock probes and rolling circle amplification. *RNA.* 2006;129:1747-1752.

296. Shamsi MH, Choi K, Ng AH, Chamberlain MD, Wheeler AR. Electrochemiluminescence on digital microfluidics for microRNA analysis. *Biosens Bioelectron.* 2016;77:845-852.

297. Cao JT, Liu FR, Hou F, Peng J, Ren SW, Liu YM. Cathodic electrochemiluminescence behaviour of MoS2 quantum dots and its biosensing of microRNA-21. *Analyst.* 2018;14315:3702-3707.

298. Kim S, Park J, Na J, Jung GY, Hwang J. Simultaneous Determination of Multiple microRNA Levels Utilizing Biotinylated Dideoxynucleotides and Mass Spectrometry. *PloS one.* 2016;117:e0153201.

299. Liu L, Xu Q, Hao S, Chen Y. A Quasi-direct LC-MS/MS-based Targeted Proteomics Approach for miRNA Quantification via a Covalently Immobilized DNA-peptide Probe. *Sci Rep.* 2017;71:5669.

300. Bujak M, Ren G, Kweon HJ, Dobaczewski M, Reddy A, Taffet G, Wang XF, Frangogiannis NG. Essential role of Smad3 in infarct healing and in the pathogenesis of cardiac remodeling. *Circulation.* 2007;11619:2127-2138.

301. Burch GH, Gong Y, Liu W, Dettman RW, Curry CJ, Smith L, Miller WL, Bristow J. Tenascin-X deficiency is associated with Ehlers-Danlos syndrome. *Nat Genet.* 1997;171:104-108.

302. Petersen JW, Douglas JY. Tenascin-X, collagen, and Ehlers-Danlos syndrome: tenascin-X gene defects can protect against adverse cardiovascular events. *Med Hypotheses.* 2013;813:443-447.

303. Jing L, Zhou LJ, Zhang FM, Li WM, Sang Y. 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;1243:390-395.

304. Lamar KM, Miller T, Dellefave-Castillo L, McNally EM. Genotype-Specific Interaction of Latent TGFbeta Binding Protein 4 with TGFbeta. *PloS one.* 2016;112:e0150358.
305. Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P, Heldin CH. A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *The EMBO journal.* 1991;105:1091-1101.
306. Elefteriades JA, Ziganshin BA. Paradigm for Detecting Silent Thoracic Aneurysm Disease. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2016;284:776-782.
307. Davies RR, Goldstein LJ, Coady MA, Tittle SL, Rizzo JA, Kopf GS, Elefteriades JA. Yearly rupture or dissection rates for thoracic aortic aneurysms: simple prediction based on size. *Ann Thorac Surg.* 2002;731:17-27; discussion 27-18.
308. Elefteriades JA, Ziganshin BA. Gratitude to the International Registry of Acute Aortic Dissection From the Aortic Community. *Journal of the American College of Cardiology.* 2015;664:359-362.
309. Tolenaar JL, Froehlich W, Jonker FH, et al. Predicting in-hospital mortality in acute type B aortic dissection: evidence from International Registry of Acute Aortic Dissection. *Circulation.* 2014;13011 Suppl 1:S45-50.
310. Rzucidlo EM, Martin KA, Powell RJ. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *Journal of vascular surgery.* 2007;45 Suppl A:A25-32.
311. Mao N, Gu T, Shi E, Zhang G, Yu L, Wang C. Phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in animal model of rat thoracic aortic aneurysm. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2015;211:62-70.
312. Lai Z, Lin P, Weng X, Su J, Chen Y, He Y, Wu G, Wang J, Yu Y, Zhang L. MicroRNA-574-5p promotes cell growth of vascular smooth muscle cells in the progression of coronary artery disease. *Biomed Pharmacother.* 2018;97:162-167.
313. Kapustin AN, Chatrou ML, Drozdov I, et al. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circulation research.* 2015;1168:1312-1323.
314. Dietz HC. TGF-beta in the pathogenesis and prevention of disease: a matter of aneurysmic proportions. *J Clin Invest.* 2010;1202:403-407.
315. Daugherty A, Chen Z, Sawada H, Rateri DL, Sheppard MB. Transforming Growth Factor-beta in Thoracic Aortic Aneurysms: Good, Bad, or Irrelevant? *J Am Heart Assoc.* 2017;61.
316. Wang Y, Huang HY, Bian GL, Yu YS, Ye WX, Hua F, Chen YH, Shen ZY. A Functional Variant of SMAD4 Enhances Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection Risk through Promoting Smooth Muscle Cell Apoptosis and Proteoglycan Degradation. *EBioMedicine.* 2017;21:197-205.

317. Zhang P, Hou S, Chen J, Zhang J, Lin F, Ju R, Cheng X, Ma X, Song Y, Zhang Y, Zhu M, Du J, Lan Y, Yang X. Smad4 Deficiency in Smooth Muscle Cells Initiates the Formation of Aortic Aneurysm. *Circulation research.* 2016;1183:388-399.

318. Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol.* 2012;223:125-132.

319. Nguyen MA, Karunakaran D, Geoffrion M, Cheng HS, Tandoc K, Perisic Matic L, Hedin U, Maegdefessel L, Fish JE, Rayner KJ. Extracellular Vesicles Secreted by Atherogenic Macrophages Transfer MicroRNA to Inhibit Cell Migration. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2018;381:49-63.

320. Jansen F, Yang X, Hoelscher M, Cattelan A, Schmitz T, Proebsting S, Wenzel D, Vosen S, Franklin BS, Fleischmann BK, Nickenig G, Werner N. Endothelial microparticle-mediated transfer of MicroRNA-126 promotes vascular endothelial cell repair via SPRED1 and is abrogated in glucose-damaged endothelial microparticles. *Circulation.* 2013;12818:2026-2038.

321. Hergenreider E, Heydt S, Treguer K, Boettger T, Horrevoets AJ, Zeiher AM, Scheffer MP, Frangakis AS, Yin X, Mayr M, Braun T, Urbich C, Boon RA, Dimmeler S. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nature cell biology.* 2012;143:249-256.

322. Lin X, He Y, Hou X, Zhang Z, Wang R, Wu Q. Endothelial Cells Can Regulate Smooth Muscle Cells in Contractile Phenotype through the miR-206/ARF6&NCX1/Exosome Axis. *PloS one.* 2016;113:e0152959.

323. Sanai T, Kimura G. Renal function reserve and sodium sensitivity in essential hypertension. *J Lab Clin Med.* 1996;1281:89-97.

324. Karthikesalingam A, Bahia SS, Patterson BO, Peach G, Vidal-Diez A, Ray KK, Sharma R, Hinchliffe RJ, Holt PJ, Thompson MM. The shortfall in long-term survival of patients with repaired thoracic or abdominal aortic aneurysms: retrospective case-control analysis of hospital episode statistics. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery.* 2013;465:533-541.

325. Allen BD, Barker AJ, Kansal P, Collins JD, Carr JC, Malaisrie SC, Markl M. Impact of aneurysm repair on thoracic aorta hemodynamics. *Circulation.* 2013;12817:e341-343.

326. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* 1996;227:707-710.

327. Matheis K, Laurie D, Andriamandroso C, et al. A generic operational strategy to qualify translational safety biomarkers. *Drug Discov Today.* 2011;1613-14:600-608.

328. Rivoli L, Vliegenthart AD, de Potter CM, van Bragt JJ, Tzoumas N, Gallacher P, Farrah TE, Dhaun N, Dear JW. The effect of renal dysfunction and haemodialysis on circulating liver specific miR-122. *Br J Clin Pharmacol.* 2017;833:584-592.

329. Yanta J, Guyette FX, Doshi AA, Callaway CW, Rittenberger JC, Post Cardiac Arrest S. Renal dysfunction is common following resuscitation from out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation.* 2013;8410:1371-1374.

330. Pilotte J, Dupont-Versteegden EE, Vanderklish PW. Widespread regulation of miRNA biogenesis at the Dicer step by the cold-inducible RNA-binding protein, RBM3. *PloS one.* 2011;612:e28446.

331. Dresios J, Aschrafi A, Owens GC, Vanderklish PW, Edelman GM, Mauro VP. Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005;1026:1865-1870.

332. Andersson P, Gidlof O, Braun OO, Gotberg M, van der Pals J, Olde B, Erlinge D. Plasma levels of liver-specific miR-122 is massively increased in a porcine cardiogenic shock model and attenuated by hypothermia. *Shock.* 2012;372:234-238.

333. Bakker J, Coffernils M, Leon M, Gris P, Vincent JL. Blood lactate levels are superior to oxygen-derived variables in predicting outcome in human septic shock. *Chest.* 1991;994:956-962.

334. Wang H, Meng K, Chen W, Feng D, Jia Y, Xie L. Serum miR-574-5p: a prognostic predictor of sepsis patients. *Shock.* 2012;373:263-267.

335. Xie Y, Li W, Feng J, Wu T, Li J. MicroRNA-363 and GATA-1 are regulated by HIF-1alpha in K562 cells under hypoxia. *Molecular medicine reports.* 2016;143:2503-2510.

336. Eskla KL, Porosk R, Reimets R, Visnapuu T, Vasar E, Hundahl CA, Luuk H. Hypothermia augments stress response in mammalian cells. *Free Radic Biol Med.* 2018;121:157-168.

337. Sogut O, Guloglu C, Orak M, Sayhan MB, Gokdemir MT, Ustundag M, Akkus Z. Trauma scores and neuron-specific enolase, cytokine and C-reactive protein levels as predictors of mortality in patients with blunt head trauma. *J Int Med Res.* 2010;385:1708-1720.

338. Chaves ML, Camozzato AL, Ferreira ED, Piazenski I, Kochhann R, Dall'Igna O, Mazzini GS, Souza DO, Portela LV. Serum levels of S100B and NSE proteins in Alzheimer's disease patients. *J Neuroinflammation.* 2010;7:6.

339. Thelin EP, Nelson DW, Bellander BM. A review of the clinical utility of serum S100B protein levels in the assessment of traumatic brain injury. *Acta Neurochir (Wien).* 2017;1592:209-225.

340. Zhang W, Thevapriya S, Kim PJ, Yu WP, Je HS, Tan EK, Zeng L. Amyloid precursor protein regulates neurogenesis by antagonizing miR-574-5p in the developing cerebral cortex. *Nat Commun.* 2014;5:3330.

341. Ku T, Li B, Gao R, Zhang Y, Yan W, Ji X, Li G, Sang N. NF-kappaB-regulated microRNA-574-5p underlies synaptic and cognitive impairment in response to atmospheric PM2.5 aspiration. *Part Fibre Toxicol.* 2017;141:34.

342. Gourash L, Puig-Antich J. Medical and biologic aspects of adolescent depression. *Semin Adolesc Med.* 1986;24:299-310.

343. Gan CS, Wang CW, Tan KS. Circulatory microRNA-145 expression is increased in cerebral ischemia. *Genet Mol Res.* 2012;111:147-152.

344. Jeyaseelan K, Lim KY, Armugam A. MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion. *Stroke.* 2008;393:959-966.

345. Foss KM, Sima C, Ugolini D, Neri M, Allen KE, Weiss GJ. miR-1254 and miR-574-5p: serum-based microRNA biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2011;63:482-488.

346. van den Berg ME, Stricker BH, Brusselle GG, Lahousse L. Chronic obstructive pulmonary disease and sudden cardiac death: A systematic review. *Trends in cardiovascular medicine.* 2016;267:606-613.

347. Bosson N, Kaji AH, Fang A, Thomas JL, French WJ, Shavelle D, Niemann JT. Sex Differences in Survival From Out-of-Hospital Cardiac Arrest in the Era of Regionalized Systems and Advanced Post-Resuscitation Care. *J Am Heart Assoc.* 2016;59.

348. Herlitz J, Engdahl J, Svensson L, Young M, Angquist KA, Holmberg S. Is female sex associated with increased survival after out-of-hospital cardiac arrest? *Resuscitation.* 2004;602:197-203.

349. Waldo SW, Armstrong EJ, Kulkarni A, Hoffmayer K, Kinlay S, Hsue P, Ganz P, McCabe JM. Comparison of clinical characteristics and outcomes of cardiac arrest survivors having versus not having coronary angiography. *The American journal of cardiology.* 2013;1119:1253-1258.

350. Winther-Jensen M, Hassager C, Kjaergaard J, Bro-Jeppesen J, Thomsen JH, Lippert FK, Kober L, Wanscher M, Soholm H. Women have a worse prognosis and undergo fewer

coronary angiographies after out-of-hospital cardiac arrest than men. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care.* 2018;75:414-422.

351. Winther-Jensen M, Kjaergaard J, Wanscher M, et al. No difference in mortality between men and women after out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation.* 2015;96:78-84.
352. Wu L, Zhou H, Lin H, Qi J, Zhu C, Gao Z, Wang H. Circulating microRNAs are elevated in plasma from severe preeclamptic pregnancies. *Reproduction.* 2012;1433:389-397.
353. Maierthaler M, Benner A, Hoffmeister M, Surowy H, Jansen L, Knebel P, Chang-Claude J, Brenner H, Burwinkel B. Plasma miR-122 and miR-200 family are prognostic markers in colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2017;1401:176-187.
354. Heinemann FG, Tolkach Y, Deng M, Schmidt D, Perner S, Kristiansen G, Muller SC, Ellinger J. Serum miR-122-5p and miR-206 expression: non-invasive prognostic biomarkers for renal cell carcinoma. *Clin Epigenetics.* 2018;10:11.
355. Rahmel T, Schafer ST, Frey UH, Adamzik M, Peters J. Increased circulating microRNA-122 is a biomarker for discrimination and risk stratification in patients defined by sepsis-3 criteria. *PloS one.* 2018;135:e0197637.
356. Qu K, Zhang X, Lin T, Liu T, Wang Z, Liu S, Zhou L, Wei J, Chang H, Li K, Wang Z, Liu C, Wu Z. Circulating miRNA-21-5p as a diagnostic biomarker for pancreatic cancer: evidence from comprehensive miRNA expression profiling analysis and clinical validation. *Sci Rep.* 2017;71:1692.
357. Zhao W, Zhao JJ, Zhang L, Xu QF, Zhao YM, Shi XY, Xu AG. Serum miR-21 level: a potential diagnostic and prognostic biomarker for non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Med.* 2015;89:14759-14763.
358. Motawi TM, Sadik NA, Shaker OG, El Masry MR, Mohareb F. Study of microRNAs-21/221 as potential breast cancer biomarkers in Egyptian women. *Gene.* 2016;5902:210-219.
359. Wang Y, Li J, Chen H, Mo Y, Ye H, Luo Y, Guo K, Mai Z, Zhang Y, Chen B, Zhou Y, Yang Z. Down-regulation of miR-133a as a poor prognosticator in non-small cell lung cancer. *Gene.* 2016;5912:333-337.
360. Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biol.* 2011;85:706-713.
361. Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet.* 2006;382:228-233.
362. Liu Y, Liang Y, Zhang JF, Fu WM. MicroRNA-133 mediates cardiac diseases: Mechanisms and clinical implications. *Experimental cell research.* 2017;3542:65-70.

363. Zhang Z, Li X, Xiao Q, Wang Z. MiR-574-5p mediates the cell cycle and apoptosis in thyroid cancer cells via Wnt/beta-catenin signaling by repressing the expression of Quaking proteins. *Oncol Lett.* 2018;154:5841-5848.

364. Ji S, Ye G, Zhang J, Wang L, Wang T, Wang Z, Zhang T, Wang G, Guo Z, Luo Y, Cai J, Yang JY. miR-574-5p negatively regulates Qki6/7 to impact beta-catenin/Wnt signalling and the development of colorectal cancer. *Gut.* 2013;625:716-726.

365. Cui Z, Tang J, Chen J, Wang Z. Hsa-miR-574-5p negatively regulates MACC-1 expression to suppress colorectal cancer liver metastasis. *Cancer cell international.* 2014;14:47.

366. Esau C, Davis S, Murray SF, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* 2006;32:87-98.

367. Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell.* 2006;1256:1111-1124.

368. Calvopina DA, Coleman MA, Lewindon PJ, Ramm GA. Function and Regulation of MicroRNAs and Their Potential as Biomarkers in Paediatric Liver Disease. *International journal of molecular sciences.* 2016;1711.

369. Bai S, Nasser MW, Wang B, Hsu SH, Datta J, Kutay H, Yadav A, Nuovo G, Kumar P, Ghoshal K. MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. *J Biol Chem.* 2009;28446:32015-32027.

370. Wang B, Wang H, Yang Z. MiR-122 inhibits cell proliferation and tumorigenesis of breast cancer by targeting IGF1R. *PloS one.* 2012;710:e47053.

371. Pei ZJ, Zhang ZG, Hu AX, Yang F, Gai Y. miR-122-5p inhibits tumor cell proliferation and induces apoptosis by targeting MYC in gastric cancer cells. *Pharmazie.* 2017;726:344-347.

372. Huan T, Chen G, Liu C, Bhattacharya A, Rong J, Chen BH, Seshadri S, Tanriverdi K, Freedman JE, Larson MG, Murabito JM, Levy D. Age-associated microRNA expression in human peripheral blood is associated with all-cause mortality and age-related traits. *Aging Cell.* 2018;171.

373. Ameling S, Kacprowski T, Chilukoti RK, Malsch C, Liebscher V, Suhre K, Pietzner M, Friedrich N, Homuth G, Hammer E, Volker U. Associations of circulating plasma microRNAs with age, body mass index and sex in a population-based study. *BMC Med Genomics.* 2015;8:61.

374. Heegaard NH, Carlsen AL, Lilje B, Ng KL, Ronne ME, Jorgensen HL, Sennels H, Fahrenkrug J. Diurnal Variations of Human Circulating Cell-Free Micro-RNA. *PloS one.* 2016;118:e0160577.

375. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, Weber M, Hamm CW, Roxe T, Muller-Ardogan M, Bonauer A, Zeiher AM, Dimmeler S. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circulation research.* 2010;1075:677-684.

376. Li S, Cao C, Chen H, Song J, Lee C, Zhang J, Zhang F, Geng Q, Li Z, Li J. Atheroprotective effects of statins in patients with unstable angina by regulating the blood-borne microRNA network. *Molecular medicine reports.* 2017;161:817-827.

377. Li J, Chen H, Ren J, Song J, Zhang F, Zhang J, Lee C, Li S, Geng Q, Cao C, Xu N. Effects of statin on circulating microRNAome and predicted function regulatory network in patients with unstable angina. *BMC Med Genomics.* 2015;8:12.

378. Zambrano T, Hirata RDC, Hirata MH, Cerda A, Salazar LA. Statins differentially modulate microRNAs expression in peripheral cells of hyperlipidemic subjects: A pilot study. *Eur J Pharm Sci.* 2018;117:55-61.

379. Carino A, De Rosa S, Sorrentino S, Polimeni A, Sabatino J, Caiazzo G, Torella D, Spaccarotella C, Mongiardo A, Strangio A, Filippis C, Indolfi C. Modulation of Circulating MicroRNAs Levels during the Switch from Clopidogrel to Ticagrelor. *BioMed research international.* 2016;2016:3968206.

380. de Boer HC, van Solingen C, Prins J, Duijs JM, Huisman MV, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ. Aspirin treatment hampers the use of plasma microRNA-126 as a biomarker for the progression of vascular disease. *Eur Heart J.* 2013;3444:3451-3457.

381. Binderup HG, Houlind K, Madsen JS, Brasen CL. Aspirin resistance may be identified by miR-92a in plasma combined with platelet distribution width. *Clin Biochem.* 2016;4915:1167-1172.

382. Gonzalez H, Hwang SJ, Davis ME. New class of polymers for the delivery of macromolecular therapeutics. *Bioconjug Chem.* 1999;106:1068-1074.

383. Ragelle H, Vandermeulen G, Preat V. Chitosan-based siRNA delivery systems. *J Control Release.* 2013;1721:207-218.

384. Blum JS, Saltzman WM. High loading efficiency and tunable release of plasmid DNA encapsulated in submicron particles fabricated from PLGA conjugated with poly-L-lysine. *J Control Release.* 2008;1291:66-72.

385. Akhtar S, Benter IF. Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *J Clin Invest.* 2007;11712:3623-3632.

386. Kim SH, Jeong JH, Lee SH, Kim SW, Park TG. PEG conjugated VEGF siRNA for anti-angiogenic gene therapy. *J Control Release.* 2006;1162:123-129.

387. Trang P, Wiggins JF, Daige CL, Cho C, Omotola M, Brown D, Weidhaas JB, Bader AG, Slack FJ. Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice. *Mol Ther.* 2011;196:1116-1122.

388. Landen CN, Jr., Chavez-Reyes A, Bucana C, Schmandt R, Deavers MT, Lopez-Berestein G, Sood AK. Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer Res.* 2005;6515:6910-6918.

389. van Rooij E, Kauppinen S. Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol Med.* 2014;67:851-864.

390. Zsebo K, Yaroshinsky A, Rudy JJ, Wagner K, Greenberg B, Jessup M, Hajjar RJ. Long-term effects of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with severe heart failure: analysis of recurrent cardiovascular events and mortality. *Circulation research.* 2014;1141:101-108.

391. van der Ree MH, van der Meer AJ, van Nuenen AC, de Bruijne J, Ottosen S, Janssen HL, Kootstra NA, Reesink HW. Miravirsen dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016;431:102-113.

392. van der Ree MH, de Vree JM, Stelma F, et al. Safety, tolerability, and antiviral effect of RG-101 in patients with chronic hepatitis C: a phase 1B, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 2017;38910070:709-717.

393. Beermann J, Piccoli MT, Viereck J, Thum T. Non-coding RNAs in Development and Disease: Background, Mechanisms, and Therapeutic Approaches. *Physiol Rev.* 2016;964:1297-1325.

394. Gomes CPC, Spencer H, Ford KL, Michel LYM, Baker AH, Emanueli C, Balligand JL, Devaux Y, Cardiolinc n. The Function and Therapeutic Potential of Long Non-coding RNAs in Cardiovascular Development and Disease. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2017;8:494-507.

395. Zhou SS, Jin JP, Wang JQ, Zhang ZG, Freedman JH, Zheng Y, Cai L. miRNAS in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta Pharmacol Sin.* 2018.

RESUME

Les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent la première cause de mortalité dans le Monde et en Europe. Le diagnostic et la prédiction de l'évolution des MCV reposent actuellement sur l'utilisation de biomarqueurs protéiques, mais doivent être améliorés pour optimiser la prise en charge des patients. Le transcriptome sanguin comprend l'ensemble des molécules ARN circulantes, qui sont présentes dans les cellules sanguines et libres dans le sang. Parmi elles, les ARN messagers (ARNm) codent pour des protéines alors que de petits ARN non codants, les microARNs (miARNs), répriment l'expression de leurs gènes cibles.

Nous avons émis l'hypothèse que le transcriptome sanguin, et en particulier les ARNm et les miARNs, avaient un potentiel de biomarqueur, diagnostique ou pronostique, dans les MCV.

En premier lieu, nous avons montré que l'héparine endogène pouvait induire une inhibition de la transcription inverse couplée à la PCR quantitative lors de la mesure des miARNs circulants et que ce paramètre devait être pris en compte lors de l'étude du transcriptome sanguin. Nous avons ensuite montré que 3 transcrits (codants pour les gènes *LMNB1, LTBP4, TGFBR1)* exprimés dans le sang total, étaient des prédicteurs indépendants de l'altération de la fonction cardiaque à 4 mois post-IM. De plus, l'ajout de ces 3 transcrits dans un modèle de prédiction contenant des variables cliniques augmente la valeur prédictive de ce modèle. Dans une troisième étude, nous avons montré que les niveaux circulants de miR-574-5p étaient capables de discriminer les patients porteurs d'un AAT des personnes saines. De plus, le miR-574-5p est encapsulé dans des vésicules extracellulaires dans le sang, suggérant un rôle paracrine. Au cours des quatrième et cinquième études, nous avons montré que les niveaux circulants de miR-122-5p étaient des prédicteurs indépendants de l'évolution neurologique et de la survie à moyen terme post-AC, et capable d'améliorer les modèles de prédiction existants. Nous avons également identifié le miR-574-5p comme prédicteur indépendant de l'évolution neurologique post-AC, spécifiquement chez les femmes.

En conclusion, ce travail de thèse a permis la découverte ou la confirmation de la valeur de biomarqueurs potentiels de transcrits et miARNs dans différentes MCV. Cependant, leur capacité de biomarqueur devra être validée dans d'autres études à grande échelle et à l'aide d'autres techniques avant d'envisager leur utilisation en clinique.

Mots clés : maladies cardiovasculaires, biomarqueurs diagnostiques, biomarqueurs prédictifs, transcriptome sanguin, microARN

ABSTRACT

Cardiovascular disease (CVD) is the main cause of mortality in the World and in Europe. Diagnosis and prediction of outcome of CVD currently rely on the use of protein biomarkers, but should be improved to optimize patient healthcare. Blood transcriptome contains all RNA molecules present in blood cells and in the acellular compartment. Among them, messenger RNA (mRNA) code for proteins whereas small non coding RNA, microRNA (miRNA), have a regulatory function by repressing the expression of their target genes.

We hypothesized that blood transcriptome, mRNA and miRNA in particular, had a potential as biomarker, diagnostic or prognostic, in CVD.

In a first study, we showed that endogenous heparin could lead to an inhibition of reverse transcription and quantitative PCR reaction used to measure miRNAs expressed in the blood, and that this parameter should be considered for studies on blood transcriptome. Secondly, we showed that 3 transcripts (coding for genes *LMNB1, LTBP4, TGFBR1)* expressed in whole blood, were independent predictors of cardiac function alteration at 4 months post-MI. Furthermore, the inclusion of these 3 transcripts in a prediction model containing clinical variables had an incremental predictive value. In a third study, we showed that circulating levels of miR-574-5p were able to discriminate patients with TAA from healthy controls. Furthermore, miR-574-5p was encapsulated in extracellular vesicles in the blood, suggesting a paracrine role. In the fourth and fifth studies, we showed that circulating levels of miR-122-5p were independent predictors of neurological outcome and survival at middle term post-CA, and were able to increase the prediction value of existing models. We also identified miR-574-5p as an independent predictor of neurological outcome post-CA, specifically in women.

To conclude, this work allowed the discovery or the confirmation of the potential biomarker value of transcripts and miRNAs in different CVD. However, their biomarker value should be validated in other large scale studies and with other methods of measurement before foreseeing their clinical utilization.

Keywords: cardiovascular disease, biomarkers, blood, transcriptomics, microRNA.