



**HAL**  
open science

# Effets du sacubitril/valsartan sur la néprilysine et le métabolisme des peptides natriurétiques dans l'insuffisance cardiaque chronique : étude clinique mécanistique

Théo Pezel

► **To cite this version:**

Théo Pezel. Effets du sacubitril/valsartan sur la néprilysine et le métabolisme des peptides natriurétiques dans l'insuffisance cardiaque chronique : étude clinique mécanistique. Médecine humaine et pathologie. 2019. dumas-03197305

**HAL Id: dumas-03197305**

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03197305v1>

Submitted on 13 Apr 2021

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

## AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'Etat de docteur en médecine. Ce document est 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 toute poursuite pénale.

*Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 122.4*

*Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 335.2-L 335.10*

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES  
Faculté de Médecine PARIS DESCARTES

Année 2019

N°132

THÈSE  
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT  
DE  
DOCTEUR EN MÉDECINE

Effets du sacubitril/valsartan sur la néprilysine et le métabolisme  
des peptides natriurétiques dans l'insuffisance cardiaque chronique :  
étude clinique mécanistique

Présentée et soutenue publiquement  
le 23 septembre 2019

Par

***Théo Pezel***

Né le 21 janvier 1990 à Paris

Dirigée par M. Le Professeur Damien Logeart PU-PH

Jury :

M. Le Professeur Alain Cohen-Solal, PU-PH ..... Président

M. Le Professeur Ariel Cohen, PU-PH

M. Le Professeur Thibaud Damy, PU-PH

M. Le Professeur Patrick Henry, PU-PH

## **Le Serment d'Hippocrate**

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans discrimination.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance.

Je donnerai mes soins à l'indigent et je n'exigerai pas un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement la vie ni ne provoquerai délibérément la mort.

Je préserverai l'indépendance nécessaire et je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je perfectionnerai mes connaissances pour assurer au mieux ma mission.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé si j'y manque.

# REMERCIEMENTS

J'adresse toute ma gratitude et mes chaleureux remerciements :

## **Au Professeur Damien LOGEART**

Pour son soutien et sa confiance en tant que directeur de thèse. Je vous remercie pour votre enseignement durant mon passage dans votre service, ainsi que pour votre encadrement pendant plus d'un an sur ce projet de recherche. C'était un réel plaisir de travailler ensemble sur ce projet. Je vous remercie pour l'énergie et la motivation que vous m'avez accordé.

## **Au Professeur Alain COHEN-SOLAL**

Pour m'avoir fait l'honneur de présider cette thèse, mais surtout pour son soutien et son écoute attentive depuis le début de mon internat. Vous avez toujours répondu présent lorsque j'avais besoin d'aide ou de conseils. Enfin, je vous serai toujours très reconnaissant de me soutenir comme vous l'avez fait dans ce projet de mobilité aux États-Unis, en décalant mon clinicat, en échangeant avec le Pr Joao Lima afin de penser ce projet ensemble.

## **Au Professeur Patrick HENRY**

Pour avoir bien voulu encadrer mon projet de Master 2 qui n'aurait pu aboutir sans ses conseils avisés. Je vous suis très reconnaissant pour votre grande disponibilité pour moi depuis près de 3 ans. Votre bienveillance et les conseils que vous me prodiguez depuis le début de mon internat, ont été pour moi des garde-fous constants dans mes décisions. Je n'oublierai jamais ce séjour de formation en Inde à vos côtés et la joie que j'ai pu avoir de faire partie de « votre équipe ». En espérant être à la hauteur de votre confiance. Votre vision dynamique et ouverte de la cardiologie me permet de voir les choses en plus grand et d'acquérir un véritable recul dont j'avais besoin.

## **Au Professeur Thibaud DAMY**

Pour son écoute dès le début de mon internat et pour le temps qu'il m'a consacré à me montrer tout ce que la recherche clinique pouvait apporter au clinicien. Merci encore Thibaud pour tout ce que tu m'apportes depuis des années maintenant. Au-delà d'avoir une vision, tu sais nous la transmettre, et en faire profiter les gens autour de toi. Cette énergie incroyable tu l'utilises aussi pour écouter, entendre pour mieux avancer en équipe. C'est un honneur de pouvoir travailler avec toi au sein du Groupe Insuffisance et Cardiomyopathie.

## **Au Professeur Ariel COHEN**

Pour son ouverture d'esprit aux jeunes cardiologues et pour son soutien à chaque projet discuté ensemble. En effet, je n'ai pas eu le plaisir de passer en stage à Saint Antoine, pour avoir l'honneur de travailler à vos côtés, et je le déplore. Cependant, lors de nos interactions au sein de la SFC, ainsi que pour votre Journal ACVD, vous avez toujours répondu présent pour discuter ensemble de nos projets... Merci encore pour votre confiance sur ces projets actuels, mais surtout futurs.

## **Au Professeur Jean Pierre LAISSY**

Pour m'avoir permis un tel accueil au sein de l'équipe de Radiologie à travers une disponibilité, un soutien constant, ainsi que d'avoir bien voulu apporter son expertise indispensable à la réussite de mes projets actuels et futurs en imagerie. Plus qu'un professeur, c'est un véritable ami que j'ai appris à connaître depuis 2 ans maintenant. Merci pour tous ces moments d'échange Jean Pierre !

## **À Nicolas VODOVAR et Hélène NOUGUE**

Pour leur collaboration et leur échange autour de ce travail de thèse. Vous représentez pour moi la première découverte de « l'esprit INSERM », mais plus largement de l'intérêt de la recherche

fondamentale et translationnelle. Un grand merci pour ce partage d'expertise et d'avoir rendu ce projet de thèse aussi ambitieux et exigeant, lui permettant d'être publié.

**À Toute l'Equipe Médicale de Cardiologie de l'hôpital Lariboisière : Dr Jean Guillaume DILLINGER, Dr Georgios SIDERIS, Dr Stéphane MANZO-SILBERMAN, Dr Florence BEAUVAIS, Dr Ghassan MOUBARAK et Dr Mathilde BAUDE.**

Pour leur accueil et leur encadrement depuis mon passage comme interne à Lariboisière. Merci infiniment pour votre participation active à ce protocole de recherche, pour vos remarques toujours constructives, pour votre bienveillance constante. J'ai beaucoup appris à vos côtés et je suis impatient de revenir travailler avec vous comme CCA !

**À Toute l'Equipe Paramédicale de Cardiologie de l'hôpital Lariboisière**

Ce n'est pas un service de médecine, c'est une véritable famille que j'ai trouvé à Lariboisière depuis plus de 3 ans maintenant. Que ce soit auprès des patients, lors de la réalisation de nos protocoles de recherche, ou encore à l'extérieur de l'hôpital pour fêter les bonnes ou les mauvaises nouvelles, c'est l'esprit d'une famille qui vit entre les quatre murs de cet hôpital. Merci pour ce que vous êtes et pour votre confiance !

**Au Professeur Jérôme GAROT**

Pour son accueil à Massy depuis près de 2 ans avec une capacité hors normes à transmettre son savoir et son expertise en imagerie cardiaque. Au-delà du mentor de renom en imagerie, j'ai surtout découvert un homme d'une profonde humilité avec une écoute rare et une volonté de transmettre et de porter les plus jeunes comme j'ai rarement vu. Merci pour tout Jérôme !

**À Ma mère**

Pour son amour, son soutien sans faille et constant depuis près de trente ans, et sans qui je ne serai rien aujourd'hui. Maman, tu es pour moi une source d'énergie et de réconfort permanent, la dernière lumière allumée dans l'obscurité la plus totale, l'ultime rempart au doute et à l'adversité. Je suis fier d'être ton fils. Et je sais tous les sacrifices que tu as dû faire pour que nous en soyons ici, comme ça aujourd'hui...

**À Mon père**

Pour son amour, ses valeurs transmises et sa vision de ce monde. Ton regard sur l'hôpital public, sur notre rôle comme citoyen sur cette planète et sur notre devoir de tolérance les uns envers les autres m'habite en permanence.

**À Ma grand-mère**

Confidente de la première heure avec une bienveillance et un amour infini qui ont été déterminants dans certains moments difficiles de ma vie. Mamie, je t'aime tellement. Je suis tellement heureux de pouvoir partager cette soutenance de thèse avec toi.

**À Mes cousins, ma tante et mon oncle**

Pour leur amour et tous ces moments intenses passés ensemble depuis toujours. Vous êtes mon sang, et je suis fier d'être le vôtre.

**À David DEUTSCH**

Mon meilleur ami. Véritable constante dans ce monde qui va à mille à l'heure... On a déjà tellement partagé ensemble : nos joies, nos peurs, nos projets, notre vision de ce monde. Tous ces moments passés avec toi sont tellement importants pour moi. Je te souhaite le meilleur mon fréro !

**À Delphine MIKA**

Pour son amitié inconditionnelle, et son soutien constant, mais aussi pour la réflexion scientifique qu'elle

a pu apporter à ce projet, ainsi que pour sa relecture attentive de cette thèse. Merci pour cette ouverture d'esprit à la recherche et pour m'avoir transmis, avec amitié, ce goût pour l'exigence et la rigueur scientifique. Si je me prépare à m'engager dans une thèse de science sur les prochaines années, c'est aussi largement grâce à toi. Merci infiniment Delphine !

#### **À Guillaume BONNET**

Pour cette sensation ne plus me sentir seul, pour cette vision partagée. Notre amitié est à l'image de notre passion : entière ! Tu me surprends parfois, me touche souvent et me rassures constamment.

#### **À Margot FERRY**

Ma meilleure amie et incontestablement la personne la plus capable de me rappeler de rester un médecin à l'écoute de l'autre, au service de son patient avant tout. Tu ne l'imagines probablement pas Margot, mais tu représentes pour moi une source d'apaisement et de sérénité devenue tellement rare aujourd'hui. Merci d'être qui tu es !

#### **À Pierre KHALIFA et Marc BELLAICHE**

Pour m'avoir donné ma chance en me laissant réaliser des conférences d'internat, véritable passion pour moi me permettant d'échanger avec les étudiants. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenu constamment depuis le premier jour.

**A ma Promotion de Cardiologie et à mes co-internes : Alexandre, Paul-Matthieu, Anastasia, Julien, Thomas, Yoann, Gary, Amir, Anne-Sophie, Mickael, Antoine, Aurélien, Baptiste, Damien, Rith, Léa, Reaksmei, Marine, Laura, Elisa, Sophie, Marie, Sarah, Mélanie, Jessica, Héloïse, Hélène, Matthieu, Emmanuel, Victor, Ugo, Martin, Michel, Romain, Alexandra, Emilie, Jonathan, Sylvain...**

Nous avons su garder une excellente ambiance durant ces 4 ans, nous nous sommes entre-aidés, soutenus, nous avons ri ... J'espère sincèrement que cet esprit bienveillant persistera dans les années à venir.

#### **A tous mes amis en dehors de la médecine**

Merci d'avoir toujours été présents à mes côtés et d'avoir supporté mes disparitions intempestives, notamment à l'approche des concours et partiels.

#### **A tous les médecins que j'ai croisé et qui ont su partager leur enseignement !**

Merci pour votre patience et votre apprentissage tout au long de mon internat.

#### **A tous les externes et étudiants en médecine que j'ai côtoyé en stage !**

Merci pour votre curiosité permanente, vos remises en question et pour votre aide quotidienne au lit du patient. Vous m'avez beaucoup apporté.

#### **À Tous les membres du Collège des Cardiologues en Formation (CCF) !**

Cela fait maintenant 4 ans que je participe activement à vos côtés aux différentes actions et formations du CCF. Ce monde de l'associatif et du partage de notre passion est devenu pour moi une nécessité. Ce qui symbolise le plus aujourd'hui, à mon sens, cet « esprit jeune du CCF » est notre Journal du CCF, véritable voix des internes de cardiologie en France depuis près de 2 ans... Merci à toutes et à tous pour votre confiance et votre soutien à tous ces projets passés, présents et futurs.

# TABLE DES MATIERES

<b>PARTIE 1 : INSUFFISANCE CARDIAQUE ET BIOMARQUEURS</b> .....	<b>8</b>
<b>1. GENERALITES</b> .....	<b>8</b>
1-1) Epidémiologie.....	8
1-2) Critères diagnostiques de définition de l'insuffisance cardiaque.....	8
1-3) Clinique de l'insuffisance cardiaque.....	9
1-4) Etiologies de l'insuffisance cardiaque.....	9
1-5) Campagnes de prévention de l'insuffisance cardiaque.....	10
<b>2. ENJEU DU SYSTEME NEURO-HORMONAL</b> .....	<b>11</b>
2-1) Physiopathologie de l'insuffisance cardiaque.....	11
2-2) Système adrénergique.....	11
2-3) Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA).....	13
2-3) Peptides Natriurétiques (PNs).....	15
2-4) Autres systèmes hormonaux impliqués dans l'IC.....	17
<b>3. BIOMARQUEURS DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE</b> .....	<b>18</b>
3-1) BNP et ANP comme biomarqueurs.....	18
3-2) Mécanisme d'action physiologique des peptides natriurétiques.....	20
3-3) Intérêts diagnostique et pronostique du dosage sanguin des peptides natriurétiques.....	22
3-4) La résistance au BNP.....	23
3-5) Rôle thérapeutique des peptides natriurétiques.....	23
<b>4. THERAPEUTIQUES ACTUELLES DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE</b> .....	<b>25</b>
<b>5. L'INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DE LA NEPRILYSINE</b> .....	<b>28</b>
5-1) Le rôle physiologique de la néprilysine (NEP).....	28
5-2) Etude PARADIGM.....	28
5-3) Limites de l'étude PARADIGM.....	30
5-4) Effets secondaires et risques potentiels associés au sacubitril/valsartan <sup>(57)</sup> .....	31
5-5) Etude PIONEER-HF.....	33
5-6) Etudes en vie réelle.....	34
5-7) Etude PARAGON-HF.....	35

<b><u>PARTIE 2 : ARTICLE MEDICAL SCIENTIFIQUE</u></b> .....	<b>36</b>
PUBLICATION DE L'ARTICLE DANS L' <i>EUROPEAN JOURNAL OF HEART FAILURE</i> (2018) .....	36
INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES ( <i>SUPPLEMENTARY DATA</i> ) .....	44
<b><u>PARTIE 3 : DISCUSSION DES POINTS D'ACTUALITE DU</u></b> <b><u>SACUBITRIL/VALSARTAN</u></b> .....	<b>56</b>
1. EFFETS DU SACUBITRIL/VALSARTAN SUR LES DONNEES ECHOCARDIOGRAPHIQUES .....	56
2. QUEL DOSAGE DE BIOMARQUEUR DOIT-IL ETRE PRIVILEGIE ENTRE ANP ET BNP/NT- PROBNP ? .....	57
3. INTERPRETATION DES DOSAGES DE BIOMARQUEURS SOUS SACUBITRIL/VALSARTAN ..	57
4. EFFETS PLEIOMORPHES DU SACUBITRIL/VALSARTAN .....	59
<b><u>CONCLUSIONS</u></b> .....	<b>60</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>61</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>66</b>
<b>RESUME EN FRANÇAIS</b> .....	<b>68</b>
<b>TITRE EN ANGLAIS</b> .....	<b>68</b>
<b>RESUME EN ANGLAIS</b> .....	<b>68</b>
<b>MOTS-CLES EN FRANÇAIS</b> .....	<b>68</b>
<b>MOTS-CLES EN ANGLAIS</b> .....	<b>68</b>
<b>LABORATOIRE D'ACCUEIL DE LA THESE</b> .....	<b>68</b>

# Partie 1 : INSUFFISANCE CARDIAQUE et BIOMARQUEURS

## 1. GÉNÉRALITÉS

### 1-1) Epidémiologie

L'insuffisance cardiaque (IC) est aujourd'hui un **problème de santé publique**. Son incidence est en constante augmentation à l'échelle mondiale avec dans les pays développés, 2 à 3% de la population atteinte d'insuffisance cardiaque<sup>(1,2)</sup>. Le vieillissement de la population et le dépistage des maladies cardiovasculaires expliquent en partie cette augmentation de prévalence avec plus de 10% des patients de plus 70 ans touchés<sup>(3)</sup>. L'IC est devenue la deuxième cause de mortalité dans les pays développés, derrière le cancer du poumon<sup>(1)</sup>. Du fait du nombre important de ré-hospitalisations pour des épisodes de décompensation cardiaque, cette pathologie a un coût économique important. Pour toutes ces raisons, la prise en charge de l'IC chronique doit être améliorée.

### 1-2) Critères diagnostiques de définition de l'insuffisance cardiaque

Depuis la publication des dernières recommandations de la Société Européenne de Cardiologie (ESC, *European Society of Cardiology*) en 2016 on distingue trois grands types d'IC<sup>(4)</sup>:

- l'IC avec **altération de la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG)** qui correspond schématiquement à une force de contraction cardiaque diminuée,
- l'IC à **FEVG préservée** avec une capacité au remplissage altérée mais une force de contraction cardiaque conservée,
- l'IC à **FEVG intermédiaire** laquelle rend compte d'une distinction plus récente située en zone intermédiaire entre les deux types d'IC précédents.

D'après les recommandations de l'ESC, on parle d'IC systolique lorsque la FEVG est inférieure à 40% et que le patient présente des symptômes d'IC<sup>(4)</sup>.

Type d'IC		IC à FEVG réduite	IC à FEVG intermédiaire	IC à FEVG préservée
Critères	1	Symptômes +/- Signes <sup>a</sup>		
	2	FEVG < 40 %	FEVG 40 – 49 %	FEVG ≥ 50 %
	3	–	1. Elévation des taux de peptides natriurétiques <sup>b</sup> 2. Au moins un critère supplémentaire : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Anomalies cardiaques structurales (HVG ou dilatation de l'OG)</li> <li>- Dysfonction diastolique selon les recommandations ESC 2016</li> </ul>	

**Tableau 1 : Définition de l'insuffisance cardiaque à FEVG préservée, à FEVG intermédiaire et à FEVG réduite adapté selon les recommandations ESC 2016<sup>(4)</sup>.**

*BNP : brain natriurétic peptide ; FEVG : fraction d'éjection ventriculaire gauche ; HVG : hypertrophie ventriculaire gauche ; OG : oreillette gauche ; NT-proBNP : N-terminal pro-B natriuretic peptide*

<sup>a</sup> Signes pouvant ne pas être présents au stade précoce de la maladie

<sup>b</sup> BNP > 35 pg/ml et/ou NT-proBNP > 125 pg/ml

### 1-3) Clinique de l'insuffisance cardiaque

On dichotomise classiquement les signes cliniques congestifs de l'IC en deux catégories<sup>(4)</sup> :

- les signes d'IC **gauche** : dyspnée d'effort puis de repos liée à l'œdème pulmonaire
- les signes d'IC **droite** : avec l'apparition d'œdèmes des membres inférieurs, la prise rapide de poids, la turgescence jugulaire et le reflux hépato-jugulaire.

De plus, des signes de **bas débit périphérique** avec malaises et hypotension orthostatique peuvent s'associer aux signes de surcharge hydro-sodée.

Enfin, l'IC peut se compliquer à un stade plus évolué, de troubles du rythme cardiaque ou d'embolie artérielle sur la formation de thrombus intracardiaque. Le risque de décès est alors important.

### 1-4) Etiologies de l'insuffisance cardiaque

Il existe souvent plusieurs causes différentes d'IC chez un patient : on parle de **maladie multifactorielle**. Ainsi, dans l'IC à FEVG altérée, la principale cause d'insuffisance cardiaque IC

est la cardiopathie ischémique, puis la cardiomyopathie dilatée idiopathique<sup>(5)</sup>, et enfin les valvulopathies peuvent aussi être responsables d'IC à un stade plus évolué.

### 1-5) Campagnes de prévention de l'insuffisance cardiaque

Un constat récent en population générale et que l'IC est une maladie peu connue du grand public alors même qu'elle touche plus de 1 million de personnes en France<sup>(6)</sup>. Ainsi, de récentes campagnes de prévention ont été lancées afin de sensibiliser à travers des formules 'choc' comme : « l'insuffisance cardiaque c'est 1 décès toutes les 7 minutes ! », ou encore le mnémotechnique pédagogique « EPOF » rappelant de façon simple au grand public les quatre principaux signes évocateurs d'IC : « Essoufflement, Prise de poids, Œdèmes et Fatigue intense » (Figure 1). L'objectif de cette stratégie de communication à grande échelle est de pouvoir inciter à un diagnostic le plus précoce possible afin de permettre une prise en charge optimale capable d'améliorer le pronostic des patients.



**Figure 1** : Affiche de prévention de l'insuffisance cardiaque destinée au grand public, par le Groupe Insuffisance Cardiaque et Cardiomyopathies (GICC) de la Société Française de Cardiologie (SFC), 2018

## 2. ENJEU DU SYSTÈME NEURO-HORMONAL

### 2-1) Physiopathologie de l'insuffisance cardiaque

En situation physiologique, le cœur doit pouvoir apporter un débit sanguin adapté aux besoins des différents organes du corps humain. Ce débit doit pouvoir s'adapter à la situation clinique (effort ou repos) et aux besoins de l'organisme. Dans ce sens, la physiologie cardio-vasculaire est régulée par des facteurs neurologiques et hormonaux, qui ont pour rôle de maintenir un apport d'oxygène suffisant aux différents organes du corps. Ils agissent par exemple sur la fréquence cardiaque, la vasodilatation artérielle, la réabsorption sodique au niveau rénal...

En cas d'IC définie par une anomalie de structure et/ou de fonction cardiaque pouvant conduire à un défaut d'apport en oxygène des tissus<sup>(4)</sup>, différents mécanismes de compensation par régulation neuro-hormonale sont mis en jeu. Dans l'IC chronique les deux mécanismes neuro-hormonaux clairement identifiés comme néfastes pour le cœur et les myocytes en cas de compensation prolongée sont :

- le système **adrénergique**
- le système **rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA)**

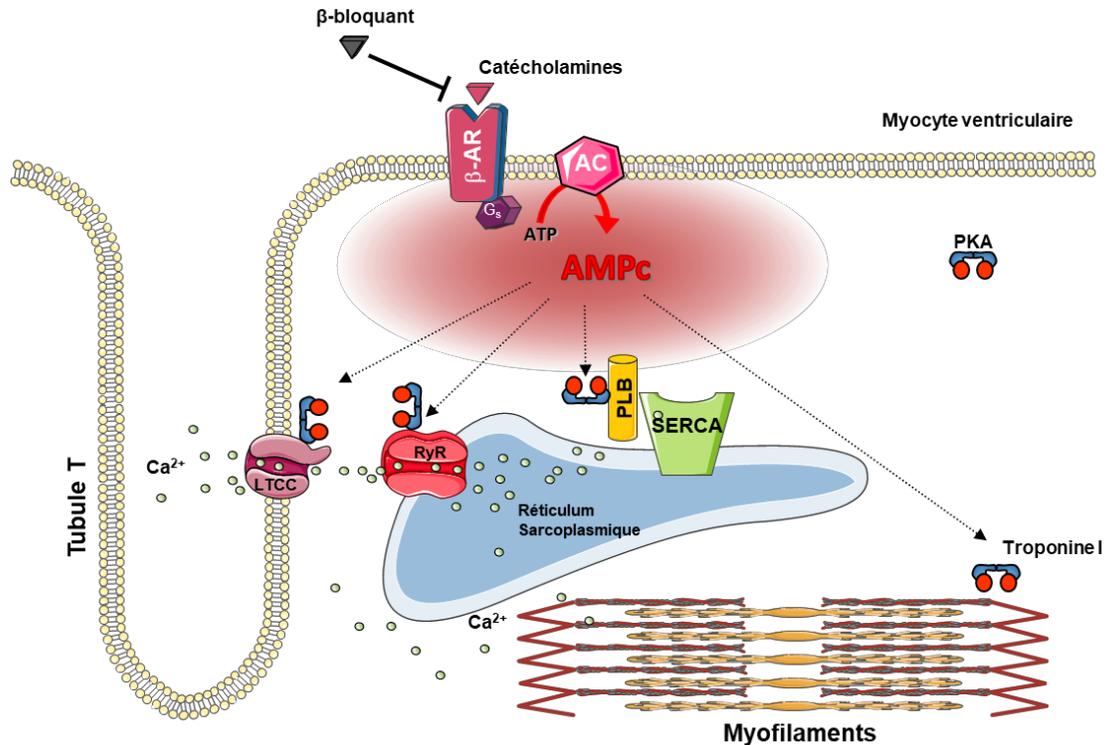
Il s'agit aujourd'hui des deux cibles essentielles du traitement de l'IC chronique à FEVG altérée.

### 2-2) Système adrénergique

Le système adrénergique, composante du système nerveux sympathique, intervient dans ces mécanismes d'adaptation de l'IC : afin d'augmenter le rendement cardiaque du fait de la libération de catécholamines (majoritairement noradrénaline et adrénaline). Ce système agit à la fois sur la fréquence cardiaque (action directe sur les cellules sinoatriales) et sur la contractilité individuelle des cardiomyocytes. Ces effets sont dus (i) à la libération locale principalement de noradrénaline à partir des fibres post-ganglionnaires innervant l'ensemble du myocarde et (ii) à la libération systémique principalement d'adrénaline à partir de la médullo-surrénale. Noradrénaline et adrénaline augmentent toutes deux la force contractile des cardiomyocytes.

Cependant, à terme cette hyperactivation adrénergique devient néfaste et provoque une désensibilisation des bêta-récepteurs myocardiques. De plus, elle stimule l'hypertrophie et l'apparition de fibrose favorisant la survenue d'arythmie<sup>(7)</sup>. Le système adrénergique est activé par les récepteurs  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ - et  $\beta_2$ -adrénergiques situés dans le cœur et le réseau artériel<sup>(8)</sup>.

Les **bétabloquants** bloquent l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ce qui inhibe la réponse sympathique (**Figure 2**). De nombreuses études cliniques ont montré qu'en général les  $\beta$ -bloquants réduisent la mortalité de 30%, l'hospitalisation de 40% et la mort brutale d'origine cardiaque de 38% des patients atteints d'IC à FEVG altérée<sup>(8,9)</sup>.



**Figure 2 : Régulation du couplage excitation-contraction (CEC) des myocytes cardiaques par la voie  $\beta$ -adrénergique et mode d'action des  $\beta$ -bloquants (adapté de Mika *et al.*<sup>(8)</sup>)**

*L'activation par les catécholamines des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ( $\beta$ -AR) couplés aux protéines  $G_s$  active la synthèse d'AMPc par les adénylate cyclases (AC). Classiquement, l'effet inotrope positif de l'AMPc est attribué à l'activation de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) qui phosphoryle les canaux calciques de type L (LTCC) et les récepteurs de la ryanodine (RyR), conduisant à une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  et donc de la contraction. La PKA phosphoryle aussi le phospholamban (PLB), ce qui lève l'inhibition tonique exercée par cette protéine sur la pompe SERCA (Sarco-Endoplasmique Réticulum  $Ca^{2+}$  ATPase) et accélère le repompement du  $Ca^{2+}$  dans le réticulum sarcoplasmique. Enfin, la PKA phosphoryle la troponine I au niveau des myofilaments, ce qui diminue leur affinité pour le  $Ca^{2+}$ . La phosphorylation du PLB et de la troponine I concourent à une accélération de la relaxation cardiaque (effet lusitrope positif). Les  $\beta$ -bloquants, antagonistes des  $\beta$ -AR, vont entrer en compétition avec les agonistes  $\beta$  et ainsi bloquer leurs effets.*

### 2-3) Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA)

Le second mécanisme d'adaptation important dans l'IC est le SRAA qui agit sur l'équilibre hémodynamique en modifiant la volémie ainsi que les résistances artérielles et myocytaires. Les principales hormones du SRAA sont l'angiotensine II et l'aldostérone. Elles ont des effets bénéfiques ou délétères (selon leur concentration) qui affectent la fonction des vaisseaux sanguins, du cœur, du rein, et d'autres organes.

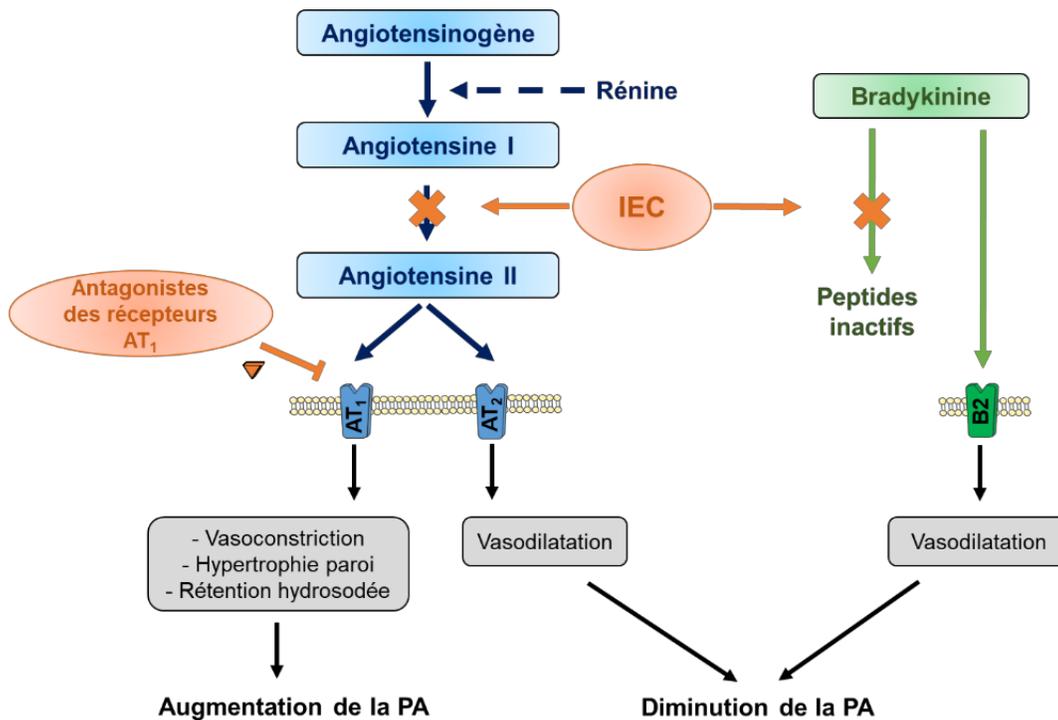
En cas d'IC, le SRAA est activé de façon chronique ce qui entraîne la transformation de l'angiotensine 1 en angiotensine 2 par l'intermédiaire de l'enzyme de conversion<sup>(10)</sup>. L'angiotensine 2 est alors responsable d'une vasoconstriction artérielle ce qui augmente les résistances artérielles, et donc conduit à une nette augmentation du travail du cœur pour compenser cette augmentation de la post-charge.

A long terme, l'hyperactivation du SRAA altère les performances de contraction et de remplissage du cœur. En effet, elle entraîne une rétention hydro-sodée majorée au niveau rénal ce qui augmente les conditions de charge et favorise encore le remodelage myocardique pathologique<sup>(10-12)</sup>. De plus, elle provoque directement une hypertrophie ventriculaire avec majoration des dépôts de fibrose, car l'angiotensine 2 est capable d'induire une sécrétion d'aldostérone par les corticosurrénales, cette dernière ayant une action pro-fibrosante néfaste sur le remodelage myocardique<sup>(13)</sup>.

Les **inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC)** sont un pilier fondamental du traitement pharmacologique utilisé dans l'IC. Les IEC bloquent la transformation de l'angiotensine 1 en angiotensine 2. Ainsi, le phénomène de vasoconstriction artérielle induit par l'angiotensine 2 est diminué, ce qui permet aux IEC de diminuer la pression artérielle et la réabsorption hydrosodée induite par la sécrétion d'aldostérone (**Figure 3**).

De plus, les IEC se sont avérés supérieurs aux vasodilatateurs classiques du fait d'un effet positif sur le remodelage ventriculaire et d'une action anti-fibrosante sur le myocarde. Ainsi, de nombreuses études cliniques ont montré que les IEC diminuent de façon significative la mortalité des patients atteints d'IC à FEVG altérée<sup>(10-12)</sup>.

Les **antagonistes du récepteur de l'angiotensine 2 (ARA2)** sont une autre classe thérapeutique utilisée dans l'IC chronique, en alternative aux IEC. Ils bloquent l'effet de l'angiotensine 2 en ayant une action antagoniste de leur récepteurs<sup>(12)</sup>. Ils n'ont pas d'effet sur la concentration de bradykinine. En somme, leurs effets pharmacologiques sont proches de ceux des IEC en dehors de l'augmentation de la concentration de bradykinine. En conséquence, les effets secondaires à type de toux ou d'angio-œdème chez les patients sous ARA2 sont diminués<sup>(14,15)</sup>.



**Figure 3 : Molécules ciblant le Système rénine-angiotensine-aldostérone**

*adapté de van Vark et al.<sup>(16)</sup>*

*IEC : inhibiteurs de l'enzyme de conversion ; PA : pression artérielle, AT<sub>1</sub> : récepteur de l'angiotensine 1 ; AT<sub>2</sub> : récepteur de l'angiotensine 2 ; B2 : récepteur de la bradykinine*

Enfin, les **antagonistes des récepteurs minéralocorticoïdes de l'aldostérone** sont une dernière classe thérapeutique importante utilisée dans l'IC chronique, en complément des bêtabloquants et IEC ou ARA2. Il s'agit de diurétiques « épargneurs de potassium » qui agissent au niveau du tubule connecteur et du canal collecteur cortical. La réabsorption sodée se fait via le canal sodé épithélial (ENac) et s'accompagne d'une excrétion de potassium et de H<sup>+</sup><sup>(17)</sup>. Ce processus est

fortement stimulé par l'aldostérone. Les deux molécules prescrites en pratique sont la Spironolactone et l'Eplérénone, ayant une activité d'antagonistes compétitifs du récepteur de l'aldostérone. Leur effet natriurétique est relativement faible avec un intérêt lié à leur caractère épargneur de potassium permettant de limiter le risque d'hypokaliémie induit par les diurétiques de l'anse comme le Furosémide fréquemment prescrit pour contrôler les signes congestifs d'IC<sup>(18)</sup>. Cependant, le véritable intérêt de ces molécules réside dans leur bénéfice en termes de remodelage ventriculaire. En effet, elles limitent la production de fibrose et l'apparition de l'hypertrophie, en limitant la production intratissulaire d'aldostérone. Elles sont d'ailleurs considérées comme des molécules « anti-fibrosantes. »

### **2-3) Peptides Natriurétiques (PNs)**

#### **Généralités**

Les PNs forment une famille de plusieurs peptides ayant une grande homologie de structure, caractérisée par un pont disulfure qui leur confère une structure stérique équivalente permettant leur interaction avec les récepteurs cellulaires – Natriuretic Peptide Receptor A et B – responsables de leurs effets hormonaux. Les PNs de type A (ANP) et de type B (BNP) sont produits par le cœur et sont codés par deux gènes distincts du chromosome 1. Malgré certaines spécificités dans leurs processus et lieux de production, leurs mécanismes d'action et de leurs effets biologiques sont très proches. Le peptide de type C (CNP) est produit de façon plus ubiquitaire, là où il a une action paracrine. L'urodilatine, de structure très proche de l'ANP, est produite par les cellules épithéliales rénales du tubule contourné distal.

#### **Processus de fabrication, de sécrétion et d'élimination**

L'ANP est produit par les myocytes des oreillettes où il est stocké dans des granules. Ces granules sont libérés dans la circulation lors de l'étirement des myocytes (en cas de majoration de la volémie et/ou des pressions intracavitaires). Ce mode de production permet une adaptation rapide des taux sanguins notamment en situation physiologique. Le BNP est produit majoritairement par les myocytes des ventricules<sup>(19)</sup>, sans stockage préalable, de façon constitutive. L'activation de la transcription des gènes des PNs se fait via les voies de transduction du signal d'étirement des cardiomyocytes et via plusieurs signaux hormonaux

(noradrénaline, angiotensine II, endothéline 1...) agissant par la voie des récepteurs couplés aux protéines Gαq/α11 et l'activation de la voie des MAP kinases.

Les PNs sont produits sous forme de précurseurs qui subissent un processus de maturation complexe et régulé. La transcription du gène NPPB donne le pre-proBNP qui se transforme en proBNP après excision du peptide signal. Ce précurseur de 108 acides aminés est clivé entre l'Arginine 76 et la Serine 77 par les protéases transmembranaires corine ou furine en deux fragments : le BNP1-32 qui est le peptide ayant une action hormonale et le NTproBNP1-76<sup>(20)</sup>. Ce clivage se produit lors du relargage extracellulaire.

Dans l'IC chronique, il a été montré qu'une quantité importante, voire majoritaire, de proBNP est directement relarguée par les cardiomyocytes. Ceci est lié à un processus post-transcriptionnel de O-glycosylation du proBNP, au niveau de la Thréonine 71. Dans les conditions d'IC aiguë, ce processus de glycosylation diminue expliquant un relargage accru de BNP bioactif dans cette situation<sup>(21)</sup>.

L'élimination du NT-proBNP est rénale. Le BNP a un processus d'élimination plus complexe : élimination rénale directe via le récepteur responsable de la clairance des peptides natriurétiques (NPR-C) au niveau endothélial, avec une dégradation enzymatique impliquant notamment la Néprilysine (NEP = *Neutral EndoPeptidase*). Si la dégradation enzymatique du BNP via la NEP est bien établie chez le rongeur, ce processus est moins clair chez l'homme : BNP et proBNP peuvent se lier à la NEP mais l'action biologique de cette dernière y est moins évidente *in vitro*. De plus, d'autres enzymes sont également impliquées dans la dégradation du BNP comme la DPP4. Enfin, le BNP (et proBNP) régule directement l'activité de la NEP qui est fortement inhibée en cas d'élévation importante des taux de peptides<sup>(22)</sup>.

Par ailleurs, il est important de savoir que les kits commerciaux de dosage mesurent de façon indistincte BNP1-32, formes tronquées du BNP et proBNP, alors que le dosage du NTproBNP est davantage spécifique. Il existe aussi un dosage spécifique du proBNP.

Les processus de maturation de l'ANP sont moins connus que ceux du BNP, en raison de difficultés à le doser de façon fiable (demi-vie courte et instabilité biochimique). Il existe un kit pour doser la partie centrale du proANP qui est plus stable. Des processus de maturation proches de ceux du BNP existent incluant le clivage par la corine du proANP en fragment N-terminal1-98

et en fragment C-terminal (ANP1-28), et probablement aussi une glycosylation du proANP<sup>(23)</sup>. Les processus de dégradation de ces peptides seraient globalement similaires à ceux des PNs de type B. Les mécanismes de production et de dégradation du CNP semblent proches des autres mais moins bien étayés<sup>(24)</sup>.

#### 2-4) Autres systèmes hormonaux impliqués dans l'IC

La **bradykinine** est une protéine ayant des effets tissulaires locaux de vasodilatation (**Figure 3**). Sa synthèse augmente en cas de stress cardiaque, comme par exemple lors d'un exercice physique. La bradykinine est dégradée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Une concentration trop importante de bradykinine peut être néfaste pour l'organisme en entraînant une vasodilatation accrue et une hyper-perméabilité des capillaires sanguins<sup>(14)</sup>. Par exemple, suite à l'élévation de la concentration de bradykinine, certains patients peuvent présenter un angio-œdème potentiellement mortel s'il s'agit d'un œdème laryngé<sup>(14,15)</sup>. Un autre effet secondaire de la bradykinine est l'apparition d'une toux sèche, secondaire à la bronchoconstriction.

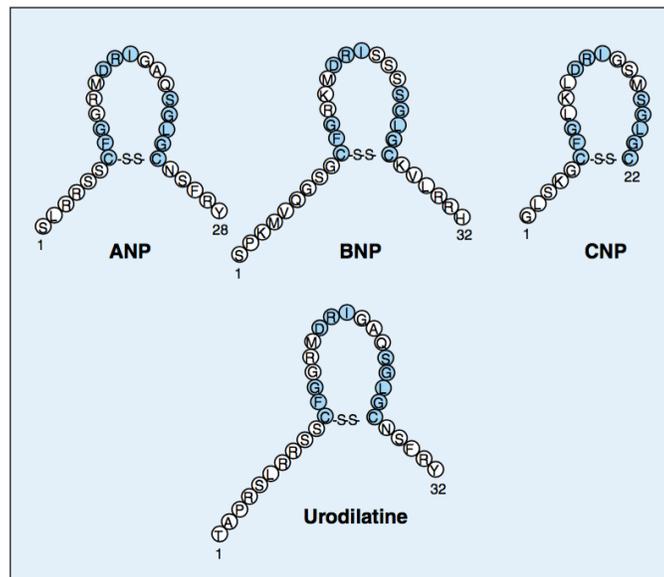
Les IEC ont aussi un effet sur la concentration de bradykinine. Celle-ci augmente suite à l'administration d'un traitement par IEC puisque leur dégradation est inhibée<sup>(14)</sup>. Il y a donc un effet potentialisateur des IEC sur la cardioprotection en inhibant le SRAA et en augmentant la concentration de bradykinine. Le risque d'effets secondaires dus à la bradykinine est cependant accentué chez les patients traités par IEC, avec l'apparition de toux ou plus grave, d'un angio-œdème<sup>(10,11,14,15)</sup>.

### 3. BIOMARQUEURS DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE

#### 3-1) BNP et ANP comme biomarqueurs

En cas d'IC, les cellules myocardiques s'étirent en conséquence de l'augmentation de pression intra-cardiaque ce qui conduit à la sécrétion de *Brain Natriuretic Peptide* (BNP) qui appartient à la famille des peptides natriurétiques comprenant également l'*Atrial Natriuretic Peptide* (ANP), le Peptide Natriurétique de type C (CNP) et l'urodilatine<sup>(25)</sup> (**Figure 4**). Le BNP, tout comme l'ANP, est essentiellement synthétisé par le cardiomyocyte, aussi bien dans les oreillettes que dans les ventricules. Cependant, alors que le gène de l'ANP est majoritairement exprimé dans les oreillettes, celui du BNP est exprimé de façon plus homogène dans l'ensemble du cœur. Il est ainsi admis que 40 % du contenu du cœur en BNP est localisé au niveau ventriculaire contre 2 % pour l'ANP. Il faut également noter que le BNP circulant est essentiellement d'origine ventriculaire, aussi bien chez le sujet sain que chez le patient en IC.

Le BNP est une hormone synthétisée par le cœur en réponse à l'étirement des myocytes. Cette hormone a un effet diurétique et de vasodilatation. Elle inhibe l'activation du SRAA ainsi que la sécrétion d'aldostérone et a un effet favorable sur le remodelage cardiaque. En somme, cette hormone protège le cœur en cas d'IC<sup>(14)</sup>.



**Figure 4 : Structure des différents types de peptides natriurétiques**  
d'après B. Cauliez et al.<sup>(28)</sup>.

L'identité de séquence entre les différents peptides correspond à la structure annulaire de leurs 17 acides aminés. Les 11 de ces 17 acides aminés sont communs à l'ANP, au BNP, au CNP et à l'urodilatine (en bleu).

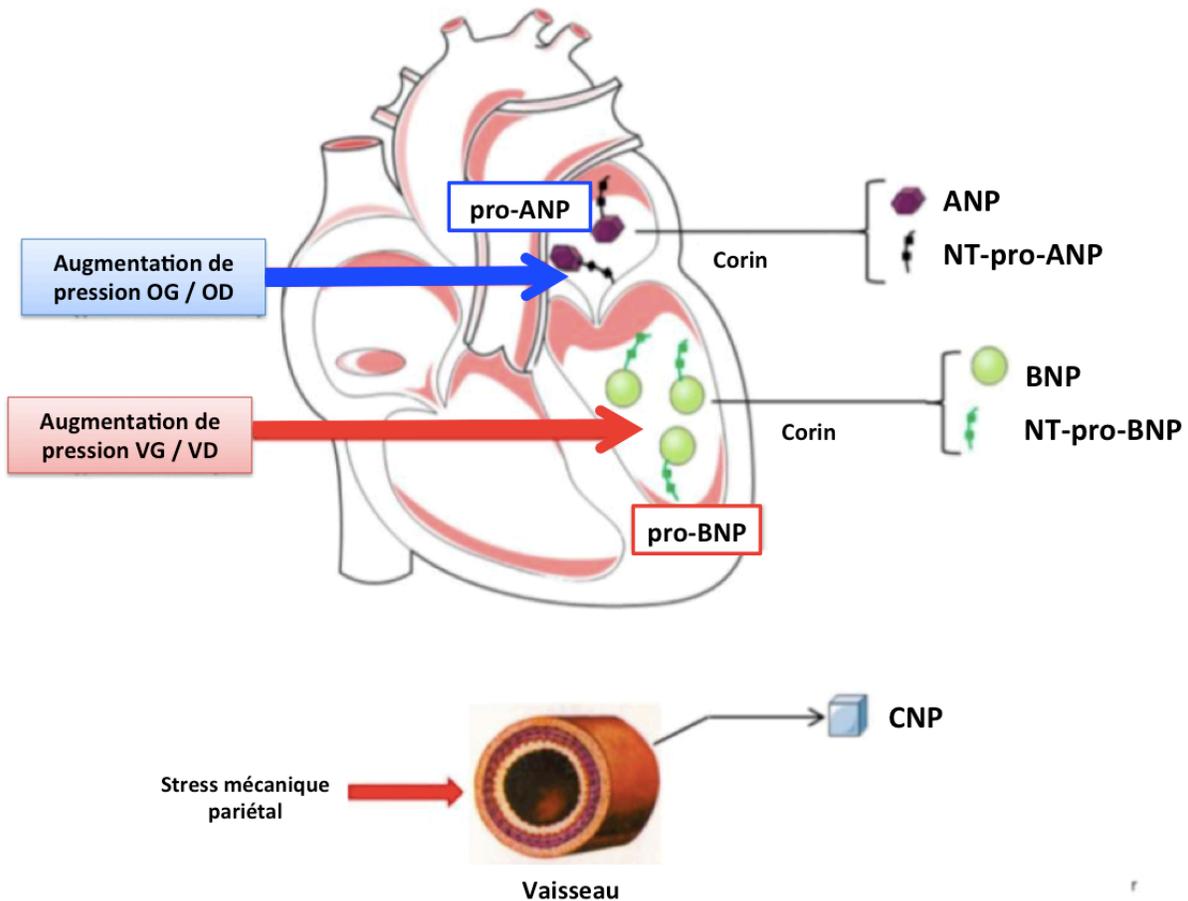
Historiquement elle a été nommée BNP pour *Brain Natriuretic Peptide* car elle a été découverte dans le cerveau de porc<sup>(29)</sup>. Cette hormone est synthétisée sous forme de pré-proBNP, secondairement clivé en proBNP. Ce précurseur de 108 acides aminés est clivé entre l'Arginine 76 et la Serine 77 par les protéases transmembranaires corine ou furine en deux fragments : le BNP1-32 qui est le peptide ayant une action hormonale et le NTproBNP1-76 (N-terminal pro-BNP, forme inactive) de façon équimolaire. Ce clivage se produit lors du relargage extracellulaire. Dans l'IC chronique, il a été montré qu'une quantité importante, voire majoritaire, de proBNP est directement relarguée par les cardiomyocytes. Ceci est lié à un processus posttranscriptionnel de O-glycosylation du proBNP, au niveau de la Thréonine 71. Dans les conditions d'insuffisance cardiaque aiguë, ce processus de glycosylation diminue expliquant un relargage accru de BNP bioactif dans cette situation

Même si le proBNP n'est pas synthétisé de façon constitutive chez le sujet sain, les concentrations plasmatiques de BNP et de NT-proBNP augmentent physiologiquement avec l'âge avec comme explication possible la rigidité artérielle et une dysfonction cardiaque diastolique asymptomatique, ainsi que la diminution de la fonction rénale. Par ailleurs, pour une même tranche d'âge, ces concentrations sont plus élevées chez la femme. De plus, elles augmentent significativement lorsqu'apparaît une distension ventriculaire et/ou auriculaire cardiaque, notamment en cas de décompensation aiguë d'IC.

Enfin, la concentration plasmatique de BNP et de NT-proBNP varie également avec l'index de masse corporelle, selon une étude réalisée à partir de la cohorte de *Framingham* avec une mise en évidence de concentration plasmatique significativement inférieure chez des sujets obèses par rapport à une population témoin<sup>(30)</sup>. Le mécanisme évoqué pour expliquer ce phénomène pourrait être la forte expression dans le tissu adipeux du NPR-C<sup>(31)</sup>.

Contrairement au BNP, le proANP puis l'ANP sont synthétisés de façon constitutive avec stockage dans des granules intramyocytaires. C'est à nouveau l'étirement des myocytes qui induit une dégranulation et libération d'ANP dans la circulation, permettant une action biologique immédiate. L'augmentation de la synthèse de proBNP nécessite quelques heures.

Il existe une troisième hormone, le **CNP** mais sa concentration plasmatique est très faible<sup>(14)</sup>. Le **CNP** sécrété majoritairement par l'endothélium vasculaire et à un moindre degré par le cerveau, est produit en réponse à une mise en tension mécanique pariétale au niveau des vaisseaux<sup>(32)</sup> (**Figure 5**).



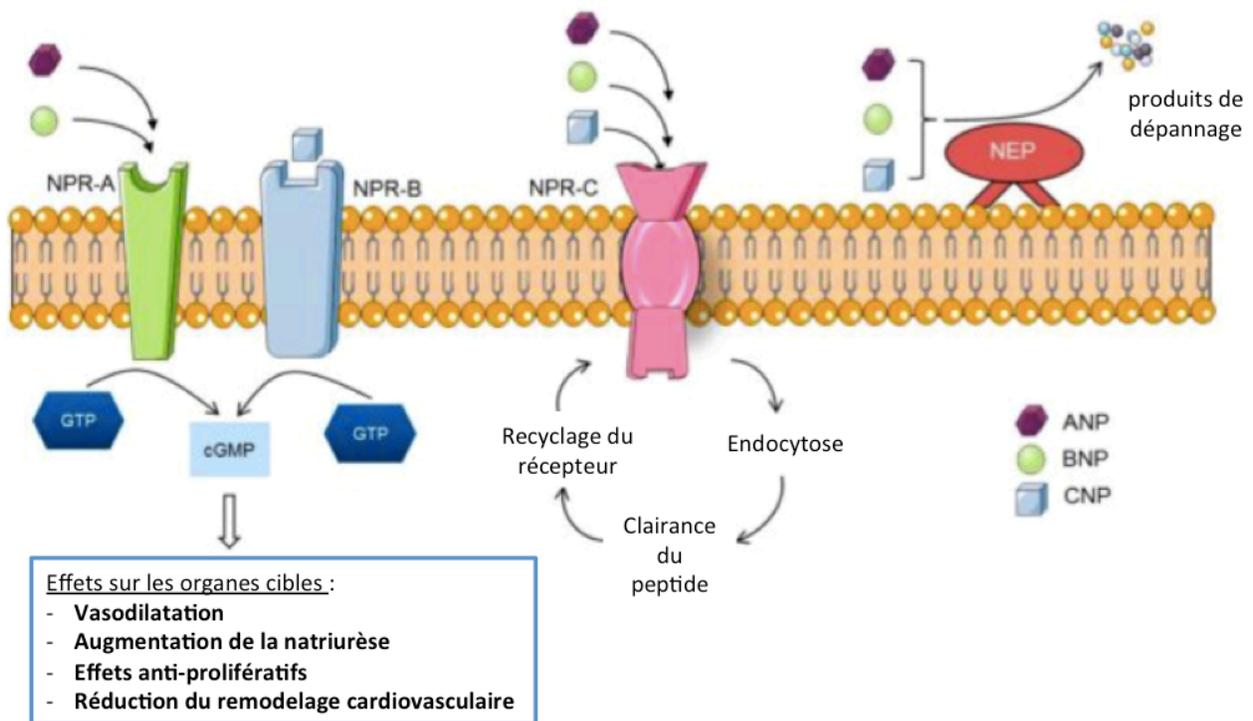
**Figure 5 : Stimuli et zones de synthèse des peptides natriurétiques**

*adapté de Singh JSS et al.<sup>(33)</sup>*

*ANP : atrial natriuretic peptide ; BNP : brain natriuretic peptide ; CNP : peptide natriurétique de type C ; OG : oreillette gauche ; OD : oreillette droite ; VG : ventricule gauche ; VD : ventricule droit ;*

### **3-2) Mécanisme d'action physiologique des peptides natriurétiques**

L'ANP et le BNP exercent leur action physiologique en se fixant sur leur récepteur : les récepteurs NP de type A (NPR-A) et les récepteurs NP de type (NPR-B). Ces deux récepteurs sont couplés à une guanylate cyclase particulière, qui s'active lorsque les PN se fixent à leur récepteur. Une fois cette dernière protéine activée, la concentration de GMP cyclique (GMPc) intracellulaire augmente (**Figure 6**).

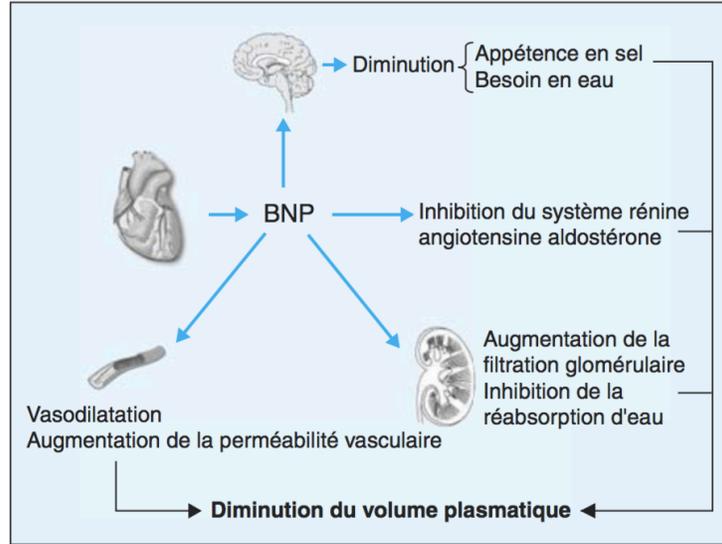


**Figure 6 : Schéma du mécanisme d'action des peptides natriurétiques**

*adapté de Singh JSS et al.<sup>(33)</sup>*

*ANP : atrial natriuretic peptide ; BNP : brain natriuretic peptide , cGMP : guanosine monophosphate cyclique ; GTP : guanosine triphosphate ; NEP : neprilysine ; NPR-A / NPR-B: récepteurs responsables de l'activité biologique (type A et B) ; NPR-C : récepteurs responsables de la clairance des peptides natriurétiques .*

Finalement, l'augmentation du taux de GMPc aboutit par différents médiateurs à une vasodilatation, une augmentation de la diurèse et de la natriurèse, une inhibition du SRAA et à une réduction de l'activation du système sympathique. Par ailleurs, il a été décrit un effet anti-prolifératif et anti-hypertrophique sur le tissu myocardique<sup>(25)</sup>. En somme, le BNP et l'ANP par l'intermédiaire du GMPc ont une action cardioprotectrice<sup>(27,34,35)</sup> (**Figure 7**).



**Figure 7 : Effets endocrines du BNP**  
d'après B. Cauliez et al.<sup>(28)</sup>.

### 3-3) Intérêts diagnostique et pronostique du dosage sanguin des peptides natriurétiques

En cas de dysfonction cardiaque, la concentration plasmatique de BNP augmente de façon plus importante que celle de l'ANP et, ceci, de façon proportionnelle à la distension des ventricules<sup>(36)</sup>. C'est pourquoi en pratique courante, BNP et le NT-proBNP sont utilisés comme biomarqueurs de l'IC, à visées diagnostique, pronostique et de suivi, grâce notamment à la possibilité de mesure fiable par des techniques d'immuno-dosage automatisées avec un rendu de résultat dans un délai compatible avec l'urgence<sup>(28)</sup> (**Figure 8**).

BNP (ng/L)	< 45 ans	45-54 ans	55-64 ans	65-74 ans	> 75 ans
Homme	24	39	72	63	78
Femme	47	72	81	95	179
NT-proBNP (ng/L)	< 50 ans		50-65 ans		
Homme	84		194		
Femme	155		222		

**Figure 8 : Valeurs usuelles (97,5<sup>e</sup> percentile) du BNP (trousse Biosite<sup>®</sup>)<sup>(37)</sup> et du NT-proBNP (trousse Roche<sup>®</sup>)<sup>(38)</sup> en fonction de l'âge et du sexe**

### 3-4) La résistance au BNP

A l'état physiologique et en dehors de toutes cardiopathies, le système natriurétique *via* la synthèse de BNP permet une adaptation efficace au stress cardiaque. Par exemple, si une personne sans cardiopathie sous-jacente augmente ses apports hydro-sodés lors d'un repas, le système natriurétique permet de garder un équilibre hémodynamique sans entraîner de décompensation cardiaque<sup>(25,34,35)</sup>.

Chez le patient IC chronique, ce système ne suffit plus à maintenir un équilibre hémodynamique satisfaisant pour le cœur. La concentration sérique de BNP peut être alors augmentée à l'état basal, en dehors de toute décompensation aiguë, alors que le patient garde une congestion clinique témoignant d'une rétention hydro-sodée chronique. Pour expliquer cette inefficacité du BNP, il a été décrit un phénomène de résistance aux PN avec plusieurs mécanismes évoqués<sup>(33)</sup>. A l'état d'IC chronique, il a été montré que l'angiotensine II pouvait atténuer l'effet de l'ANP et du BNP<sup>(39)</sup>. Aussi, l'action des PN *via* la voie de signalisation cellulaire du GMPc peut être défaillante chez le patient IC chronique, avec des taux de GMPc plus faibles. L'ancienneté de l'IC –et non la gravité– serait associée à des taux de GMPc plus faibles<sup>(40)</sup>. Il s'agit là du phénomène de « *down-regulation* » de la voie intracellulaire des PN, avec une désensibilisation de leur récepteur<sup>(41,42)</sup>. Aussi, certaines études suggèrent un dysfonctionnement de la corine chez les patients en IC avancée<sup>(43,44)</sup>. Le BNP et l'ANP restent alors sous forme de proBNP et proANP, peptides inactifs. En somme, il est supposé que la concentration de BNP chez le patient IC chronique doit s'élever à un niveau d'autant plus haut que la cardiopathie est sévère et ancienne pour avoir un effet bénéfique<sup>(33,43-45)</sup>.

### 3-5) Rôle thérapeutique des peptides natriurétiques

L'effet protecteur du BNP sur le système cardiovasculaire est étudié depuis plus d'une vingtaine d'années<sup>(25,35)</sup>. Il y a deux façons de moduler les taux de PN : soit l'injection ou absorption de PN recombinants ou d'agonistes des récepteurs aux PN, soit de ralentir ou de diminuer leur dégradation.

Les effets cliniques de l'administration intraveineuse (forme non absorbable per os) de BNP recombinant dans l'IC ont été étudiés. Il s'agit notamment de l'étude **ASCEND-HF**<sup>(25)</sup> qui évalue la Nesiritide comme BNP recombinant à visée thérapeutique dans l'IC aiguë. Les résultats

sur la mortalité et les bénéfices cliniques n'étaient pas significativement meilleurs que les thérapies classiques par Furosémide<sup>(46,47)</sup>. On retrouve aussi dans la littérature des études sur la potentialisation de l'effet thérapeutique de l'ANP *via* le Candoxatril. L'intérêt diurétique du Candoxatril n'était pas significativement supérieur par rapport à un traitement diurétique par Furosémide<sup>(48)</sup>. Des PN absorbables per os ou injectables par voie sous-cutanée sont à l'étude.

### **L'inhibition de sa dégradation peut se faire essentiellement en bloquant la NEP.**

L'étude **IMPRESS** s'intéresse pour la première fois à l'inhibiteur de la NEP dans la potentialisation des effets vasodilatateurs endogènes et l'inhibition des mécanismes de vasoconstriction et de réabsorption de sodium dans l'IC<sup>(49)</sup>. L'inhibiteur de la vasopeptidase bloque la dégradation des PN comme l'ANP ou le BNP ainsi que la dégradation de la bradykinine. Dans les études **OVERTURE** puis **OCTAVE** qui évaluait l'efficacité et la tolérance de l'Omapaprilat (combinaison d'un inhibiteur de NEP et d'enalapril) comparées à celles de l'enalapril (IEC), les auteurs mettent en évidence une non-infériorité de l'Omapaprilat par rapport aux IEC sur un critère composite comprenant mortalité toute cause et hospitalisation pour IC<sup>(50)</sup>. Cependant, la tolérance est mauvaise avec un risque relatif d'angio-œdème augmenté de 60% rendant l'utilisation de cette molécule trop dangereuse<sup>(50)</sup>. Cette augmentation de fréquence des angio-œdèmes s'explique notamment par l'augmentation du taux de bradykinine puisque sa dégradation est inhibée à la fois par l'inhibiteur de NEP et l'IEC. Une conclusion de cet échec est que les inhibiteurs de NEP doivent être associés à un ARA2 plutôt qu'à IEC pour éviter ce risque d'augmentation excessive des taux de bradykinine.

## 4. THERAPEUTIQUES ACTUELLES DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE

La prise en charge de l'IC a bien évolué au cours de ces dernières années. Cette évolution de la thérapeutique a permis d'augmenter considérablement l'espérance de vie des patients IC tout en diminuant leur symptomatologie. Néanmoins, le taux de mortalité et de morbidité en rapport avec cette pathologie reste trop élevé<sup>(1)</sup>. Cette prise en charge de l'IC à FEVG réduite est maintenant bien codifiée et continue d'évoluer. Il faut préciser que les thérapies réduisant la morbi-mortalité dans l'IC ont prouvé leur bénéfice uniquement chez des patients présentant une IC à FEVG réduite.

Les **recommandations de l'ESC de 2016** mettent à jour la prise en charge des patients IC avec une FEVG réduite<sup>(4)</sup>. Actuellement, pour les patients porteurs d'IC chronique avec FEVG < 35% et présentant des symptômes d'IC, il est recommandé d'introduire un traitement par  $\beta$ -bloquant et IEC ou ARA2. Ces molécules doivent faire l'objet d'une titration avec augmentation progressive de la dose par paliers de quinze jours jusqu'à atteindre la dose maximale tolérée. Dans les suites, si le patient reste symptomatique avec une FEVG < 35 %, il est recommandé d'introduire un traitement par anti-aldostérone.

Si, malgré ces trois molécules prescrites à dose maximale tolérée pendant une durée d'au moins trois mois, le patient garde une FEVG < 35 %, la pose d'un défibrillateur automatique implantable (DAI) est à proposer afin de prévenir le risque de mort subite sur trouble du rythme ventriculaire plus fréquent chez ces patients<sup>(4)</sup>.

De plus, si malgré cette trithérapie le patient présente toujours des signes cliniques d'IC, les recommandations proposent au clinicien trois possibilités pouvant se combiner entre elles<sup>(4)</sup> :

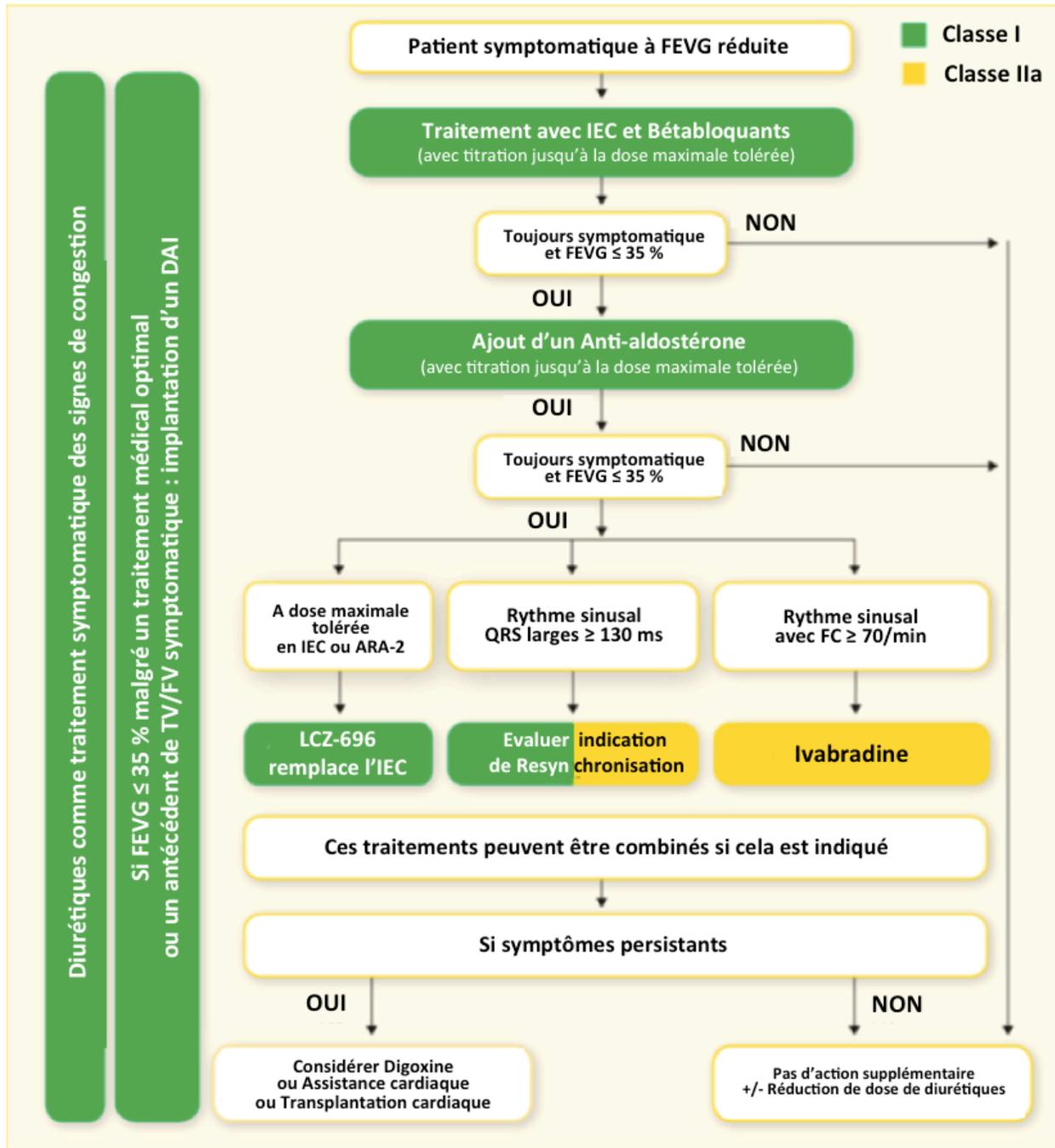
- remplacement de l'IEC ou de l'ARA2 par un inhibiteur de la NEP associé à un ARA2 grâce à l'association sacubitril / valsartan
- introduction d'ivabradine si le patient présente un rythme cardiaque sinusal supérieur à 70 bpm
- implantation d'un DAI triple chambre pour resynchronisation cardiaque en cas de bloc de branche gauche > 130 ms ou de bloc de branche droit > 150 ms.

Enfin, si les symptômes d'IC persistent, que le patient présente toujours une FEVG < 35 % et que sa pathologie est déséquilibrée, des traitements plus invasifs sont à considérer. Il s'agit de la

transplantation cardiaque ou de la pose d'une assistance cardiaque (mono-ventriculaire gauche ou bi-ventriculaire).

Il est noté que les traitements par diurétiques de l'anse et/ou thiazidiques ne sont indiqués qu'en cas de symptômes congestifs.

Une synthèse de l'algorithme de prise en charge des patients présentant une IC chronique à FEVG réduite est résumée sur la **Figure 9**.



**Figure 9 : Algorithme des traitements de l'insuffisance cardiaque à FEVG réduite, adapté des recommandations ESC 2016<sup>(4)</sup>**

*ARA2 : antagoniste du récepteur de l'angiotensine ; DAI : défibrillateur automatique implantable ; FC : fréquence cardiaque ; FV : fibrillation ventriculaire ; FEVG : fraction d'éjection ventriculaire gauche ; IEC : inhibiteur de l'enzyme de conversion ; LCZ696 : inhibiteur de l'angiotensine et de la néprilysine avec association de sacubitril / valsartan ; TV : tachycardie ventriculaire*

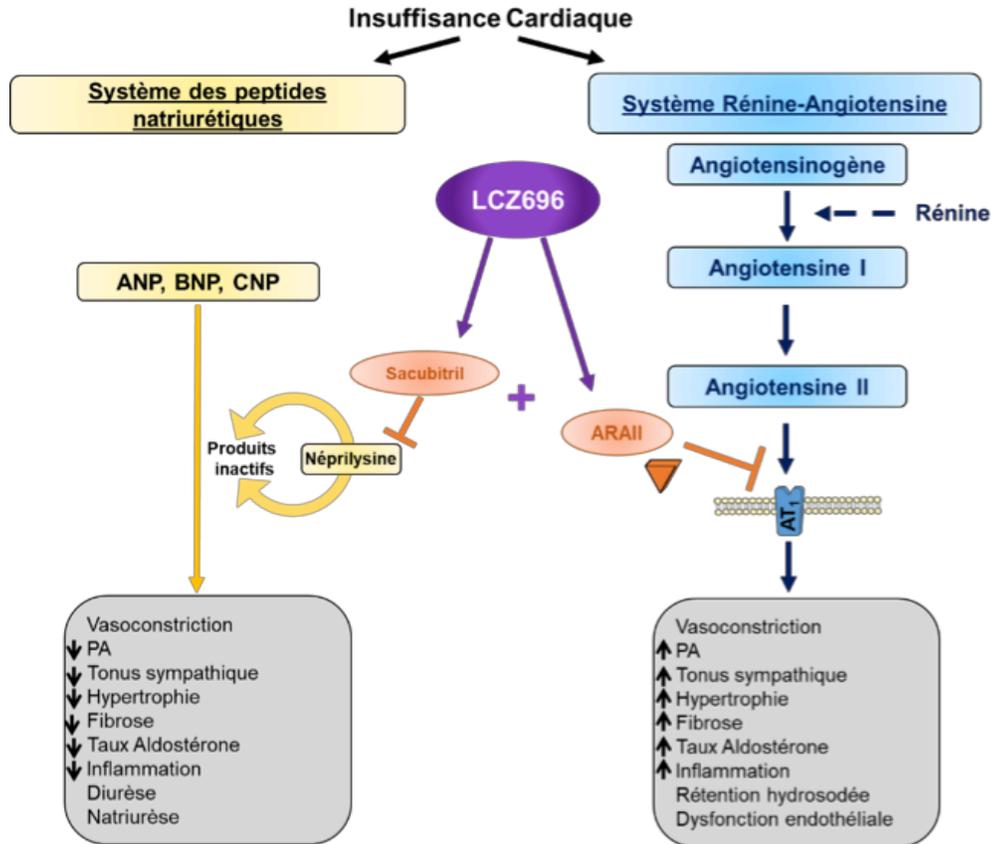
## 5. L'INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DE LA NÉPRILYSINE

### 5-1) Le rôle physiologique de la néprilysine (NEP)

La NEP est présente dans de nombreux tissus. Sa concentration maximale se situe dans le rein, au niveau du tube proximal. Cette enzyme est responsable de la dégradation des PNs comme le BNP et l'ANP. Elle dégrade aussi de nombreux autres peptides vasoactifs aux effets contradictoires, comme l'angiotensine, l'endothéline, l'adrénomédulline, la bradykinine et la substance P<sup>(51)</sup>. L'inhibition de la NEP peut donc potentialiser l'effet bénéfique du BNP et de la bradykinine en diminuant la dégradation de ces deux peptides mais avec d'un autre côté l'effet inverse via l'angiotensine, ce qui impose d'emblée de combiner tout inhibiteur de NEP à un bloqueur du SRA. L'inhibition de cette enzyme apparaît donc comme une piste thérapeutique d'intérêt dans l'insuffisance cardiaque chronique à FEVG réduite<sup>(52)</sup>.

### 5-2) Etude PARADIGM

L'étude **PARADIGM HF** (*Angiotensin–Neprilysin Inhibition versus Enalapril in Heart Failure*) étudie le LCZ696 correspondant à l'association sacubitril/valsartan<sup>(53)</sup> chez les patients IC chroniques<sup>(54)</sup>. Il s'agit d'un médicament associant deux molécules : le valsartan (ARA2) et le sacubitril (inhibiteur du récepteur de la NEP). Il présente un double effet : blocage du système rénine angiotensine aldostérone et inhibition de la dégradation de la NEP<sup>(55)</sup>.



**Figure 10 : Représentation du mode d'action du sacubitril/valsartan sur le système cardio-vasculaire**

*adapté de Singh JSS et al.<sup>(33)</sup>*

*ANP : atrial natriuretic peptide; BNP : brain natriuretic peptide; CNP : C-type natriuretic peptide; LCZ 696 : sacubitril / valsartan (nom prototype) ; PA : pression artérielle.*

L'étude PARADIGM HF a été réalisée entre 2009 et 2012. Il s'agit d'une étude de supériorité, randomisée en double aveugle, multicentrique internationale, comparant un traitement par sacubitril/valsartan à un traitement par IEC. Le design est particulier puisque cette étude comprend une période dite de tolérance en simple aveugle. L'IEC étudié est l'énalapril à la posologie de 10 mg deux fois par jour versus le LCZ 200 mg deux fois par jour. Au total, 10521 patients ont été inclus. Ils présentaient un stade NYHA  $\geq 2$ , une FEVG  $< 35\%$  et un BNP ou NT-pro-BNP augmentés.

Pour être inclus, les patients devaient être traités au préalable depuis au moins un mois par un traitement par  $\beta$ -bloquant et IEC ou ARA2 à dose stable. Les critères d'exclusion de cette étude étaient : hypotension artérielle symptomatique, insuffisance rénale avec une clairance de la

créatininémie > 30 ml/min/m<sup>2</sup>, l'augmentation de 25% de la créatininémie durant la phase de tolérance, une hyperkaliémie > 5,5 mmol/l, une contre-indication aux IEC ou aux ARA2.

Le critère de jugement principal était composite comprenant la survenue d'un décès cardiovasculaire ou d'une hospitalisation pour IC. Les critères d'évaluation secondaires étaient la durée de survie, la durée avant un nouvel épisode de fibrillation atriale (FA), la durée avant un premier épisode d'insuffisance rénale aiguë.

L'étude a dû être arrêtée prématurément en raison d'un bénéfice significatif chez les patients recevant le LCZ696. Au 27<sup>ème</sup> mois de suivi, on retrouvait une différence significative du critère composite (survenue d'un décès cardiovasculaire ou d'une hospitalisation pour IC) en faveur du groupe LCZ696 : 914 patients (21,8%) versus 1117 patients (26,5%) (hazard ratio dans le groupe LCZ696 0,80 ; IC 95% [0,78-0,87]; p< 0,001).

Par ailleurs, 711 patients (17,0%) sont décédés dans le groupe LCZ696 versus 835 (19,8%) dans le groupe enalapril (hazard ratio pour toutes causes de décès 0,84 ; IC 95% [0,76-0,93]; p<0,001). Sur le plan de la tolérance, on retrouvait d'avantage d'hypotension et d'angio-œdème non mortel dans le groupe LCZ696, alors que le taux d'insuffisance rénale aiguë et d'hyperkaliémie était plus important dans le groupe Enalapril.

L'étude PARADIGM permet donc de conclure à la supériorité de l'association sacubitril/valsartan par rapport à l'enalapril avec diminution des réhospitalisations pour décompensation cardiaque et diminution de la mortalité. Suite à cette étude, l'association sacubitril/valsartan est apparue dans les recommandations de l'ESC<sup>(4)</sup>, chez les patients déjà traités par IEC mais présentant une symptomatologie d'IC persistante.

### 5-3) Limites de l'étude PARADIGM

L'étude PARADIGM présente un **biais de sélection** évident lié à la première phase de tolérance<sup>(56)</sup>. En effet, les patients qui présentaient des effets secondaires précoces étaient exclus de l'étude. Au total, 1102 patients ont été exclus dont plus de la moitié (591 patients) pour cause de mauvaise tolérance (essentiellement hypotension artérielle symptomatique) au traitement IEC ou LCZ696.

De plus, dans l'étude PARADIGM, l'introduction du sacubitril/valsartan était réalisée uniquement en **ambulatoire**, c'est à dire chez des patients non hospitalisés. Ainsi, l'autorisation

de mise sur le marché (AMM) autorise pour le moment l'introduction du sacubitril/valsartan uniquement chez des patients ambulatoires.

Enfin, nous pouvons discuter la dose d'enalapril utilisée dans l'étude PARADIGM, qui pouvait être considérée comme modeste par rapport à une dose plus classique de 20 mg deux fois par jour.

#### **5-4) Effets secondaires et risques potentiels associés au sacubitril/valsartan<sup>(57)</sup>.**

Les effets indésirables associés au sacubitril/valsartan ainsi que les mesures de précaution à prendre sont résumés dans la **Figure 11**.

##### ***Hépatotoxicité***

Les principes actifs du sacubitril/valsartan sont faiblement métabolisés par le foie, ce qui nous laisse à penser que le sacubitril/valsartan induit une faible toxicité sur le foie. De plus, les études réalisées sur des animaux ainsi que les essais cliniques n'ont pas démontré d'hépatotoxicité.

##### ***Interactions médicamenteuses avec les statines***

Le sacubitril/valsartan semble accroître les concentrations sanguines des statines, en interagissant avec des transporteurs impliqués dans leur métabolisme. Il convient donc de prendre les mesures de précaution nécessaires, en cas de prise simultanée et à long terme des deux médicaments.

##### ***Toxicité néonatale ou infantile lors de l'exposition durant l'allaitement***

Démontrées par des études animales, la croissance et la durée de vie des nouveau-nés d'animaux sont affectées lorsque la génitrice reçoit l'une ou l'autre des substances actives du sacubitril/valsartan.

##### ***Atteinte cognitive***

Les patients âgés atteints d'IC chronique développent souvent une diminution de leurs fonctions cognitives. Un dysfonctionnement cognitif est possible avec le sacubitril/valsartan mais aucune étude n'a permis de le mettre en évidence pour le moment.

### **Population pédiatrique**

Les patients âgés de moins de 18 ans n'ont été examinés dans aucune étude clinique du sacubitril/valsartan, faute de quoi, son utilisation par cette tranche d'âge n'est pas recommandée actuellement.

### **Patients ayant une insuffisance rénale sévère**

Peu de données existent chez les patients insuffisants cardiaques avec un dysfonctionnement rénal sévère. Des précautions sont donc à prendre en cas d'introduction du sacubitril/valsartan en explorant périodiquement la fonction rénale.

### **Patients ayant une insuffisance hépatique sévère**

Les patients atteints d'insuffisance hépatique sévère de classe C du score Child-Pugh, de cirrhose biliaire, ou de cholestase n'ont pas été inclus dans les études évaluant sacubitril/valsartan et son utilisation par ces patients n'est pas recommandée par manque d'information.

<b>Effet indésirable</b>	<b>Fréquence</b>	<b>Mesures de prévention</b>
<b>Hypotension</b>	Un sur 10 patients traités par Entresto® a manifesté des symptômes d'une baisse de la pression sanguine.	Un ajustement de la médication concomitante et le traitement des autres causes y compris une baisse de la volémie sont suggérés en première intention, si persistance de l'hypotension, penser à réduire la dose d'Entresto® ou à suspendre le traitement momentanément.
<b>Dysfonctionnement rénal</b>	L'administration d'Entresto® à long terme a été associée à une altération du travail des reins, plus d'un patient sur 10 y sont touchés.	<ul style="list-style-type: none"><li>- Réduction des doses en cas de baisse considérable du fonctionnement des reins.</li><li>- Contre-indication chez les patients atteints d'IR sévère (DFG <math>\leq</math> 10ml/min).</li><li>- Contre-indication chez les diabétiques ou les patients atteints d'IR modérée à sévère en association avec l'aliskiren.</li></ul>
<b>Hyperkaliémie</b>	Une augmentation des taux sanguins de K <sup>+</sup> est observée chez plus de 10% des patients traités par Entresto®.	<ul style="list-style-type: none"><li>- Les médicaments connus pour leurs effets hyperkaliémiant sont à utiliser avec précaution en association à Entresto®.</li><li>- En cas d'hyperkaliémie, un ajustement de la médication concomitante est à mettre en place en même temps qu'une réduction de l'apport alimentaire de K<sup>+</sup>, une réduction des doses d'Entresto® peut aussi s'opérer pour une courte période.</li><li>- Une surveillance régulière de la kaliémie s'impose surtout chez les patients insuffisants rénaux, diabétiques ou qui sont sous régime hyperkaliémiant.</li></ul>

<p><b>Angioœdème</b></p>	<p>Entresto® peut être responsable de réactions d'hypersensibilité traduites par un œdème du visage, des lèvres, de la langue et de la gorge.</p> <p>Ces réactions observées chez un patient sur 100 peuvent conduire au décès du malade en cas d'œdème de la trachée non rapidement intervenu.</p> <p>La population noire semble plus susceptible de développer des angioœdèmes lors d'un traitement par Entresto®.</p>	<p>L'association d'Entresto® avec un IEC est formellement contre indiquée et un arrêt de 36h est exigé en cas de passage d'un IEC à Entresto® pour éviter un risque accru d'angioœdème.</p> <p>Entresto® ne doit pas être prescrit chez les patients avec antécédent d'angioœdèmes relatif à une prise d'IEC ou d'ARAI.</p> <p>Entresto® est utilisé avec précaution chez les patients avec historique d'angioœdème.</p> <p>Le traitement doit être définitivement arrêté en cas d'épisodes d'angioœdèmes et les patients immédiatement traités.</p>
<p><b>Toxicité Fœto-embryonnaire.</b></p>	<p>Des études effectuées sur les animaux ont montré un fort pouvoir fœtotoxique d'Entresto®. Elles ont rapporté l'implication du valsartan, un des principes actifs d'Entresto® dans la toxicité fœtale décelée chez des femmes enceintes.</p>	<p>Entresto® est contre indiqué en cas de grossesse et doit être arrêté le plus tôt possible après une récente découverte de gestation.</p> <p>En cas de possibilité de gravidité chez les femmes prenant Entresto®, des mesures efficaces de contraception doivent être mise en route qui durera jusqu'à une semaine après arrêt de traitement.</p>

**Figure 11 : Principaux risques de survenue d'effets secondaires liés au Sacubitril/Valsartan<sup>(57)</sup>.**

### 5-5) Etude PIONEER-HF

Comme nous venons de le voir, l'AMM du sacubitril/valsartan est aujourd'hui limitée aux patients ambulatoires, autrement dit à distance de toute décompensation cardiaque.

Or, l'étude PIONEER-HF a montré récemment une bonne sécurité à l'introduction du sacubitril/valsartan chez des patients hospitalisés<sup>(58)</sup>, avec un traitement débuté en moyenne 68 heures après l'admission avec une persistance des signes congestifs chez 95% des patients.

Cette étude de 881 patients avec insuffisance cardiaque à FEVG < 40% hospitalisés pour décompensation cardiaque aiguë étaient randomisés après stabilisation hémodynamique pour recevoir sacubitril-valsartan (dose cible : 97/103 mg deux fois/j) ou enalapril (dose cible : 10 mg

x2/j), avec en critère de jugement principal la réduction du NT-proBNP à 4 et 8 semaines de l'introduction. La réduction du NT-proBNP était plus importante sous sacubitril-valsartan que sous enalapril (réduction de -46,7% vs. -25,3%, soit -29%;  $p < 0,001$ ), et surtout sans risque surajouté en termes d'effet secondaire (fonction rénale, hyperkaliémie, hypotension, angioedème ;  $p = \text{NS}$ ).

### 5-6) Etudes en vie réelle

A l'heure actuelle, peu d'études décrivent les modalités d'introduction du sacubitril/valsartan en vie réelle.

On retrouve dans la littérature une **cohorte polonaise rétrospective**<sup>(59)</sup> décrivant l'efficacité de l'introduction du traitement sur une cohorte de 28 patients en vie réelle. Le sacubitril/valsartan était introduit au dosage le plus faible (24/26mg 2 fois par jour) pour tous les patients. A 3 mois de suivi, une baisse significative du stade de la NYHA est retrouvée, et 25% des patients ont présenté une hypotension significative. Seulement 3 patients (2%) avaient un dosage augmenté à 49/51mg 2 fois par jour à 3 mois de suivi, sans qu'il n'y ait de raison clairement décrite pour l'absence d'augmentation de la posologie.

Une **cohorte italienne**<sup>(60)</sup> décrit un échantillon de 8 patients insuffisants cardiaques chez lesquels un traitement par sacubitril/valsartan est introduit. Ces patients sont qualifiés d'IC « sévères » du fait de l'existence d'un choc cardiogénique dans les trois dernières années. A 6 mois d'introduction du sacubitril/valsartan, on retrouve une diminution du stade NYHA associé à une augmentation de la créatininémie. Cependant, cette étude présente un effectif trop peu important pour évaluer l'impact en vie réelle du sacubitril/valsartan.

Avec l'**étude TITRATION**, Michele Senni, *et al.* étudie la tolérance du sacubitril/valsartan selon sa modalité de titration en double aveugle chez 498 patients IC randomisés<sup>(49)</sup>. Les patients sont séparés en deux groupes : un groupe « titration accélérée » atteignant la dose maximale (97/103 mg) en 3 semaines, et un autre groupe « titration classique » atteignant la dose maximale en 6 semaines. A 6 semaines, il n'y avait pas de différence significative du taux d'hypotension orthostatique (9.7% *versus* 8.4%), d'insuffisance rénale aiguë (7.3% *versus* 7.6%) ou d'hyperkaliémie (7.7% *versus* 4.4%). Il n'a pas été observé d'angio-œdème dans les deux groupes. Cependant, dans cette étude le suivi est relativement court (6 semaines) et le mode d'introduction (ambulatoire *versus* hospitalisation) n'est pas étudié.

L'**étude PARASAIL** est une étude canadienne prospective, en ouvert étudiant l'efficacité et la tolérance du sacubitril/valsartan chez 302 patients présentant une IC à FEVG réduite après 12 mois de traitement<sup>(62)</sup>. Cette étude est toujours en cours et donc ses résultats ne sont pas encore disponibles.

Deux autres **études canadiennes**<sup>(63,64)</sup> retrouvent une amélioration de la FEVG échographique après introduction d'un traitement par sacubitril/valsartan, chez des patients présentant une IC à FEVG réduite. La première étude est prospective, en ouvert, et étudie la FEVG avant et après l'introduction en ambulatoire du traitement chez 60 patients. A un an de suivi, la FEVG s'améliore significativement de 27,3% à 37,5% ( $p < 0,001$ )<sup>(64)</sup>. La seconde étude est rétrospective et étudie la FEVG avant et après l'introduction ambulatoire du traitement chez 43 patients. Sur une période de 2 ans, on observe une augmentation significative de la FEVG de 9 % ( $p < 0,001$ )<sup>(63)</sup>.

L'objectif de notre étude était d'explorer au sein d'une cohorte prospective de patients atteints d'IC chronique à FEVG réduite, les effets du sacubitril/valsartan sur l'activité de la NEP, le métabolisme des PNs dans l'IC chronique et de fournir des informations supplémentaires sur le mode d'action du médicament.

### **5-7) Etude PARAGON-HF**

Enfin, il est important d'évoquer l'**étude PARAGON-HF** (*NCT01920711*), toute dernière étude randomisée évaluant le sacubitril/valsartan chez les patients avec IC à FEVG préservée, dont les résultats, non encore connus, seront présentés par l'équipe canadienne de Stuart Connolly le 1<sup>er</sup> septembre 2019 au congrès de l'ESC 2019 à Paris.

Cette étude est-elle sur le point de révolutionner notre prise en charge de l'IC à FEVG préservée ? En effet, cette dernière reste le dernier grand bastion à conquérir dans le domaine de l'IC, représentant plus de 50 % des patients IC avec une prévalence en constante augmentation. Et pourtant, contrairement à l'IC à FEVG réduite, il n'existe aucun traitement efficace chez ces patients au regard des nombreux essais randomisés tous négatifs.

Ainsi, PARAGON-HF est l'une des études les plus attendues du congrès de l'ESC 2019 testant l'efficacité du sacubitril/valsartan 200 mg x 2/j versus valsartan 160 mg en termes de mortalité cardiovasculaire et de réhospitalisation pour IC chez des patients avec IC à FEVG préservée.

## Partie 2 : ARTICLE MEDICAL SCIENTIFIQUE

Publication de l'article dans l'*European Journal of Heart Failure* (2018)



European Journal of Heart Failure (2018)  
doi:10.1002/ejhf.1342

RESEARCH ARTICLE

# Effects of sacubitril/valsartan on neprilysin targets and the metabolism of natriuretic peptides in chronic heart failure: a mechanistic clinical study

Hélène Nougué<sup>1,2†</sup>, Théo Pezel<sup>1,3†</sup>, François Picard<sup>4</sup>, Malha Sadoune<sup>1</sup>,  
Mattia Arrigo<sup>5</sup>, Florence Beauvais<sup>3</sup>, Jean-Marie Launay<sup>1,6,7</sup>, Alain Cohen-Solal<sup>1,3,8‡</sup>,  
Nicolas Vodovar<sup>1\*‡</sup>, and Damien Logeart<sup>1,3,8\*‡</sup>

<sup>1</sup>Inserm UMR-S 942, Lariboisière Hospital, Paris, France; <sup>2</sup>Department of Anaesthesiology and Intensive Care, Saint-Louis and Lariboisière Hospital, Paris, France; <sup>3</sup>Department of Cardiology, Lariboisière Hospital, Paris, France; <sup>4</sup>Heart Failure Unit, Haut-Lévêque Hospital, Pessac, France; <sup>5</sup>Department of Cardiology, University Heart Center, University Hospital Zurich, Zurich, Switzerland; <sup>6</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; <sup>7</sup>Centre for Biological Resources BB-0033-00064, Lariboisière Hospital, Paris, France; and <sup>8</sup>Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

Received 26 June 2018; revised 10 September 2018; accepted 29 September 2018

<b>Aim</b>	This study aimed at evaluating the effects of sacubitril/valsartan on neprilysin (NEP), and the metabolism of natriuretic peptides in heart failure (HF) and providing additional mechanistic information on the mode of action of the drug.
<b>Methods and results</b>	We enrolled 73 chronic HF patients who were switched from angiotensin-converting enzyme inhibitor or angiotensin receptor blocker to sacubitril/valsartan. In addition to clinical and echocardiographic assessment, plasma biomarkers were measured at baseline, day 30 and day 90 after initiation of treatment. Sacubitril/valsartan led to decrease in New York Heart Association class and improvement of echocardiographic parameters, as well as a dose-dependent decrease in soluble NEP (sNEP) activity, while sNEP concentration remained unchanged. Neprilysin inhibition translated into an increase in its substrates such as atrial natriuretic peptide (ANP), substance P, and glucagon-like peptide 1, the latter translating into a decrease in fructosamine. Cardiac troponin and soluble ST2 levels, biomarkers of HF severity unrelated to NEP metabolism also decreased. While there was a ~4-fold increase in ANP, we observed no change in plasma brain natriuretic peptide (BNP) and plasma BNP activity, and a mild decrease in N-terminal proBNP (NT-proBNP) concentrations. Finally, we found a progressive increase in the relationship between BNP and NT-proBNP, which strongly correlated with an increase in T71 proBNP glycosylation ( $R^2 = 0.94$ ).
<b>Conclusion</b>	Sacubitril/valsartan rapidly and strongly reduced sNEP activity, leading to an increase in levels of NEP substrates. These data suggest a pleiotropic favourable impact of sacubitril/valsartan on the metabolism of HF patients with ANP rather than BNP as major effectors amongst natriuretic peptides.
<b>Keywords</b>	Sacubitril/valsartan • Neprilysin • Atrial natriuretic peptide • Brain natriuretic peptideNP • Heart failure with reduced ejection fraction

\*Corresponding authors. Inserm UMR-S 942, Paris, France. Tel: +33 1 53216790, Fax: +33 1 53216739, Email: nicolas.vodovar@inserm.fr; Tel: +33 1 49958674, Fax: +33 1 49958439. Email: damien.logeart@aphp.fr

†These authors equally contributed to this work.

‡These authors share senior authorship.

## Introduction

The combined inhibition of the angiotensin receptor and the neprilysin (NEP) pathways was recently shown to be a significant improvement in the treatment of patients with chronic heart failure (HF) with reduced ejection fraction (HFrEF).<sup>1</sup> In the PARADIGM-HF trial, sacubitril/valsartan was found to be superior to the angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEi) enalapril for the treatment of HFrEF, improving symptoms and reducing mortality and hospitalization by ~20%.<sup>1</sup>

NEP is a ubiquitous membrane protease that also exists as circulating form (sNEP), which originates in part from the heart in chronic HF patients.<sup>2</sup> NEP inactivates via degradation over 40 peptides with antagonistic functions, of which numerous are vasoactive.<sup>3,4</sup> In most animal species, NEP inactivates the A-type, B-type and C-type natriuretic peptides (ANP and BNP, and CNP),<sup>5</sup> the potentiation of their beneficial effects being the rationale for the use of NEP inhibitors in HFrEF.<sup>6</sup>

An ancillary study from PARADIGM-HF showed that in patients receiving sacubitril/valsartan, BNP concentrations moderately increased throughout the treatment compared to the baseline and the group receiving enalapril. Conversely, N-terminal proBNP (NT-proBNP) concentrations decreased in patients receiving sacubitril/valsartan while remaining stable in patients receiving enalapril.<sup>7</sup> This discrepant behaviour of BNP and NT-proBNP plasma concentrations was attributed to the protection of BNP from NEP degradation by sacubitril, NT-proBNP being unaffected since not being a NEP substrate.<sup>7</sup>

This hypothesis is however challenged by earlier data showing that human BNP is a very poor NEP substrate,<sup>5,8</sup> and proBNP glycosylation, which affects proBNP processing into NT-proBNP and BNP,<sup>9</sup> could be responsible for the discrepant behaviour of BNP and NT-proBNP under treatment with sacubitril/valsartan.<sup>10</sup> Furthermore, we previously showed that high plasma BNP concentrations (>916 pg/mL) act as an endogenous NEP inhibitor,<sup>11</sup> which may question the efficacy of sacubitril/valsartan in patients with high BNP concentrations. Finally, a recent study has shown that sacubitril/valsartan improved glucose management in diabetic patients,<sup>12</sup> probably in part due to an increase in glucagon-like peptide 1 (GLP-1),<sup>13</sup> which stimulates insulin secretion in response to glucose increase.

The aims of this study were to explore in a cohort of HFrEF patients who were switched from ACEi or angiotensin receptor blocker (ARB) to sacubitril/valsartan (i) the changes in sNEP activity and concentration, NEP substrates, A-type and B-type natriuretic peptides and other cardiovascular biomarkers under treatment with sacubitril/valsartan; (ii) the differences in BNP and NT-proBNP changes under treatment with sacubitril/valsartan and explore the role of proBNP glycosylation on these differences, (iii) the impact of BNP-mediated NEP inhibition on the treatment with sacubitril/valsartan, and (iv) a potential role of cardiovascular biomarkers to predict or reflect clinical or echocardiographic response to treatment with sacubitril/valsartan.

## Methods

This study was performed according to the current revision of the Helsinki Declaration and registered at clinicaltrials.gov under the NCT01374880 identifier.

### Study design

The study population consisted of all consecutive HFrEF patients who were switched from ACEi or ARB to sacubitril/valsartan according to the current European Society of Cardiology guidelines,<sup>14</sup> between December 2015 and June 2017 in the outpatient HF clinics of the Lariboisière University Hospital (Paris, France) and the Bordeaux University Hospital (Bordeaux, France). Patients for which plasma samples were not available or sacubitril/valsartan was interrupted were excluded from the analysis.

The starting dose of sacubitril/valsartan was chosen according to the guidelines and up-titration was left to the discretion of the cardiologist based on tolerance and clinical status. Clinical parameters and New York Heart Association (NYHA) functional class were evaluated at baseline – i.e. before the initiation of treatment, 1 month (D30), 3 months (D90), and 6 months (D180) after the start of treatment. Comprehensive echocardiographic analysis was performed at baseline and D180, including measurement of left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular outflow tract-velocity time integral (LVOT-VTI), left atrial volume index (LAVI), the ratio between the transmitral E wave velocity and the mean velocity of septal and lateral mitral annulus (E/e' ratio), the pressure gradient between right ventricle and right atrium, calculated by measurement of the peak velocity of tricuspid regurgitation (RV/RA pressure gradient). In each centre, echocardiographic recordings were analysed by a single physician, who was blinded to treatment. The clinical or echocardiographic response to treatment was defined as at least improvement in NYHA class, a relative increase in LVEF or LVOT-VTI  $\geq 10\%$ , or a relative decrease in LAVI, E/e' ratio, or RV-RA gradient pressure  $\geq 10\%$  between D0 and D180.

### Plasma sampling and biomarker quantification

Plasma samples were collected at baseline, D30, and D90 for all patients. Venous blood samples were collected in tubes containing EDTA. Blood samples were immediately centrifuged at 3500 rpm for 15 min at 4  C, frozen and stored at –80  C until further use. BNP and high-sensitive cardiac troponin I (hsTnI) plasma concentrations were measured on an Abbott Architect system on an Architect i2000 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). NT-proBNP and fructosamine were measured on a Roche Cobas analyzer (Roche, Basel, Switzerland). proBNP glycosylation, bioactive ANP (ANP<sub>1-28</sub>), and bioactive adrenomedullin (ADM<sub>1-52</sub>) were measured by MS/MS as previously described<sup>15</sup> (online supplementary *Methods S1*). NEP (EC 3.4.24.11) concentration and activity,<sup>11</sup> substance P,<sup>11</sup> and the active amidated form of GLP-1<sup>13,16</sup> concentrations were measured as previously described. NEP activity was assayed after adding ZnCl<sub>2</sub> to a final concentration of 10 mM to counteract EDTA. NEP concentration measurements were validated by mass spectrometry (online supplementary *Methods S1* and supplementary *Figure S1*). Soluble ST2 (sST2) was measured with the Presage ST2 ELISA (Critical Diagnostics, San Diego, CA, USA). Soluble CD146 (sCD146) concentrations were determined by ELISA (CY-QUANT ELISA sCD146  , Biocytex).

Analytical parameters for the assays used in this study are listed in the online supplementary Table S1.

## Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the R-statistical software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; <http://www.r-project.org>). Continuous variables are expressed as median (interquartile range), and categorical variables are expressed as number or frequency (%) as appropriate. Longitudinal data were analysed using repeated measures ANOVA followed by Tukey honestly significant differences test on log-transformed values. The dose effect was assessed by one-way ANOVA followed by pairwise *t*-test on log-transformed values; *P*-values were corrected using the Holm's method. Correlation between variables was evaluated using Spearman's rank correlation ( $\rho$ ) or by fitted linear model ( $R^2$ ), as appropriate. Categorical data were analysed using the Fisher's exact test; multiple comparisons were corrected using the Holm's method. A two-sided *P*-value <0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Study population

A total of 95 consecutive HFREF patients were switched from ACEi or ARB to sacubitril/valsartan during the study period. In 17 patients, plasma samples were not available and were excluded from further analysis. In five patients, sacubitril/valsartan was interrupted during the 6-month follow-up, mostly because of hypotension, and were also excluded from further analysis. No patient was hospitalized because of acute HF or died.

The study population consisted of 73 patients (Bordeaux,  $n = 17$  and Lariboisière, Paris,  $n = 56$ ) for whom clinical, echocardiographic parameters and all plasma samples were available. Of note, blood samples at D7 ( $n = 45$ ), D14 ( $n = 50$ ), and D180 ( $n = 36$ ) after the initiation of treatment were available in a subset of patients.

Baseline characteristics are summarized in Table 1. Briefly, patients were prevalently middle-aged men with a median LVEF of 29%, and in NYHA functional class II and III. The daily doses of sacubitril/valsartan at D30 were 24/26 mg bid 8%, 49/51 mg bid 49%, and 97/103 mg bid 43%. At D90 the sacubitril/valsartan doses were 24/26 mg bid 1%, 49/51 mg bid 29%, and 97/103 mg bid 70%.

### Changes in soluble neprilysin activity and substrates under treatment with sacubitril/valsartan

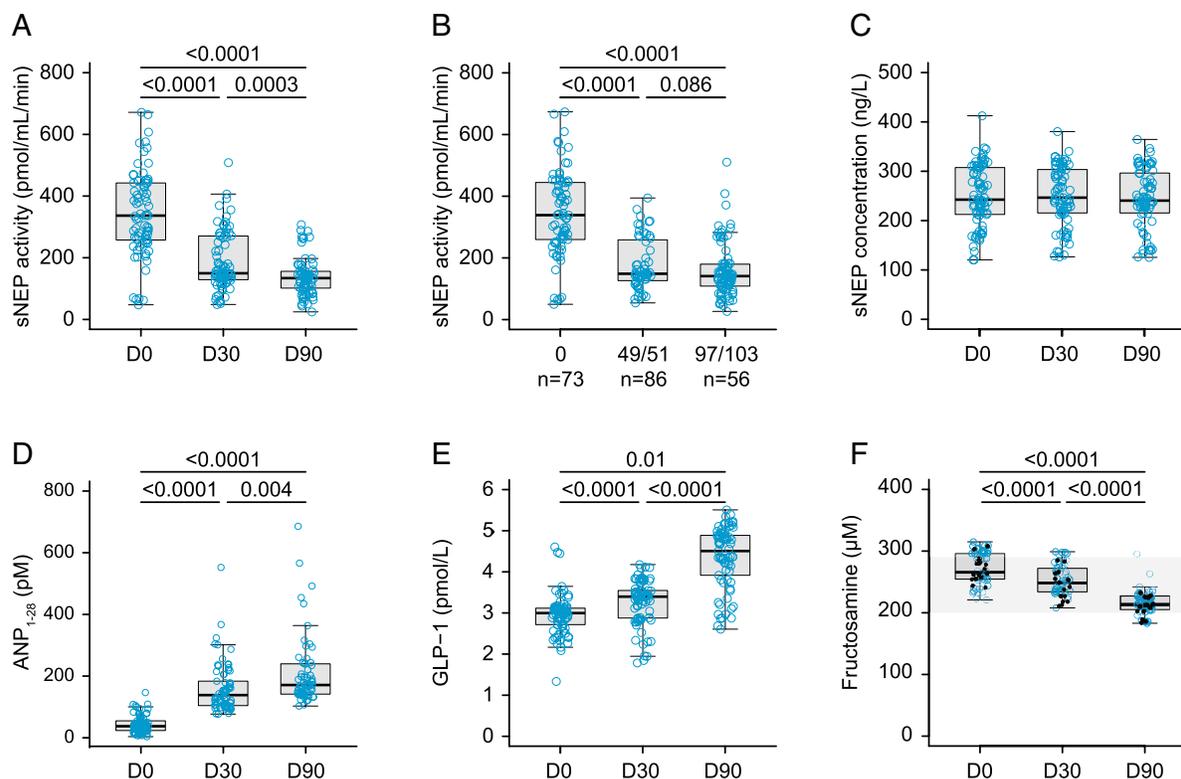
Compared to baseline, the introduction of sacubitril/valsartan was associated with a decrease in sNEP activity at D30 and D90 (Figure 1A). Of note, five patients with shallow baseline sNEP activity (<210 pmol/mL/min) had baseline BNP values >916 pg/mL. Compared to baseline, the decrease in sNEP activity was already marked at a sacubitril/valsartan dose of 49/51 mg bid, with only a trend toward a further reduction at a dose of 97/103 mg bid (Figure 1B). In contrast, sNEP concentration remained unchanged throughout the study ( $P = 0.67$ ) (Figure 1C and online supplementary Figure S2A). The decrease in sNEP

**Table 1** Baseline characteristics of the study population ( $n = 73$ )

Patient characteristics	
Age (years)	65 [56–72]
Male sex	61 (84%)
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	25.1 [23.0–28.0]
Diabetes	16 (22%)
Atrial fibrillation	25 (34%)
Ischaemic heart disease	40 (55%)
Last decompensation (months)	6 [3–25]
Systolic blood pressure (mmHg)	114 [102–125]
Diastolic blood pressure (mmHg)	67 [60–77]
eGFR (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	62 [48–84]
NYHA classification	
I	2 (3%)
II	36 (49%)
III	33 (45%)
IV	2 (3%)
Medication	
Furosemide	62 (85%)
ACEi or ARB	72 (98%)
Beta-blocker	68 (73%)
MRA	58 (73%)
Plasma biomarkers	
Creatinine ( $\mu$ mol/L)	103 [87–124]
BNP (ng/L)	370 [193–702]
NT-proBNP (ng/L)	1201 [571–1997]
hsTnI (ng/L)	14.3 [9.4–20.7]
sNEP activity (pmol/mL/min)	340 [254–445]
sNEP concentration (pg/mL)	241 [205–303]
ANP <sub>1-28</sub> (pM)	37.4 [23.5–55.0]
GLP-1 (pmol/L)	3.0 [2.6–3.1]
Substance P (ng/L)	36 [27–44]
Fructosamine ( $\mu$ M)	265 [255–296]
sST2 (ng/mL)	27.3 [21.3–38.4]
sCD146 (ng/mL)	403 [317–560]

Variables are expressed as *n* (%) or median [interquartile range], as appropriate. ACEi, angiotensin-converting enzyme inhibitor; ANP, atrial natriuretic peptide; ARB, angiotensin receptor blocker; BNP, brain natriuretic peptide; eGFR, estimated glomerular filtration rate; GLP-1, glucagon-like peptide 1; hsTnI, high-sensitive troponin I; MRA, mineralocorticoid receptor antagonist; NT-proBNP, N-terminal pro brain natriuretic peptide; NYHA, New York Heart Association; sCD146, soluble cluster of differentiation 146; sNEP, soluble neprilysin; sST2, soluble form of the IL-33 receptor.

activity under treatment translated into a marked increase in NEP substrates ANP<sub>1-28</sub> (Figure 1D), substance P (online supplementary Figure S3A), adrenomedullin (online supplementary Figure S3B) and GLP-1 (Figure 1E). The increase in GLP-1 was associated with a gradual decrease in fructosamine (Figure 1F), a biomarker of protein glycation with faster turnover than glycated haemoglobin. Fructosamine and GLP-1 plasma concentrations inversely correlated ( $\rho = -0.47$ ,  $P < 0.0001$ ). Notably, at D90, fructosamine decreased into the normal range (200–285  $\mu$ M) in all patients, including those with diabetes mellitus ( $n = 16$ , 22%). Of note, GLP-1 concentrations were incrementally higher as sacubitril/valsartan doses increased (online supplementary Figure S2B), while ANP<sub>1-28</sub> and substance P only increased at a dose of 49/51 mg bid compared to baseline, with no further



**Figure 1** Plasma activity of soluble neprilysin (sNEP) at baseline (D0), D30, D90 (A) and according to doses (mg bid) of sacubitril/valsartan (B). Plasma concentration of sNEP (C), active amidated glucagon-like peptide 1 (GLP-1) (D), atrial natriuretic peptide (ANP) (E), and fructosamine (F) at D0, D30, D90. The grey area refers to the normal range of fructosamine (200–285  $\mu\text{M}$ ).

increase at higher sacubitril/valsartan dose (online supplementary Figure S2C and S2D).

## Changes in natriuretic peptides under treatment with sacubitril/valsartan

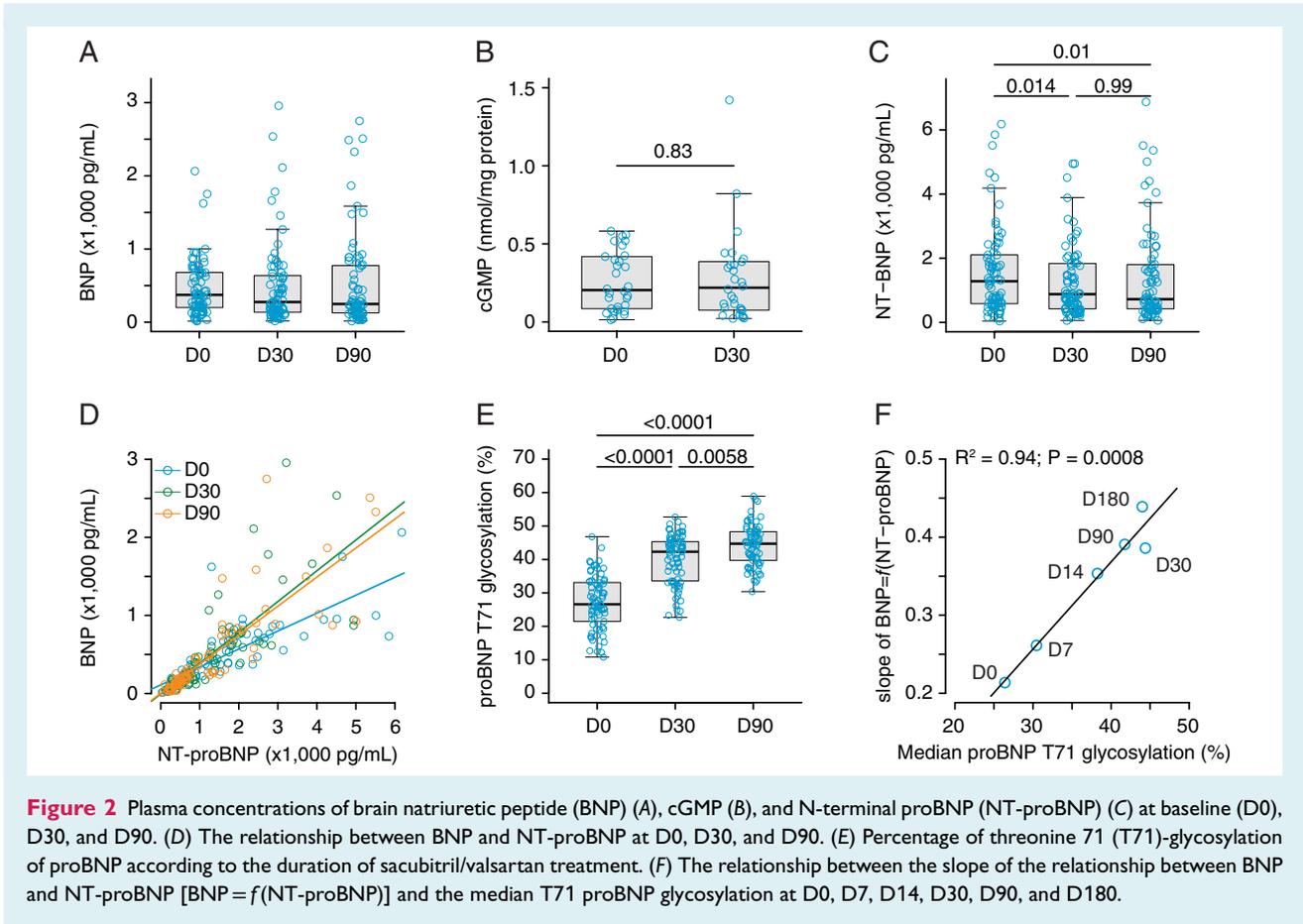
Under therapy with sacubitril/valsartan, we observed no difference in BNP plasma concentrations compared to baseline (Figure 2A,  $P=0.11$ ). Since the BNP assay measures predominantly proBNP, we sought to evaluate whether NEP inhibition was associated with an increase in BNP signalling. To this end, we assayed cGMP production after exposing HEK293 cells stably transfected with natriuretic peptide receptor-A (NPRA) with the plasma of 30 patients at D0 and D30. We did not observe any change in BNP-mediated NPRA signalling (Figure 2B); there was no variation in BNP plasma levels between these two time-points for these patients ( $P=0.5$ ). In contrast, there was a decrease in NT-proBNP concentrations at D30, which persisted up to D90 (Figure 2C). This translated into significant changes in the slope of the relationship between BNP and NT-proBNP concentrations, suggesting changes in the processing of proBNP (Figure 2D). Under treatment, we further observed a continuous increase in threonine 71 (T71) proBNP glycosylation compared to baseline (Figure 2E). To assess the effect of T71 proBNP glycosylation on the processing of

proBNP, we plotted the slopes of the linear regression between BNP and NT-proBNP at each time-points (baseline, D7, D14, D30, D90, D180) against the median values of T71 proBNP glycosylation at the same time-points. We found a strong positive correlation ( $R^2=0.94$ ) suggesting that the different changes of BNP and NT-proBNP under treatment with sacubitril/valsartan result from changes in proBNP glycosylation (Figure 2F and online supplementary Figure S4). Finally, we found no dose-dependent change in neither BNP nor NT-proBNP, while the T71 proBNP glycosylation was higher at a dose of 49/51 mg bid compared to baseline with no further increase at higher doses (online supplementary Figure S2E–G).

Of note, in seven patients, baseline BNP was  $>916$  pg/mL. The temporal changes in sNEP activity and BNP plasma concentrations in these patients showed that six responded pharmacologically to treatment – i.e. sacubitril/valsartan inhibited sNEP activity (online supplementary Figure S5).

## Changes in other cardiovascular biomarkers under treatment with sacubitril/valsartan

Under treatment with sacubitril/valsartan, we observed a decrease in both hsTnI (Figure 3A) and sST2 (Figure 3B). Notably, while



the reduction in hsTnI occurred between D30 and D90, sST2 was already low at D30 and remained low afterward. While sST2 was independent of the dose of sacubitril/valsartan (online supplementary Figure S2H), there was a dose-dependent decrease in hsTnI (online supplementary Figure S2I). In contrast, soluble CD146, a vascular biomarker of systemic congestion in HF,<sup>17,18</sup> remained unchanged throughout the study ( $P = 0.35$ ) (Figure 3C and online supplementary Figure S2J).

### Association between cardiovascular biomarkers and clinical course under treatment

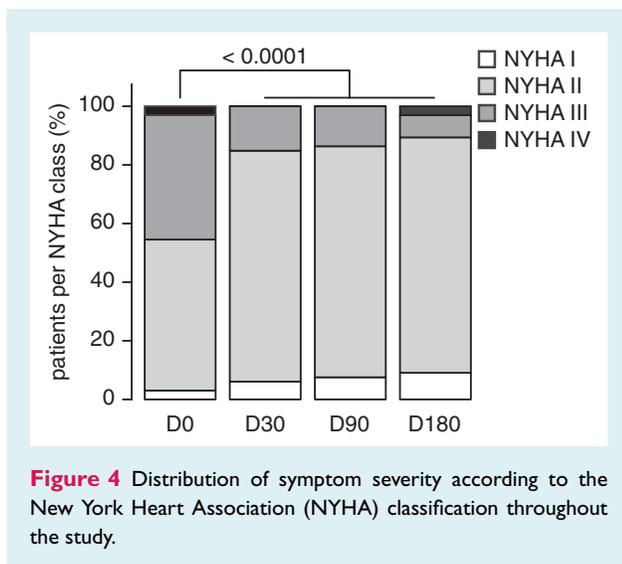
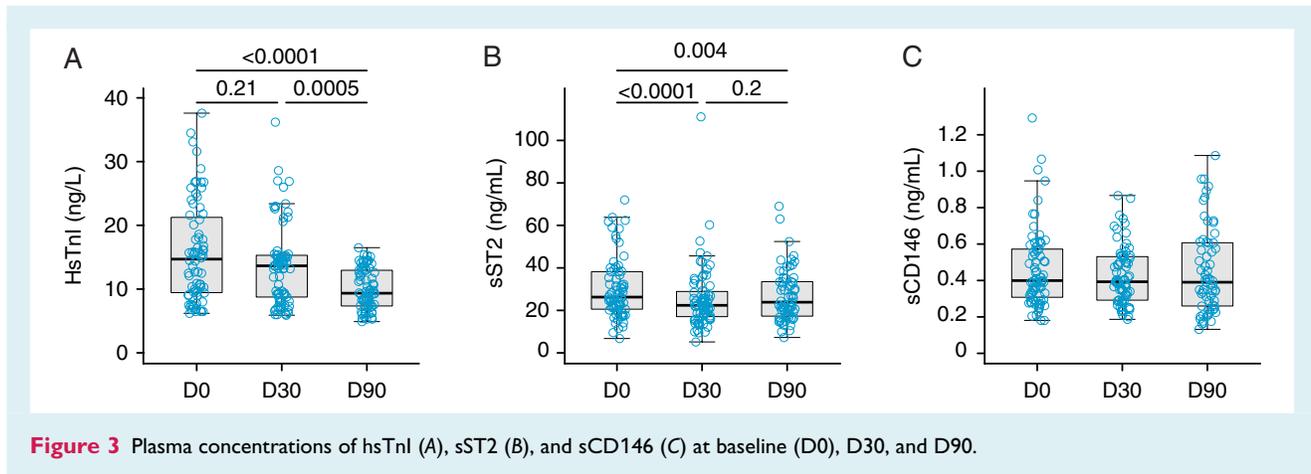
We next tested the ability of cardiovascular biomarkers at baseline or their change from baseline to D90 to predict or reflect a favourable clinical or echocardiographic response to treatment with sacubitril/valsartan. We observed an improvement in NYHA functional class at D30, with no further significant improvement at D90 and D180 (Figure 4). Of note, improvement based on NYHA class was observed as soon as D14 (online supplementary Figure S6). Echocardiography at D180 showed a significant yet small improvement in LVEF, LVOT-VTI, and RV/RA pressure gradient, a trend towards improvement of  $E/e'$ , but no modification of LAVI (Table 2).

Overall, most of the cardiovascular biomarkers tested did not predict or reflect favourable clinical course, although improvements in the echocardiographic measurement of left ventricular systolic function (LVEF and LVOT-VTI) and congestion (LAVI,  $E/e'$ , RV-RA pressure gradient) were associated with a decrease or a trend towards a reduction of either BNP and/or NT-proBNP (online supplementary Table S2).

### Discussion

The combined inhibition of the angiotensin receptor and the NEP pathway by sacubitril/valsartan has been shown to improve the outcome of patients with chronic HFrEF significantly, but the exact mechanisms involved are largely unknown. While the potentiation of natriuretic peptides was the rationale for pharmacological NEP inhibition,<sup>6</sup> the effects of the drug on sNEP activity, sNEP substrates, natriuretic peptides and other cardiovascular biomarkers are largely unexplored. This mechanistic clinical study provided new insights in this regard.

First, we confirmed that sacubitril/valsartan rapidly and strongly reduces sNEP activity and consequently profoundly affects NEP substrates in HFrEF patients. The activity of sNEP is already significantly reduced at the half dose of sacubitril/valsartan (49/51 mg bid), and only a trend towards a further reduction at a higher



dose was observed. This observation was paralleled by a trend towards an increase in ANP<sub>1-28</sub> and substance P between the half and full dose. These data suggest that most of the effect of sacubitril/valsartan is attained at half the dose while increasing the dose had fewer effects. Notably, sNEP concentrations remained unchanged throughout the study. We recently showed that after recovery of acute HF, NEP activity decreased while sNEP concentration increased.<sup>19</sup> While one may have anticipated a similar feedback of pharmacological NEP inhibition on sNEP concentration, the mechanism whereby sNEP is released in the bloodstream remains unknown and appears not to be affected by sacubitril/valsartan. Therefore, further studies are warranted to confirm the prognostic value of sNEP serum concentration<sup>20,21</sup> in patients treated with angiotensin receptor-NEP inhibitors (ARNi).

Second, we observed no significant change in plasma BNP concentration compared to baseline, while plasma NT-proBNP concentration slightly decreased during the first month and remained stable afterward, which is in line with previously published data.<sup>7</sup> Our data also support our previous hypothesis that

**Table 2** Changes in echocardiographic parameters between baseline and 6 months

Echocardiographic parameters	Baseline	6 months (D180)	P-value
LVEF (%)	29 [25–34]	30 [26.5–35]	< 0.0001
LAVI (mL/m <sup>2</sup> )	43 [35–60]	40.5 [32–51.75]	0.24
E/E'	10.6 [8.2–15.5]	10.2 [8.1–13.08]	0.07
LVOT-VTI (cm)	17 [14–20]	18.6 [15.7–21]	0.008
RV/RA pressure gradient (mmHg)	28 [24–37]	25 [21.5–29]	0.01

Variables are expressed as median [interquartile range].

LAVI, left atrial volume index; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVOT-VTI, left ventricular outflow tract-velocity time integral; RV-RA, right ventricular-right atrial.

an increase in proBNP glycosylation rather than protection of BNP from NEP degradation, is most likely responsible for this differential behaviour of BNP and NT-proBNP measurement under treatment with ARNi.<sup>10</sup> Since commercial assays for BNP strongly cross-react with proBNP unlike NT-proBNP assays<sup>22</sup> and proBNP glycosylation prevents the processing of proBNP into BNP and NT-proBNP,<sup>9</sup> an increase in proBNP glycosylation may not change measured BNP values, while NT-proBNP would decrease due to reduced processing.<sup>10</sup> It is therefore likely that discrepancies observed between BNP and NT-proBNP measurement are mostly related to qualitative rather than quantitative changes in proBNP. However, the mechanism whereby sacubitril/valsartan affect the glycosylation of proBNP remains unknown. Furthermore, while there was a ~4-fold increase in ANP after initiation of the treatment, NPRA-dependent production of cGMP by BNP did not vary between D0 and D30. These data suggest that increased urinary cGMP previously observed<sup>7</sup> results from the potentiation of ANP signalling rather than that of BNP. Therefore, amongst natriuretic peptides, the beneficial effects sacubitril/valsartan appear to be driven by ANP – and possibly CNP – rather than BNP as expected from previous studies.<sup>5,8</sup>

Third, in light of our previous findings showing that high plasma BNP (>916 pg/mL) inhibits sNEP activity, we questioned the rationale for the pharmacological NEP inhibition in patients with BNP higher than this threshold.<sup>11</sup> In this study, seven patients had baseline BNP > 916 pg/mL, among which six showed signs of pharmacological response to ARNi – possibly because BNP dropped down below the NEP inhibitory level during the study period, or their sNEP seemed to be insensitive to BNP inhibition (NEP activity >210 pmol/mL/min despite BNP > 916 pg/mL). Our mechanistic data are in agreement with results of PARADIGM-HF showing no interaction between the efficacy of sacubitril/valsartan and baseline peptide natriuretic levels,<sup>23</sup> and strongly suggest no limitation in prescribing sacubitril/valsartan in patients with BNP >916 pg/mL. Of note, in the patient whose BNP remained >916 pg/mL and NEP activity unchanged throughout the study, there was no apparent additive inhibitory effect of sacubitril, confirming BNP as a potent sNEP inhibitor.

Fourth, based on previous reports showing that sacubitril/valsartan improves glycaemic control,<sup>12</sup> we previously proposed a sacubitril/valsartan-mediated GLP-1 increase as a possible mechanism for this observation.<sup>13</sup> In the present study, we showed a time-dependent increase in GLP-1 that was associated with a decrease in protein glycation (fructosamine) in both diabetic and non-diabetic patients, confirming a rapid action of sacubitril/valsartan on glycaemic control. The moderate correlation between GLP-1 and fructosamine suggests the involvement of multiple mechanisms.<sup>24</sup>

Finally, we observed rapid clinical improvements based on NYHA functional class as early as 2 weeks after the initiation of treatment. Symptom improvement at 1 month was accompanied by a decrease in NT-proBNP and sST2 concentrations, as previously observed,<sup>7,25</sup> without later decrease. The significant reduction in troponin levels occurred more gradually throughout the study. Levels of soluble CD146 – a vascular biomarker of congestion – appeared poorly impacted, that could be explained by the lack of significant congestion in most of our patients at baseline. Further studies could help to specify the appropriate use of these biomarkers in the follow-up of HF patients under sacubitril/valsartan. Accordingly, a global improvement in echocardiographic parameters was seen at 6-month follow-up. However, neither baseline measurements of the tested biomarkers nor their change at 3 months could predict favourable clinical response at 6 months or correlation with clinical response, even though BNP and/or NT-proBNP were associated with an improvement of left ventricular function or parameters of congestion.

Our study has some limitations that need to be acknowledged. First, the study population is rather small and not randomized, which may limit the statistical performances, particularly regarding the lack of a strong relationship between changes in biomarkers and clinical improvement of patients. Nevertheless, we could show robust, highly significant changes in several markers, and the changes in NT-proBNP and hsTnl are consistent with previous observations.<sup>7</sup> Furthermore, the bicentric design reduces bias in sampling effects despite the lacking core lab for echocardiography. Second, the very early clinical effects (first dose) were not assessed.

Third, the up-titration of sacubitril/valsartan was left at the discretion of the cardiologist according to the tolerance and patient clinical status, and therefore it is not possible to precisely assess the relationship between dose and time. Finally, the open design and the lack of a control arm may have affected the assessment of the clinical response even though the study is longitudinal.

In conclusion, our data show that sacubitril/valsartan rapidly and strongly reduces sNEP activity, which resulted in an evident potentiation of ANP, contrasting with a moderate reduction in NT-proBNP and no change in plasma BNP most likely via the increase in proBNP glycosylation. We confirm that sacubitril/valsartan improves glucose metabolism in part via the rise in NEP substrate GLP-1. Regarding the large number of NEP substrates of which numerous can impact HF metabolism, our observations suggest a pleiotropic favourable impact of the drug on the course of HF patients and position ANP and possibly CNP rather than BNP as major effectors amongst natriuretic peptides.

## Supplementary Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

**Methods S1.** Supplementary methods.

**Figure S1.** (A) Comparison of soluble NEP plasma concentrations measured by the SEB785Hu ELISA kit from Uscn Life Science (irNEP) and mass spectrometry (MS). (B) Bland–Altman analysis of the two methods (ELISA and mass spectrometry).

**Figure S2.** Plasma concentrations of sNEP (A), GLP-1 (B), substance P (C), ANP1-28 (D), BNP (E), NT-proBNP (F), proBNP glycosylation (G), sST2 (H), hsTnl (I), and sCD146 (J) according to the doses bid.

**Figure S3.** Plasma concentrations of substance P at baseline, D30 and D90 (A), and bioactive adrenomedullin (ADM1-52) between D0 and D30 in a subset of 30 patients (B).

**Figure S4.** Linear regression model for the distribution of BNP plasma levels according to NT-proBNP plasma levels at baseline (D0), D7, D14, D30, D90, and D180. Indicated on the left are Spearman's coefficient of correlation, *P*-value and number of patients for each time-point.

**Figure S5.** Temporal changes in sNEP activity and BNP plasma concentrations at baseline (D0), D30, and D90 in individual patients whose baseline BNP was >916 pg/mL.

**Figure S6.** Distribution of symptom severity according to the New York Heart Association (NYHA) classification between baseline and D30 for 44 patients for whom NYHA data were available for the four time-points.

**Table S1.** Analytical parameters of the assays used in this study.

**Table S2.** Baseline values and 90-day variations of biomarkers in patients with clinical or echocardiographic response to treatment with sacubitril/valsartan.

## Acknowledgements

We thank the nurses from Departments of Cardiology, Anne Sophie Canu, Marie-Lise Bats and Valérie Pierre for their assistance.

## Funding

This work was financed by Inserm and research grants from the Fédération Française de Cardiologie. None of the funding organization did play a role in the design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; or preparation, review, or approval of the manuscript.

**Conflict of interest:** F.P. received honorarium and non-financial support from Novartis. M.A. received personal fees from Orion Pharma. F.B. received honorarium from Novartis. A.C.S. received grants, honorarium from Novartis, Servier, Vifor, and MSD, and non-financial support from Novartis, Servier, and Vifor. D.L. had received honorarium from Novartis and research grant from ALERE. The other authors report no conflict of interest.

## References

- McMurray JJ, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, Rouleau JL, Shi VC, Solomon SD, Swedberg K, Zile MR, PARADIGM-HF Investigators and Committees. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med* 2014;**371**:993–1004.
- Arrigo M, Vodovar N, Nougue H, Sadoune M, Pemberton CJ, Ballan P, Ludes PO, Gendron N, Carpentier A, Cholley B, Bizouarn P, Cohen-Solal A, Singh JP, Szymonifka J, Latremouille C, Samuel JL, Launay JM, Pottecher J, Richards AM, Truong QA, Smadja DM, Mebazaa A. The heart regulates the endocrine response to heart failure: cardiac contribution to circulating neprilysin. *Eur Heart J* 2018;**39**:1794–1798.
- Bayes-Genis A, Barallat J, Richards AM. A test in context: neprilysin: function, inhibition, and biomarker. *J Am Coll Cardiol* 2016;**68**:639–653.
- Campbell DJ. Long-term neprilysin inhibition – implications for ARNIs. *Nat Rev Cardiol* 2017;**14**:171–186.
- Kenny AJ, Bourne A, Ingram J. Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilatin, C-type natriuretic peptide and some C-receptor ligands by endopeptidase-24.11. *Biochem J* 1993;**291**(Pt 1):83–88.
- Mangiafico S, Costello-Boerrigter LC, Andersen IA, Cataliotti A, Burnett JC Jr. Neutral endopeptidase inhibition and the natriuretic peptide system: an evolving strategy in cardiovascular therapeutics. *Eur Heart J* 2013;**34**:886–893c.
- Packer M, McMurray JJ, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, Rouleau JL, Shi VC, Solomon SD, Swedberg K, Zile M, Andersen K, Arango JL, Arnold JM, Belohlavek J, Bohm M, Boytsov S, Burgess LJ, Cabrera W, Calvo C, Chen CH, Dukat A, Duarte YC, Erglis A, Fu M, Gomez E, Gonzalez-Medina A, Hagege AA, Huang J, Katova T, Kiatchoosakun S, Kim KS, Kozan O, Llamas EB, Martinez F, Merkely B, Mendoza I, Mosterd A, Negrusz-Kawecka M, Peuhkurinen K, Ramires FJ, Refsgaard J, Rosenthal A, Senni M, Sibulo AS Jr, Silva-Cardoso J, Squire IB, Starling RC, Teerlink JR, Vanhaecke J, Vinereanu D, Wong RC, PARADIGM-HF Investigators and Coordinators. Angiotensin receptor neprilysin inhibition compared with enalapril on the risk of clinical progression in surviving patients with heart failure. *Circulation* 2015;**131**:54–61.
- Lainchbury JG, Nicholls MG, Espiner EA, Ikram H, Yandle TG, Richards AM. Regional plasma levels of cardiac peptides and their response to acute neutral endopeptidase inhibition in man. *Clin Sci* 1998;**95**:547–555.
- Semenov AG, Postnikov AB, Tamm NN, Seferian KR, Karpova NS, Bloschitsyna MN, Koshkina EV, Krasnoselsky MI, Serebryanaya DV, Katrukha AG. Processing of pro-brain natriuretic peptide is suppressed by O-glycosylation in the region close to the cleavage site. *Clin Chem* 2009;**55**:489–498.
- Jaffe AS, Apple FS, Mebazaa A, Vodovar N. Unraveling N-terminal pro-B-type natriuretic peptide: another piece to a very complex puzzle in heart failure patients. *Clin Chem* 2015;**61**:1016–1018.
- Vodovar N, Seronde MF, Laribi S, Gayat E, Lassus J, Januzzi JL Jr, Boukef R, Nouira S, Manivet P, Samuel JL, Logeart D, Cohen-Solal A, Richards AM, Launay JM, Mebazaa A, Network G. Elevated plasma B-type natriuretic peptide concentrations directly inhibit circulating neprilysin activity in heart failure. *JACC Heart Fail* 2015;**3**:629–636.
- Seferovic JP, Claggett B, Seidelmann SB, Seely EW, Packer M, Zile MR, Rouleau JL, Swedberg K, Lefkowitz M, Shi VC, Desai AS, McMurray JJ, Solomon SD. Effect of sacubitril/valsartan versus enalapril on glycaemic control in patients with heart failure and diabetes: a post-hoc analysis from the PARADIGM-HF trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2017;**5**:333–340.
- Vodovar N, Nougue H, Launay JM, Solal AC, Logeart D. Sacubitril/valsartan in PARADIGM-HF. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2017;**5**:495–496.
- Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, Falk V, Gonzalez-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GM, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P. 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 J Heart Fail* 2016;**18**:891–975.
- Vodovar N, Seronde MF, Laribi S, Gayat E, Lassus J, Boukef R, Nouira S, Manivet P, Samuel JL, Logeart D, Ishihara S, Cohen Solal A, Januzzi JL Jr, Richards AM, Launay JM, Mebazaa A, GREAT Network. Post-translational modifications enhance NT-proBNP and BNP production in acute decompensated heart failure. *Eur Heart J* 2014;**35**:3434–3441.
- Orskov C, Rabenhøj L, Wettergren A, Kofod H, Holst JJ. Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes* 1994;**43**:535–539.
- Arrigo M, Truong QA, Onat D, Szymonifka J, Gayat E, Tolppanen H, Sadoune M, Demmer RT, Wong KY, Launay JM, Samuel JL, Cohen-Solal A, Januzzi JL Jr, Singh JP, Colombo PC, Mebazaa A. Soluble CD146 is a novel marker of systemic congestion in heart failure patients: an experimental mechanistic and transcardiac clinical study. *Clin Chem* 2017;**63**:386–393.
- Gayat E, Caillaud A, Laribi S, Mueller C, Sadoune M, Seronde MF, Maisel A, Bartunek J, Vanderheyden M, Desutter J, Dendale P, Thomas G, Tavares M, Cohen-Solal A, Samuel JL, Mebazaa A. Soluble CD146, a new endothelial biomarker of acutely decompensated heart failure. *Int J Cardiol* 2015;**199**:241–247.
- Arrigo M, Nougue H, Launay JM, Mebazaa A, Vodovar N. Plasma neprilysin concentration during recovery from acute illness. *Eur Heart J* 2018;**39**:3474–3475.
- Nunez J, Nunez E, Barallat J, Bodi V, Minana G, Pastor MC, Sanchis J, Lupon J, Bayes-Genis A. Serum neprilysin and recurrent admissions in patients with heart failure. *J Am Heart Assoc* 2017;**6**:e005712.
- Bayes-Genis A, Barallat J, Galan A, de Antonio M, Domingo M, Zamora E, Urrutia A, Lupon J. Soluble neprilysin is predictive of cardiovascular death and heart failure hospitalization in heart failure patients. *J Am Coll Cardiol* 2015;**65**:657–665.
- Luckenbill KN, Christenson RH, Jaffe AS, Mair J, Ordonez-Llanos J, Pagani F, Tate J, Wu AH, Ler R, Apple FS. Cross-reactivity of BNP, NT-proBNP, and proBNP in commercial BNP and NT-proBNP assays: preliminary observations from the IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage. *Clin Chem* 2008;**54**:619–621.
- Zile MR, Claggett BL, Prescott MF, McMurray JJ, Packer M, Rouleau JL, Swedberg K, Desai AS, Gong J, Shi VC, Solomon SD. Prognostic implications of changes in N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2016;**68**:2425–2436.
- Giamouzis G, Butler J. Glycaemic control in heart failure: a PARADIGM shift for patients with concomitant diabetes? *Lancet Diabetes Endocrinol* 2017;**5**:314–315.
- O'Meara E, Prescott MF, Claggett B, Rouleau JL, Chiang LM, Solomon SD, Packer M, McMurray JJV, Zile MR. Independent prognostic value of serum soluble ST2 measurements in patients with heart failure and a reduced ejection fraction in the PARADIGM-HF trial (Prospective comparison of ARNI with ACEI to determine impact on global mortality and morbidity in heart failure). *Circ Heart Fail* 2018;**11**:e004446.

## Informations supplémentaires (*supplementary data*)

(**Online Eur J Heart Fail. website** : <https://onlinelibrary-wiley-com.gate2.inist.fr/action/downloadSupplement?doi=10.1002%2Fejhf.1342&file=ejhf1342-sup-0001-AppendixS1.pdf>)



### Supplementary Materials

#### **Effects of sacubitril/valsartan on neprilysin and the metabolism of natriuretic peptides in chronic heart failure: a mechanistic clinical study**

Hélène Nougé<sup>1,2,†</sup>, Théo Pezel<sup>1,3,†</sup>, François Picard<sup>4</sup>, Malha Sadoune<sup>1</sup>, Mattia Arrigo<sup>5</sup>,  
Florence Beauvais<sup>3</sup>, Jean-Marie Launay<sup>1,6,7</sup>, Alain Cohen-Solal<sup>1,3,8,‡</sup>, Nicolas Vodovar<sup>1,‡,\*</sup>, and  
Damien Logeart<sup>1,3,8,‡,\*</sup>.

- Supplementary Materials
- Supplementary Figures 1-6
- Supplementary Tables 1 and 2

## Supplementary methods

### *Total amidated GLP-1 Measurement*

Plasma total amidated GLP-1 was measured by radioimmunoassay using iodinated GLP-1 ( $^{125}\text{I}$ -GLP1, Perkin Elmer – ref: NEX 308010UC) synthetic GLP-1<sub>7-36</sub> amide (Cayman Chemical – ref: 15069), and a rabbit polyclonal antibody directed against the amidated C-terminus of GLP-1<sub>7-36</sub> (Chemicon International/Merck Millipore – ref: AB3244)

### *Measurement of NEP, ADM and ANP1-28 by mass spectrometry*

Samples were lyophilized and stored at 4°C until use. Before analysis, lyophilized samples were resuspended in appropriate volumes of HPLC grade H<sub>2</sub>O to reach a protein concentration of 2 µg/µL. CE-MS analyses were performed using a P/ACEMDQ CE system (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) coupled online to a microTOF MS (Bruker Daltonic, Bremen, Germany). The ESI sprayer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was grounded, and the ion spray interface potential was set between –4 and –4.5 kV. Data acquisition and MS acquisition methods were automatically controlled by the CE via contact–close–relays.

Spectra were accumulated every 3 s, over a range of  $m/z$  350 to 3000. Samples from CE-MS were also analysed on a Dionex Ultimate 3000 RSLC nano-flow system (Dionex, Camberly, UK). The samples (5 µL) were loaded onto a Dionex 100 µm × 2 cm 5 µmC18 nano trap column at a flowrate of 5 µL/min by an Ultimate 3000 RS autosampler (Dionex). Loading solution comprised 0.1% formic acid and acetonitrile (98:2). Once loaded onto the trap column, sample was then washed off into an Acclaim PepMap C18 nano-column 75 µm × 15 cm, 2 µm 100 Å at a flow rate of 0.3 µL/min. The trap and nano-flow column were maintained at 35°C in a column oven in the Ultimate 3000 RSLC. Samples were eluted with a gradient of solvent A: 0.1% formic acid versus solvent B: acetonitrile starting at 5% B rising to 50% B over 100 min. The column was washed using 90% B before being equilibrated prior

to the next sample being loaded. The eluant from the column was directed to a Proxeon nano-spray ESI source (Thermo Fisher, Hemel, UK) operating in positive-ion mode then into an Orbitrap Velos FTMS. The ionization voltage was 2.5 kV and the capillary temperature was 200°C. The mass spectrometer was operated in MS–MS mode scanning from 380 to 2000 amu. The fragmentation method was HCD at 35% collision energy. The ions were selected for MS2 using a data-dependent method with a repeat count of 1 and repeat and exclusion times of 15 sec. Precursor ions with a charge state of 1 were rejected. The resolution of ions in MS1 was 60000 and 7500 for HCD MS2. Data files were searched using SEQUEST (by using Thermo Proteome Discoverer), without any enzyme specificity. No fixed modification was selected, and oxidation of methionine and proline were set as variable modifications. Mass error window of 10 ppm and 0.05 Da were allowed for MS and MS/MS, respectively. Peptide data were extracted using high peptide confidence and top one peptide rank filters. Validation of identified peptides was achieved by correlation between peptide charge at the working pH of 2 and CE-migration time. CE migration time deviations lower than  $\pm 2$  min corresponding to the CE-MS measurement were accepted.

The peptides used to quantify each target are listed below:

Target	Peptide	MW (Da)*	Position	Refseq <sup>†</sup>
Neprilysin	GIGMVGHEITHGFD	1581.79	606 - 620	NP_258428
ANP <sub>1-28</sub>	RIGAQSGLGCNS	1163.29	137 - 148 14 - 25 <sup>‡</sup>	NP_006163
ADM <sub>1-52</sub>	SKISPQGY	878.98	139 – 146 45 - 52 <sup>‡</sup>	NP_001115
ADM <sub>1-52</sub>	SFGCRFGTCTVQK	1433.67	107 - 119 13 - 25 <sup>‡</sup>	NP_001115

ANP<sub>1-28</sub>: bioactive A-type natriuretic peptide; ADM: bioactive adrenomedullin. \* Molecular weight in Dalton; † Accession number of the reference sequence at NCBI Entrez Refseq database; ‡ localisation of the peptide on the reference sequence (pre-proANP or pre-proADM) and mature ANP<sub>1-28</sub> or ADM<sub>1-52</sub> peptides, respectively.

### *BNP activity assay*

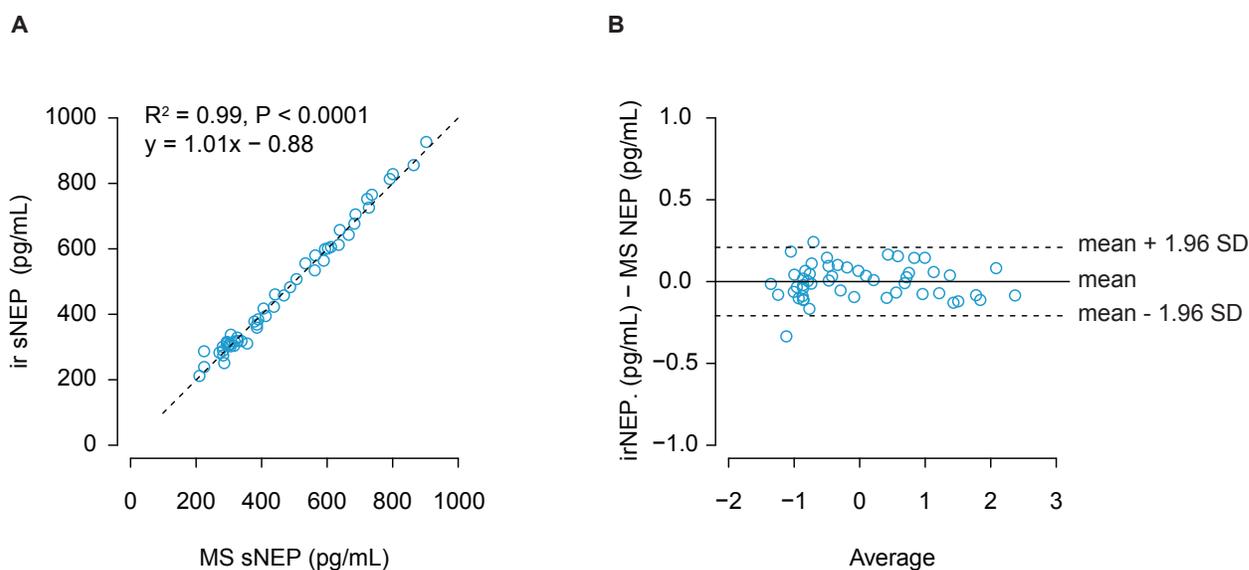
BNP activity assay was performed on HEK293 cells stably transfected by the ANP and BNP receptor NPRA, as previously described (1). Cells were incubated with the plasma samples of 30 patients at D0 and D30 for 20 minutes, before cGMP measurement by radioimmunoassay as previously described (2). In parallel, the plasma were depleted of BNP and proBNP by immunocapture using the monoclonal antibody 4BNP2 (Hyttest, Turku, Finland) and assayed to provide BNP-independent cGMP production. BNP-dependent cGMP production was calculated as the difference between the cGMP produced by the plasma and cGMP produced by the BNP/proBNP-depleted plasma.

### *Validation of circulating neprilysin ELISA.*

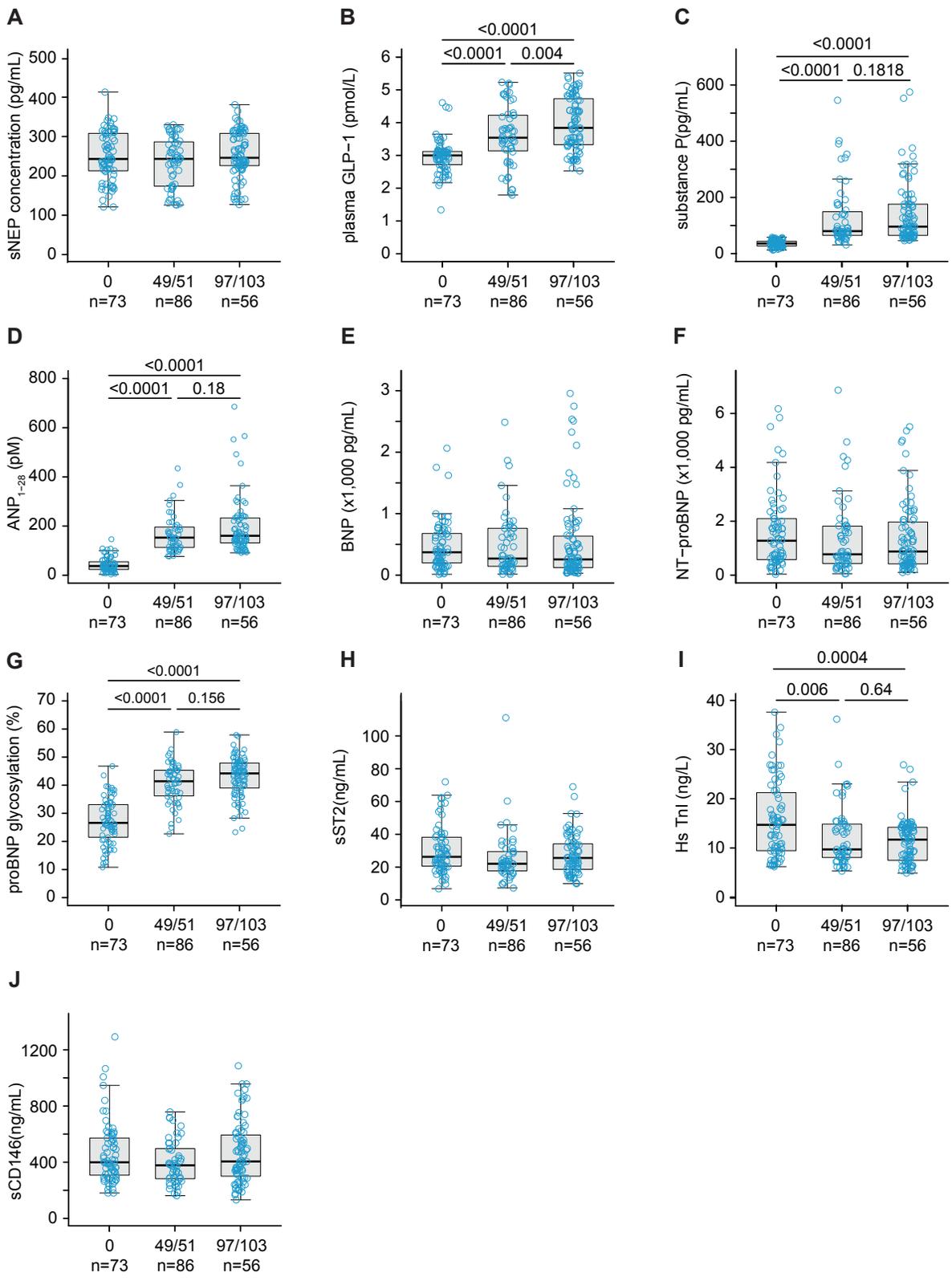
To validate the ELISA kit SEB785Hu from Uscn Life Science to measure circulating neprilysin, the plasma of 51 previously described patients (3) ranging from 212 pg/mL to 927 pg/mL (median: 395 [311 – 604]) were subjected in parallel to ELISA measurement and to mass spectrometry as described above. Correlation between the two measurements was performed by linear regression and Bland-Altman analysis.

## Supplementary references

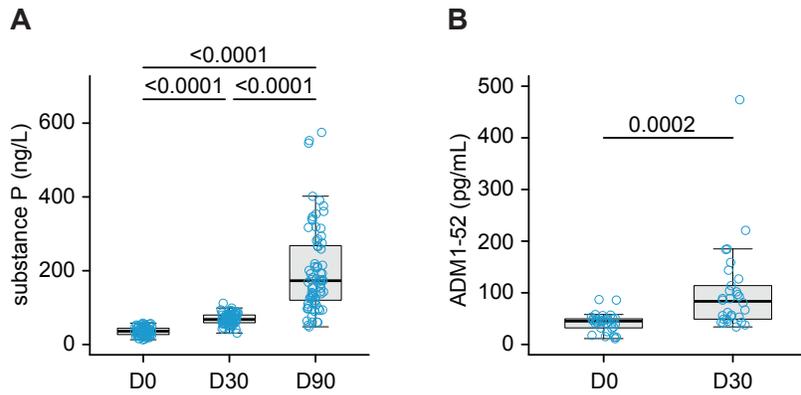
1. Chinkers M, Wilson EM. Ligand-independent oligomerization of natriuretic peptide receptors. Identification of heteromeric receptors and a dominant negative mutant. *The Journal of biological chemistry*. 1992 Sep 15; **267**(26):18589-18597.
2. Manivet P, Mouillet-Richard S, Callebert J, Nebigil CG, Maroteaux L, Hosoda S, Kellermann O, Launay JM. PDZ-dependent activation of nitric-oxide synthases by the serotonin 2B receptor. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Mar 31; **275**(13):9324-9331.
3. Vodovar N, Seronde MF, Laribi S, Gayat E, Lassus J, Januzzi JL, Jr., Boukef R, Noura S, Manivet P, Samuel JL, Logeart D, Cohen-Solal A, Richards AM, Launay JM, Mebazaa A, Network G. Elevated Plasma B-Type Natriuretic Peptide Concentrations Directly Inhibit Circulating Neprilysin Activity in Heart Failure. *JACC Heart Fail*. 2015 Aug; **3**(8):629-636.



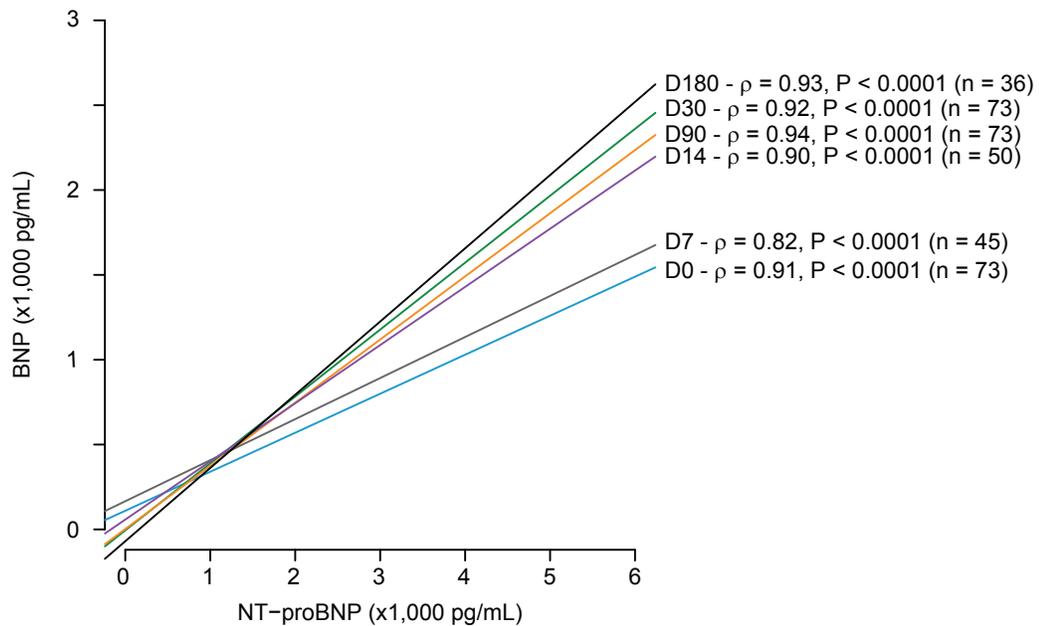
**Supplementary Figure 1:** (A) Comparison of soluble NEP plasma concentrations measured by the SEB785Hu ELISA kit from Usen Life Science (irNEP) and mass spectrometry (MS). (B) Bland-Altman analysis of the two methods (ELISA and mass spectrometry).



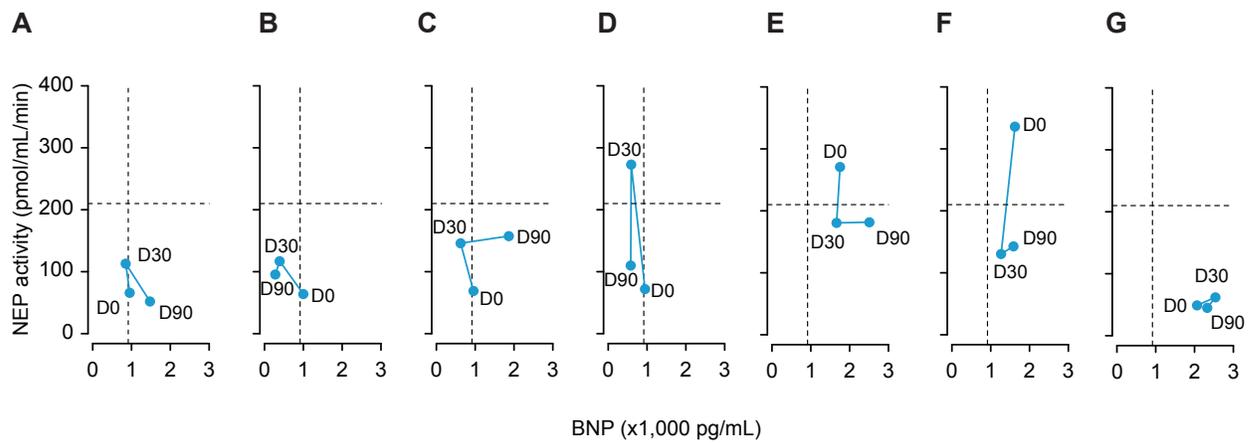
**Supplementary Figure 2:** Plasma concentrations of sNEP (A), GLP-1 (B), substance P (C), ANP<sub>1-28</sub> (D), BNP (E), NT-proBNP (F), proBNP glycosylation (G), sST2 (H), hsTnI (I), and sCD146 (J) according to the doses bid.



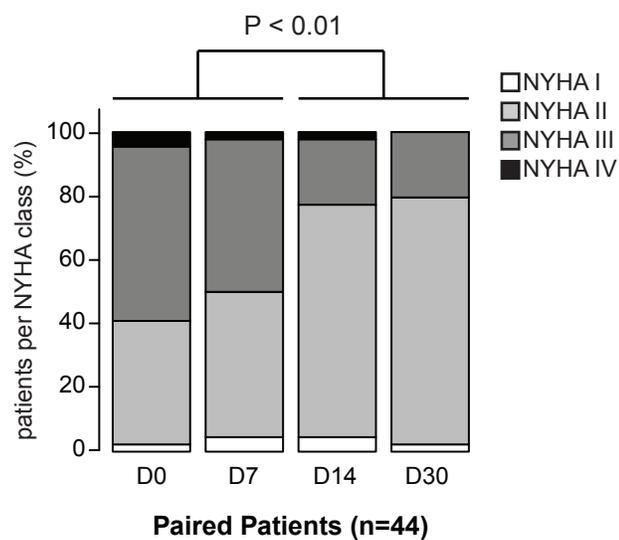
**Supplementary Figure 3:** Plasma concentrations of substance P at baseline, D30 and D90 (A), and bioactive adrenomedullin (ADM<sub>1-52</sub>) between D0 and D30 in a subset of 30 patients (B).



**Supplementary Figure 4:** Linear regression model for the distribution of BNP plasma levels according to NT-proBNP plasma levels at baseline (D0), D7, D14, D30, D90, and D180. Indicated on the left are Spearman's coefficient of correlation, P-value and number of patients for each time-point.



**Supplementary Figure 5:** temporal changes in sNEP activity and BNP plasma concentrations at baseline (D0), D30, and D90 in individual patients whose baseline BNP was > 916 pg/mL



**Figure 6:** Distribution of symptom severity according to the New York Heart Association (NYHA) classification between baseline and D30 for 44 patients for whom NYHA data were available for the four time points.

**Supplementary Table 1:** Analytical parameters of the assays used in this study (CV: coefficient of variation).

Assay	Intra-assay CV	Inter-assay CV	Limit of detection	Linearity range
BNP*	2.6%	4.7%	1.7 pg/mL	3-5000 pg/mL
NT-proBNP <sup>†</sup>	2.2%	3.7%	2.1 pg/mL	2-35000 pg/mL
T71 proBNP glycosylation	0.9%	5.0%	1%	1-100%
hsTnI <sup>‡</sup>	1.2%	3.8%	1.2 pg/mL	2-50000 pg/mL
NEP concentration	4.6%	7.3%	5 pg/mL	12-350 pg/mL
NEP activity	5.9%	8.7%	12 pmol/mL/min	25-700 pmol/mL/min
GLP-1	2.9%	7.1%	0.3 pmol/L	1-50 pmol/L
Substance P	2.86%	6.25%	1.56 pg/mL	3.8 – 2000 pg/mL
Fructosamine	1.97%	3.08%	13 pmol/mL	20 – 1800 pmol/mL
sCD146	6.3%	23%	10 ng/mL	100 - 1,600 ng/mL
sST2	2.1%	8.2%	1.8 ng/mL	3.1 - 200 ng/mL
ANP <sub>1-28</sub> <sup>§</sup>	3.2%	5.5%	0.47 pM	1 - 2000 pM
ADM <sub>1-52</sub> <sup>§</sup>	3.6%	5.9%	0.65 pM	2 – 1950 pM
cGMP	4.7%	6.5%	0.08 pmol/mg prot	0.1 – 50 pmol/mg prot

\* BNP ARCHITECT assay; <sup>†</sup> Elecsys® proBNP II kit; <sup>‡</sup> STAT high-sensitivity cardiac troponin I assay; <sup>§</sup> mass spectrometry assay

**Supplementary Table 2:** baseline values and 90 day-variations of biomarkers in patients with clinical or echocardiographic response to treatment with sacubitril/valsartan.

Variable	D0			Variation between D90 and D0		
	Delta < 0 (n = 31)	Delta ≥ 0 (n = 35)	P value	Delta < 0 (n = 31)	Delta ≥ 0 (n = 35)	P value
NYHA						
sNEPa (pmol/mL/min)	282.4 [210.5; 402.5]	384 [293; 471]	< <b>0.0001</b>	-48% [-68.1; -36.1]	-64.5% [-76.3; -49.7]	<b>0.003</b>
sNEPc (ng/L)	247 [218; 314]	237 [180; 274.5]	0.16	-0.9% [-7.6; 4.5]	-5.5% [-17.3; 12.7]	0.46
BNP (pg/mL)	367.5 [208; 674.5]	374 [146.3; 636.6]	0.65	-28.9% [-47.7; 27.2]	-2.3% [-45.1; 22.8]	0.74
NT-proBNP (pg/mL)	914.1 [556.6; 1913.2]	1305 [601; 1919.1]	0.92	-15.1% [-40.2; 8.8]	-9% [-45; 21.8]	0.54
T71 (%)	26.2 [22.4; 33.7]	26.2 [20.8; 29.9]	0.59	57.1% [41.2; 91.4]	65.9% [38.4; 117.6]	0.68
ANP <sub>1-28</sub> (pM)	41.6 [21.8;55]	34.3 [23.5;50.6]	0.32	421.1 % [281.9;733.3]	430.4 % [276;941.4]	0.78
hsTnI (ng/L)	16 [10.4; 20.7]	14.4 [9.2; 22.6]	0.75	-21.4% [-60.4; -4.4]	-30.9% [-55.8; -2.5]	0.87
sST2 (ng/mL)	26.8 [19.8; 42.3]	25.1 [20.7; 32.3]	0.58	-19.9% [-31.1; 6.8]	-4.8% [-14.2; 7.7]	0.20
sCD146 (ng/mL)	391.6 [293.8; 595]	408.3 [321.3; 543.1]	0.95	1.5% [-25.5; 37.8]	-27.5% [-38.7; -8.1]	<b>0.04</b>

Variable	D0			Variation between D90 and D0		
	Variation ≥ 10% (n = 32)	Variation < 10% (n = 39)	P value	Variation ≥ 10% (n = 32)	Variation < 10% (n = 39)	P value
LVEF (%)						
sNEPa (pmol/mL/min)	318 [258; 418.8]	341.2 [264.9; 443.5]	0.76	-50.9% [-67; -40.5]	-64.2% [-75.3; -46]	0.15
sNEPc (ng/L)	244.4 [210.5; 313.5]	243 [214; 296.1]	0.79	1.2% [-8.3; 13.3]	-5.5% [-15.9; 1.9]	0.06
BNP (pg/mL)	373.2 [183; 672.8]	378 [211; 734.4]	0.84	-39% [-62; 22.8]	1.3% [-33.2; 48.9]	0.07
NT-proBNP (pg/mL)	1311 [528.5; 1931.3]	1305 [626; 2147.8]	0.52	-16.5% [-58; 10.9]	-6.7% [-31.7; 17.7]	0.18
T71 (%)	28.4 [23.3; 35]	25.6 [20.6; 30.6]	0.14	49.1% [28; 78.3]	65.9% [41.5; 119.4]	0.07
ANP <sub>1-28</sub> (pM)	34.2 [20.6;44.2]	40 [26.9;63]	0.15	427.6 % [277.8;739.1]	413 % [188.5;967.8]	0.96
hsTnI (ng/L)	15.4 [9.4; 20.3]	14.7 [10.3; 22.6]	0.78	-26.8% [-58.2; -4.7]	-28% [-57.5; 2.8]	0.66
sST2 (ng/mL)	27.3 [20.3; 39.2]	26.9 [21.5; 37.1]	0.81	-9.9% [-29.7; 8]	-8.7% [-25.9; 7.7]	0.97
sCD146 (ng/mL)	422.3 [286.7; 611.8]	405.1 [325.4; 533.5]	0.63	-23.5% [-38.6; 30.8]	-8.1% [-32.8; 24.3]	0.39

Variable	D0			Variation between D90 and D0		
	Variation ≤ -10% (n = 47)	Variation > -10% (n = 23)	P value	Variation ≤ -10% (n = 47)	Variation > -10% (n = 23)	P value
LAVI (mL/m <sup>2</sup> )	341.2 [266.2; 425.3]	289 [248.7; 444.5]	0.61	-62.8% [-74.2; -44.7]	-53.5% [-68.1; -35.3]	0.27
sNEPa (pmol/mL/min)	242.4 [207; 283.8]	278.9 [223; 316.5]	0.2	-0.3% [-12.3; 13.3]	-0.9% [-9.3; 0.4]	0.44
sNEPc (ng/L)	367.5 [140.2; 582]	626 [232.6; 791.1]	0.06	-28.9% [-56.1; 22.1]	14.8% [-35.2; 48.9]	0.05
BNP (pg/mL)	1146 [542.1; 2181.5]	1606.6 [664; 2097.5]	0.38	-19.3% [-49.4; 5.3]	3% [-18.8; 17.7]	<b>0.03</b>
NT-proBNP (pg/mL)	25.9 [21.1; 30.9]	31 [24.3; 35.8]	0.09	61.7% [44.2; 115.6]	43% [31.9; 84.1]	0.20
T71 (%)	36.1 [23.6;53.5]	41.5 [17.4;60.8]	0.9	467.7 % [287.5;811.1]	314.3 % [163.5;988.6]	0.43
ANP <sub>1-28</sub> (pM)	15.2 [9.4; 20.1]	15.1 [10.5; 21.6]	0.51	-28.1% [-56.3; -0.6]	-29.1% [-62.6; -10.9]	0.51
hsTnI (ng/L)	26.8 [19; 38.3]	29.2 [23.2; 37.6]	0.31	-4.8% [-24.4; 8.3]	-13.9% [-30; 3.6]	0.24
sST2 (ng/mL)	377.4 [279.6; 504.1]	533.4 [378.4; 674.1]	<b>&lt; 0.0001</b>	-10.6% [-33.8; 21.2]	-12.6% [-34.8; 34]	0.74
sCD146 (ng/mL)						

Variable	D0			Variation between D90 and D0		
	Variation ≤ -10% (n = 37)	Variation > -10% (n = 16)	P value	Variation ≤ -10% (n = 37)	Variation > -10% (n = 16)	P value
E/e' ratio	297.2 [247; 417]	353.6 [270.1; 415.4]	0.4	-51.1% [-69.2; -40.8]	-60.3% [-69.9; -45.8]	0.53
sNEPa (pmol/mL/min)	239 [179; 275]	241.7 [215.5; 300]	0.57	-0.7% [-8; 13.4]	0.9% [-5.8; 12.5]	0.79
sNEPc (ng/L)	372.4 [199; 671]	257.6 [180.6; 653]	0.77	-33.3% [-61.9; 12.7]	14.2% [-15.6; 43.9]	<b>0.03</b>
BNP (pg/mL)	1146 [568.7; 2097.3]	790.4 [586.6; 1806.9]	0.71	-21.5% [-47.7; 8.1]	1% [-19.2; 21.7]	0.16
NT-proBNP (pg/mL)	26.2 [21.5; 33.1]	26.3 [23.1; 30.3]	0.97	57.1% [38.9; 110.7]	78.4% [45; 98.1]	0.77
T71 (%)	40.8 [23.9;75.4]	35.2 [22.8;45.9]	0.28	356 % [175.8;651.7]	427.6 % [298.5;1053.7]	0.30
ANP <sub>1-28</sub> (pM)	15.3 [9.9; 18]	15.1 [9.1; 22.1]	0.88	-21.6% [-56.7; -5.5]	-27.6% [-57.6; -4.4]	0.93
hsTnI (ng/L)	24.9 [19.3; 36.8]	29.7 [21.3; 39.5]	0.66	-13.9% [-30.3; 3.9]	1.2% [-29.2; 11.3]	0.49
sST2 (ng/mL)	389.4 [283; 525.9]	514.5 [312.3; 640.5]	0.22	-19.5% [-39.1; 1.7]	7.5% [-34.7; 46.1]	0.2
sCD146 (ng/mL)						

Variable	D0			Variation between D90 and D0		
	Variation ≥ 10% (n = 33)	Variation < 10% (n = 38)	P value	Variation ≥ 10% (n = 33)	Variation < 10% (n = 38)	P value
LVOT-VTI (cm)						
sNEPa (pmol/mL/min)	336 [260; 450]	338.6 [262; 426]	0.89	-57.5% [-66.3; -43.4]	-66.4% [-74.6; -38.9]	0.32
sNEPc (ng/L)	241 [214; 304.4]	249.7 [205; 307.7]	0.67	-0.9% [-11.3; 11.5]	-1.6% [-12.3; 4.8]	0.48
BNP (pg/mL)	431 [243; 678]	322.5 [195.4; 700.4]	0.25	-3.8% [-48.5; 32.1]	2.2% [-39.2; 24.6]	0.52
NT-proBNP (pg/mL)	1345 [578; 1962.2]	872.5 [597.5; 2315.7]	0.85	-14% [-42.3; 44.3]	-7.5% [-41.6; 9.9]	0.9
T71 (%)	28.5 [24.7; 33.6]	25.6 [19.9; 32.1]	0.24	53.8% [34.1; 82.9]	59.4% [39.4; 119.5]	0.30
ANP <sub>1-28</sub> (pM)	37 [20.8;45.3]	37.4 [24.3;61.4]	0.48	525.6 % [276.7;990.9]	417.7 % [203.5;718.7]	0.41
hsTnI (ng/L)	15.8 [10; 23.4]	14.4 [9.5; 17.8]	0.27	-30.3% [-60; -4.3]	-18.5% [-56.2; 3.1]	0.39
sST2 (ng/mL)	27.3 [22.8; 37.6]	27.3 [19.8; 38.3]	0.79	-14.8% [-30.5; 6.7]	-4.8% [-18.5; 8.2]	0.19
sCD146 (ng/mL)	410.8 [323; 533.5]	399.3 [294.6; 609.3]	0.81	-16.7% [-43.6; 35.9]	-9.4% [-31.5; 23.5]	0.45

Variable	D0			Variation between D90 and D0		
	Variation ≤ -10% (n = 43)	Variation > -10% (n = 16)	P value	Variation ≤ -10% (n = 43)	Variation > -10% (n = 16)	P value
RA-RV pressure gradient (mm Hg)						
sNEPa (pmol/mL/min)	329 [254.5; 436]	352 [272.1; 430.5]	0.56	-60.2% [-70; -42.1]	-67.6% [-77.1; -47.2]	0.12
sNEPc (ng/L)	241 [209.5; 295]	257.6 [217; 308]	0.56	0% [-9.5; 10.1]	-0.6% [-4.2; 8.8]	0.82
BNP (pg/mL)	367.5 [211; 669.8]	502 [251.6; 776.6]	0.27	8% [-45.2; 40.3]	8.1% [-30; 26.6]	0.59
NT-proBNP (pg/mL)	1372 [573.4; 2052.7]	1511.7 [716.5; 2566.6]	0.56	-9.8% [-31.8; 10.3]	-2.3% [-20.7; 32.7]	0.21
T71 (%)	25.9 [19.5; 32.8]	26.6 [23.5; 32]	0.55	59.1% [36.3; 117.6]	61.5% [35.9; 97]	0.81
ANP <sub>1-28</sub> (pM)	40.8 [21.1;63.8]	35.1 [30.4;41.5]	0.51	427.6 % [148.8;869.4]	341.2 % [277.8;605]	0.87
hsTnI (ng/L)	15.6 [10.7; 19.7]	11.6 [7.4; 24]	0.31	-29.2% [-57.2; -10.5]	-13.8% [-59.3; 13.2]	0.47
sST2 (ng/mL)	27.5 [22.4; 38.3]	23.2 [20.1; 36.7]	0.5	-10% [-27.3; 9.2]	0.4% [-33.4; 9.4]	0.91
sCD146 (ng/mL)	389.4 [291; 526.8]	433.8 [334.1; 766]	0.08	-8.7% [-30; 37]	-10.6% [-29.9; 8.3]	0.42

Legend: NYHA: New York Heart Association, LVEF: left ventricular ejection fraction, LAVI: left atrial volume index, LVOT-VTI: left ventricular outflow tract - velocity time integral, RA/RV: right atrium/right ventricle, sNEPa: soluble NEP activity, sNEPc: soluble NEP concentration, T71: proBNP glycosylated at threonine 71, hsTnI: hypersensitive troponin I, sST2: soluble form of the IL-33 receptor, sCD146: soluble cluster of differentiation 146.

## Partie 3 : DISCUSSION DES POINTS D'ACTUALITE DU SACUBITRIL/VALSARTAN

### 1. EFFETS DU SACUBITRIL/VALSARTAN SUR LES DONNEES ECHOCARDIOGRAPHIQUES

Concernant les résultats des données échocardiographiques des patients de notre étude sous sacubitril/valsartan, on retrouvait une très légère amélioration significative de la FEVG ( $p < 0,0001$ ), une amélioration de l'intégrale temps-vitesse (ITV) sous-aortique ( $p = 0,008$ ), une diminution des pressions pulmonaires avec réduction du gradient moyen du flux d'insuffisance tricuspide ( $p = 0,01$ ), mais aucune modification significative du volume de l'oreillette gauche ( $p = 0,24$ ) ou du rapport E/E' mitral ( $p < 0,0001$ ) à 6 mois de l'introduction du traitement.

Cependant, ces données échocardiographiques sont à analyser avec grande précaution car il ne s'agissait pas d'une étude randomisée, et les analyses de ces données n'étaient pas centralisées par un *core lab*.

Dans une étude récente non randomisée, **Martens P et al.** ont montré des effets bénéfiques du sacubitril/valsartan en termes de remodelage ventriculaire évalué en échocardiographie allant dans le même sens que les résultats de notre étude<sup>(65)</sup>. En effet, sur une cohorte de 125 patients avec un suivi médian de 4 mois l'introduction de sacubitril/valsartan s'accompagnait d'une amélioration significative de la FEVG ( $29,6 \pm 6\%$  vs  $34,8 \pm 6\%$ ;  $p < 0,001$ ), avec une réduction des volumes télé-diastolique et télé-systolique du VG (respectivement  $206 \pm 71$  mL vs.  $197 \pm 72$  mL;  $p = 0,027$  et  $47 \pm 57$  mL vs.  $129 \pm 55$  mL;  $p < 0,001$ ). De plus, le remodelage volumétrique était associé à une réduction du degré de régurgitation mitrale sur une échelle de 0 à 4 ( $1,59 \pm 1,0$  vs  $1,11 \pm 0,8$ ;  $p < 0,001$ ) et à une régression du profil mitral restrictif ( $47\%$  vs.  $23\%$ ;  $p = 0,004$ ). Par ailleurs, ce travail suggérait un effet « dose-dépendant » du sacubitril/valsartan avec une amélioration de la FEVG ( $p < 0,001$ ) pour des doses plus élevées de sacubitril/valsartan.

Enfin, de nombreuses études sont toujours en cours afin de préciser davantage le rôle du sacubitril/valsartan dans le remodelage ventriculaire gauche, tant sur l'IC à FEVG préservée avec l'essai **PARAGON-HF** (NCT01920711), que sur la cardiopathie ischémique post-infarctus avec l'essai **PARADISE-AMI** (NCT02924727).

## 2. QUEL DOSAGE DE BIOMARQUEUR DOIT-IL ETRE PRIVILEGIE ENTRE ANP ET BNP/NT-proBNP ?

Notre étude a montré que l'inhibition de la NEP par le sacubitril/valsartan se traduit par une augmentation de ses substrats tels que l'ANP. En effet, il est important de rappeler que la NEP ne dégrade que partiellement le BNP chez l'homme, alors qu'elle dégrade l'ANP.

Ainsi, le fait que dans nos résultats, l'ANP augmente de façon proportionnelle à l'inhibition de l'activité de la NEP, pourrait suggérer que l'ANP soit un marqueur pharmacologique de l'effet du sacubitril/valsartan, et donc un potentiel marqueur de bonne observance du traitement. Il est donc légitime de s'interroger sur l'intérêt de réaliser en routine un dosage de l'ANP plutôt que du BNP. Cependant, bien que ce dosage de l'ANP par un kit ELISA soit actuellement évalué en recherche, sa réalisation reste très complexe à mettre en place en routine du fait d'une demi-vie extrêmement courte<sup>(66)</sup>.

Une solution pourrait être le dosage déjà commercialisé du MR-proANP plus stable. En effet, notre équipe de recherche de Lariboisière a montré que le MR-proANP avait une meilleure valeur pronostique comparé au BNP à 5 ans de suivi (AUC 0,67 vs. 0,60;  $p=0,042$ ) avec une augmentation significative de la survie à 5 ans pour un taux plasmatique de MR-proANP  $\leq 416,8$  pmol/L<sup>(67)</sup>. Par ailleurs, dans une étude rétrospective portant sur 359 patients, **Odermatt *et al.*** ont montré que l'augmentation des taux de MR-proANP était associée à une augmentation de la mortalité toutes causes à 10 ans (HR 2,0 [IC à 95%: 1,3 à 3,1,  $p = 0,002$ ]; AUC 0,79)<sup>(68)</sup>. De plus, une étude cherchant à comparer la valeur diagnostique du MR-proANP à celle du NT-proBNP a montré qu'ils étaient comparables pour le diagnostic de l'IC aiguë chez des patients consultant pour dyspnée<sup>(69)</sup>.

## 3. INTERPRETATION DES DOSAGES DE BIOMARQUEURS SOUS SACUBITRIL/VALSARTAN

Chez les patients de notre cohorte traités par sacubitril/valsartan, nous n'avons observé aucun changement significatif de la concentration plasmatique du BNP par rapport à la valeur initiale, alors que la concentration plasmatique du NT-proBNP diminuait légèrement au cours du premier mois et restait stable par la suite.

Nos données concordent avec les observations de l'essai PARADIGM-HF<sup>(70)</sup> et confortent notre hypothèse précédente selon laquelle les variations de la glycosylation du proBNP, plutôt que la protection du BNP contre sa dégradation par la NEP, sont sans doute responsables de ce comportement différentiel du BNP et du NT-proBNP, dans un contexte de traitement par sacubitril<sup>(71)</sup>. Il est donc probable que la différence observée entre les mesures du BNP et du NT-proBNP soit principalement liée à des modifications qualitatives plutôt que quantitatives du proBNP, comme nous l'avions précédemment suggéré<sup>(71)</sup>.

Dans une étude ancillaire de l'étude princeps randomisée PARADIGM-HF, **Myhre *et al.*** ont tenté de répondre à la question de savoir quel serait le meilleur biomarqueur à utiliser pour surveiller les patients sous sacubitril/valsartan<sup>(72)</sup>. Ainsi, ils ont montré que le taux du BNP plasmatique peut augmenter de manière significative tôt après l'initiation du sacubitril/valsartan. En comparaison, le NT-proBNP entraîne moins de confusion clinique lorsqu'il est mesuré dans les 8 premières semaines suivant le début du traitement, n'étant pas un substrat de l'inhibition de la NEP. Cependant, après 8 semaines de traitement, l'un ou l'autre des biomarqueurs conserve une bonne valeur pronostique avec un risque d'aggravation clinique majoré en cas d'augmentation des taux de BNP ou de NT-proBNP plasmatiques ( $p = 0,003$ )<sup>(72)</sup>. Ainsi, même si les taux plasmatiques de BNP et NT-proBNP sont modifiés par l'introduction du traitement, il semble correct de continuer à suivre nos patients atteints d'IC avec ces marqueurs, à condition de connaître la valeur de référence du patient à l'état stable sous sacubitril/valsartan.

En réalité, cette question de savoir quel serait le meilleur biomarqueur à utiliser pour surveiller les patients sous sacubitril/valsartan reste encore discutée aujourd'hui. Cependant, un élément de réponse très attendu sera les résultats d'une grande étude prospective multicentrique toujours en cours, l'**étude PROVE-HF**<sup>(66)</sup>, ayant pour but d'évaluer la valeur pronostique des différents biomarqueurs de l'IC en termes d'amélioration des symptômes et du remodelage ventriculaire au sein d'une large cohorte de patients IC sous sacubitril/valsartan.

Afin de répondre à cette question du choix des biomarqueurs pertinents pour la surveillance d'un patient sous sacubitril/valsartan, il est important de tenir compte des données liées au remodelage ventriculaire et au développement de la fibrose myocardique, connus pour être de puissants facteurs pronostiques dans l'IC. Ainsi très récemment, dans une autre étude ancillaire de l'étude

PARADIGM-HF, **Zile *et al.*** suggèrent un rôle positif du sacubitril/valsartan sur les biomarqueurs spécifiques du remodelage et de la fibrose myocardique<sup>(73)</sup>. En effet, à l'introduction du sacubitril/valsartan, les biomarqueurs profibrotiques (Aldostérone, sST2, TIMP-1, Gal-3, PINP et PIIINP) étaient plus élevés et les biomarqueurs associés à la dégradation du collagène (MMP-2 et MMP-9) étaient inférieurs aux valeurs contrôles publiées dans la littérature. Cependant, 8 mois après la randomisation, l'Aldostérone, la sST2, le TIMP-1, la MMP-9, le PINP et le PIIINP avaient diminué davantage dans le groupe sacubitril/valsartan que dans le groupe énalapril. Enfin, les variations de sST-2 et TIMP-1 à 8 mois ont été associées à une amélioration clinique des patients<sup>(73)</sup>.

#### **4. EFFETS PLEIOMORPHES DU SACUBITRIL/VALSARTAN**

De nombreuses études suggèrent des effets pléiomorphes du sacubitril/valsartan avec probablement encore beaucoup de travaux à réaliser sur cette molécule.

En effet, sur la base de rapports antérieurs montrant que le sacubitril/valsartan améliore le contrôle glycémique<sup>(74)</sup>, notre équipe de recherche de Lariboisière avait fait l'hypothèse, à partir de la cohorte PARADIGM-HF, que le mécanisme impliqué était lié à l'augmentation du taux de GLP-1 induite par le sacubitril/valsartan<sup>(75)</sup>. Dans notre étude, nous avons montré une augmentation de GLP-1 dépendante du temps, associée à une diminution de la glycation des protéines (fructosamine) chez les patients diabétiques et non diabétiques, confirmant ainsi une action rapide du sacubitril/valsartan sur le contrôle glycémique de type « analogue GLP1 ». La corrélation modérée entre le GLP-1 et la fructosamine suggère toutefois l'implication de multiples mécanismes qu'il reste encore à explorer<sup>(76)</sup>.

Enfin, les résultats de notre étude suggèrent d'autres rôles à découvrir du sacubitril, avec notamment l'accumulation de l'adrénomédulline, de la substance P ou encore de l'Ag8-32 sous sacubitril/valsartan (résultats détaillés dans les *supplementary data* de notre article).

## CONCLUSIONS

L'IC est une des pathologies cardiovasculaires les plus fréquentes et constitue une des premières causes de morbi-mortalité dans le monde. Ainsi, améliorer la prise en charge et le pronostic des patients avec IC demeure un enjeu de santé publique majeur, avec des conséquences médico-économiques importantes. En effet, l'IC représente chaque année plus de 200 000 hospitalisations et un coût économique de 2,5 milliards d'euros en France, du fait du nombre important de réhospitalisations. Pour toutes ces raisons, la prise en charge de l'IC chronique doit être améliorée.

Ainsi, l'apparition du sacubitril/valsartan offre une nouvelle perspective thérapeutique pour ces patients, avec comme nouvelle cible l'inhibition de la NEP. En effet, l'étude randomisée *PARADIGM-HF* a démontré la supériorité du sacubitril/valsartan comparé à l'énalapril en termes de mortalité cardiovasculaire et de réhospitalisations pour IC, dans le traitement de fond des patients IC à FEVG altérée. Cependant, devant toute nouvelle molécule, des questions subsistent tant sur son mode d'action, ses effets secondaires, que sur les méthodes de surveillance à appliquer en pratique quotidienne, avec notamment la question du biomarqueur idéal à utiliser. Ainsi, notre étude visant à évaluer les effets du sacubitril/valsartan sur l'activité de la NEP, le métabolisme des peptides natriurétiques dans l'IC chronique, a montré que l'introduction de sacubitril/valsartan était associée à une diminution rapide et forte de l'activité de la NEP soluble, avec une réduction modérée du NT-proBNP, mais un taux plasmatique de BNP inchangé. Cependant, ces données remettent en cause l'explication mécanistique actuelle des effets bénéfiques du sacubitril/valsartan sur l'IC chronique. En effet, les résultats de notre étude suggèrent une augmentation progressive de la relation entre le BNP et le NT-proBNP, avec une forte corrélation de cette relation au degré de glycosylation du proBNP en position Thréonine 71 (T71).

Par ailleurs, notre étude cherchait à étudier les effets pléiomorphes du sacubitril, avec notamment la mise en évidence d'une amélioration du métabolisme du glucose par un effet analogue GLP-1. Or, comme nous venons de le voir les effets pléiomorphes du sacubitril semblent nombreux, avec encore beaucoup de travaux à réaliser sur cette molécule qui n'a peut-être pas encore livré tous ses mystères...

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Metra M, Teerlink JR. Heart failure. *Lancet Lond Engl.* 28 oct 2017;390(10106):1981-95.
2. van Riet EES, Hoes AW, Wagenaar KP, Limburg A, Landman MAJ, Rutten FH. Epidemiology of heart failure: the prevalence of heart failure and ventricular dysfunction in older adults over time. A systematic review. *Eur J Heart Fail.* mars 2016;18(3):242-52.
3. Braunwald E. The war against heart failure: the Lancet lecture. *Lancet Lond Engl.* 28 févr 2015;385(9970):812-24.
4. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, 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.* 14 2016;37(27):2129-200.
5. Linicus Y, Laufs U. [Epidemiology, etiology and pathophysiology of heart failure]. *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten.* Jan 2016;39(1):10-12.
6. Peretti C, Pérel C, Tuppin P, Iliou MC, Juillièrre Y, gabet A, et al. Prévalences et statut fonctionnel des cardiopathies ischémiques et de l'insuffisance cardiaque dans la population adulte en France : apports des enquêtes déclaratives « Handicap-Santé ». *Bull Epidémiol Hebd.* 2014;(9-10):172-81.
7. Mika D, Leroy J, Fischmeister R, Vandecasteele G. [Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases type 3 and 4 in cardiac excitation-contraction coupling and arrhythmias]. *Med Sci MS.* juill 2013;29(6-7):617-22.
8. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet Lond Engl.* 12 juin 1999;353(9169):2001-7.
9. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet Lond Engl.* 2 janv 1999;353(9146):9-13.
10. CONSENSUS Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med.* 04 1987;316(23):1429-35.
11. SOLVD Investigators, Yusuf S, Pitt B, Davis CE, Hood WB, Cohn JN. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N Engl J Med.* 01 1991;325(5):293-302.
12. McMurray JJV. CONSENSUS to EMPHASIS: the overwhelming evidence which makes blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system the cornerstone of therapy for systolic heart failure. *Eur J Heart Fail.* sept 2011;13(9):929-36.
13. Gandhi PU, Motiwala SR, Belcher AM, Gaggin HK, Weiner RB, Baggish AL, et al. Galectin-3 and mineralocorticoid receptor antagonist use in patients with chronic heart failure due to left ventricular systolic dysfunction. *Am Heart J.* mars 2015;169(3):404-411.e3.
14. Fryer RM, Segreti J, Banfor PN, Widomski DL, Backes BJ, Lin CW, et al. Effect of bradykinin metabolism inhibitors on evoked hypotension in rats: rank efficacy of enzymes associated with bradykinin-mediated angioedema. *Br J Pharmacol.* mars 2008;153(5):947-55.
15. Blumberg AL, Denny SE, Marshall GR, Needleman P. Blood vessel-hormone interactions: angiotensin, bradykinin, and prostaglandins. *Am J Physiol.* mars

- 1977;232(3):H305-310.
16. van Vark LC, Bertrand M, Akkerhuis KM, Brugts JJ, Fox K, Mourad J-J, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce mortality in hypertension: a meta-analysis of randomized clinical trials of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors involving 158,998 patients. *Eur Heart J.* août 2012;33(16):2088-97.
  17. Berne RM, Levy MN. *Principle of Physiology*. Third ed. Paris: Elsevier's Health science; 2015.
  18. Reyes AJ, Taylor SH. Diuretics in cardiovascular therapy: the new clinicopharmacological bases that matter. *Cardiovasc Drugs Ther* 1999;13:371-98.
  19. Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M, et al. Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation.* juill 1994;90(1):195-203.
  20. Potter LR. Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation. *FEBS J.* juin 2011;278(11):1808-17.
  21. Vodovar N, Séronde M-F, Laribi S, Gayat E, Lassus J, Boukef R, et al. Post-translational modifications enhance NT-proBNP and BNP production in acute decompensated heart failure. *Eur Heart J.* 21 déc 2014;35(48):3434-41.
  22. Vodovar N, Séronde M-F, Laribi S, Gayat E, Lassus J, Januzzi JL, et al. Elevated Plasma B-Type Natriuretic Peptide Concentrations Directly Inhibit Circulating Neprilysin Activity in Heart Failure. *JACC Heart Fail.* août 2015;3(8):629-36.
  23. Goetze JP, Hansen LH, Terzic D, Zois NE, Albrethsen J, Timm A, et al. Atrial natriuretic peptides in plasma. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 30 mars 2015;443:25-8.
  24. Hunt PJ, Richards AM, Espiner EA, Nicholls MG, Yandle TG. Bioactivity and metabolism of C-type natriuretic peptide in normal man. *J Clin Endocrinol Metab.* juin 1994;78(6):1428-35.
  25. Stein BC, Levin RI. Natriuretic peptides: physiology, therapeutic potential, and risk stratification in ischemic heart disease. *Am Heart J.* mai 1998;135(5 Pt 1):914-23.
  26. Mier PD, van den Hurk JJ. Lysosomal hydrolases of the epidermis. I. Glycosidases. *Br J Dermatol.* juill 1975;93(1):1-10.
  27. Baxter GF. The natriuretic peptides. *Basic research in cardiology.* Mar 2004;99(2):71-75.
  28. Cauliez B, Berthe MC, Lavoigne A. [Brain natriuretic peptide: physiological, biological and clinical aspects]. *Ann Biol Clin (Paris).* févr 2005;63(1):15-25.
  29. Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature.* 3 mars 1988;332(6159):78-81.
  30. Wang TJ, Larson MG, Levy D, Leip EP, Benjamin EJ, Wilson PWF, et al. Impact of age and sex on plasma natriuretic peptide levels in healthy adults. *Am J Cardiol.* 1 août 2002;90(3):254-8.
  31. Sarzani R, Dessi-Fulgheri P, Paci VM, Espinosa E, Rappelli A. Expression of natriuretic peptide receptors in human adipose and other tissues. *J Endocrinol Invest.* oct 1996;19(9):581-5.
  32. Kalra PR, Clague JR, Bolger AP, Anker SD, Poole-Wilson PA, Struthers AD, et al. Myocardial production of C-type natriuretic peptide in chronic heart failure. *Circulation.* 4 févr 2003;107(4):571-3.
  33. Singh JSS, Burrell LM, Cherif M, Squire IB, Clark AL, Lang CC. Sacubitril/valsartan: beyond natriuretic peptides. *Heart Br Card Soc.* 2017;103(20):1569-77.
  34. Volpe M. Natriuretic peptides and cardio-renal disease. *Int J Cardiol.* 20 oct

- 2014;176(3):630-9.
35. Rubattu S, Sciarretta S, Valenti V, Stanzione R, Volpe M. Natriuretic peptides: an update on bioactivity, potential therapeutic use, and implication in cardiovascular diseases. *Am J Hypertens.* juill 2008;21(7):733-41.
  36. Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, et al. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest.* avr 1991;87(4):1402-12.
  37. Biosite, Inc. Triage BNP package insert. San Diego : Biosite Inc, 2002.
  38. Roche Diagnostics. ProBNP package insert. Indianapolis : Roche Diagnostics, 2002.
  39. McMurray J, Struthers AD. Effects of angiotensin II and atrial natriuretic peptide alone and in combination on urinary water and electrolyte excretion in man. *Clin Sci Lond Engl* 1979. avr 1988;74(4):419-25.
  40. Tsutamoto T, Kanamori T, Morigami N, Sugimoto Y, Yamaoka O, Kinoshita M. Possibility of downregulation of atrial natriuretic peptide receptor coupled to guanylate cyclase in peripheral vascular beds of patients with chronic severe heart failure. *Circulation.* janv 1993;87(1):70-5.
  41. Potter LR, Garbers DL. Dephosphorylation of the guanylyl cyclase-A receptor causes desensitization. *J Biol Chem.* 25 juill 1992;267(21):14531-4.
  42. Hirata Y, Emori T, Ohta K, Shichiri M, Marumo F. Vasoconstrictor-induced heterologous down-regulation of vascular atrial natriuretic peptide receptor. *European journal of pharmacology.* May 30 1989;164(3):603-606.
  43. Ibebuogu UN, Gladysheva IP, Hounq AK, Reed GL. Decompensated heart failure is associated with reduced corin levels and decreased cleavage of pro-atrial natriuretic peptide. *Circ Heart Fail.* mars 2011;4(2):114-20.
  44. Miller WL, Phelps MA, Wood CM, Schellenberger U, Van Le A, Perichon R, et al. Comparison of mass spectrometry and clinical assay measurements of circulating fragments of B-type natriuretic peptide in patients with chronic heart failure. *Circ Heart Fail.* mai 2011;4(3):355-60.
  45. Shuhaibar LC, Robinson JW, Vigone G, Shuhaibar NP, Egbert JR, Baena V, et al. Dephosphorylation of the NPR2 guanylyl cyclase contributes to inhibition of bone growth by fibroblast growth factor. *eLife [Internet].* 4 déc 2017 [cité 30 oct 2018];6. Disponible sur: <https://elifesciences.org/articles/31343>
  46. Dandamudi S, Chen HH. The ASCEND-HF trial: an acute study of clinical effectiveness of nesiritide and decompensated heart failure. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* mai 2012;10(5):557-63.
  47. Armstrong PW, Rouleau J-L. A Canadian context for the Acute Study of Clinical Effectiveness of Nesiritide and Decompensated Heart Failure (ASCEND-HF) trial. *Can J Cardiol.* juill 2008;24 Suppl B:30B-2B.
  48. Northridge DB, Newby DE, Rooney E, Norrie J, Dargie HJ. Comparison of the short-term effects of candoxatril, an orally active neutral endopeptidase inhibitor, and frusemide in the treatment of patients with chronic heart failure. *American heart journal.* Dec 1999;138(6 Pt 1):1149-1157.
  49. Rouleau JL, Pfeiffer MA, Stewart DJ, Isaac D, Sestier F, Kerut EK, et al. Comparison of vasopeptidase inhibitor, omapatrilat, and lisinopril on exercise tolerance and morbidity in patients with heart failure: IMPRESS randomised trial. *Lancet Lond Engl.* 19 août 2000;356(9230):615-20.

50. Kostis JB, Packer M, Black HR, Schmieder R, Henry D, Levy E. Omapatrilat and enalapril in patients with hypertension: the Omapatrilat Cardiovascular Treatment vs. Enalapril (OCTAVE) trial. *Am J Hypertens.* févr 2004;17(2):103-11.
51. Ferro CJ, Spratt JC, Haynes WG, Webb DJ. Inhibition of neutral endopeptidase causes vasoconstriction of human resistance vessels in vivo. *Circulation.* 16 juin 1998;97(23):2323-30.
52. Jessup M. Neprilysin inhibition--a novel therapy for heart failure. *N Engl J Med.* 11 sept 2014;371(11):1062-4.
53. Gu J, Noe A, Chandra P, Al-Fayoumi S, Ligueros-Saylan M, Sarangapani R, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of LCZ696, a novel dual-acting angiotensin receptor-neprilysin inhibitor (ARNi). *J Clin Pharmacol.* avr 2010;50(4):401-14.
54. McMurray JJV, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, et al. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med.* 11 sept 2014;371(11):993-1004.
55. McMurray JJV, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, et al. Dual angiotensin receptor and neprilysin inhibition as an alternative to angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with chronic systolic heart failure: rationale for and design of the Prospective comparison of ARNI with ACEI to Determine Impact on Global Mortality and morbidity in Heart Failure trial (PARADIGM-HF). *Eur J Heart Fail.* sept 2013;15(9):1062-73.
56. Yandrapalli S, Aronow WS, Mondal P, Chabbott DR. Limitations of Sacubitril/Valsartan in the Management of Heart Failure. *Am J Ther.* avr 2017;24(2):e234-9.
57. European Medicines Agency. Summary of the risk management plan (RMP) for Entresto(sacubitril/valsartan) [Internet]. 2015 [cité 2 avril 2019]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/entresto>.
58. Velazquez EJ, Morrow DA, DeVore AD, Duffy CI, Ambrosy AP, McCague K, et al. Angiotensin-Neprilysin Inhibition in Acute Decompensated Heart Failure. *N Engl J Med.* 07 2019;380(6):539-48.
59. Kałużna-Oleksy M, Kolasa J, Migaj J, Pawlak A, Lelonek M, Nessler J, et al. Initial clinical experience with the first drug (sacubitril/valsartan) in a new class - angiotensin receptor neprilysin inhibitors in patients with heart failure with reduced left ventricular ejection fraction in Poland. *Kardiol Pol.* 2018;76(2):381-7.
60. Vincenzi A, Cesana F, Cirò A, Garatti L, Achilli F. Sacubitril/Valsartan in « Field Practice » Patients with Advanced Heart Failure: A Monocentric Italian Experience. *Cardiology.* 2017;138 Suppl 1:13-6.
61. Senni M, McMurray JJV, Wachter R, McIntyre HF, Reyes A, Majercak I, et al. Initiating sacubitril/valsartan (LCZ696) in heart failure: results of TITRATION, a double-blind, randomized comparison of two uptitration regimens. *Eur J Heart Fail.* 2016;18(9):1193-202.
62. Bastien N, Haddad HB, S., Ignaszewski A, Searles G. The parasail study: patient reported outcomes from the canadian real world experience use of sacubitril/valsartan in patients with heart failure and reduced ejection fraction. *The Canadian journal of cardiology.* 2017;33(12):162-163.
63. Nazzari HY, M., Marceau A, Luong M, Clark CA, S., Knoll J, Virani ST, N. Left ventricular fonction improves in heart failure patients treated with sacubitril- valsartan. *The Canadian journal of cardiology.* 2017;33(10):162-163.
64. Pandey AC, S., Verma S. The impact of arni therapy on LV systolic function as measured

- by 2-d echocardiography : a 1 year case series. *The Canadian journal of cardiology*. 2017;33(10):161-162.
65. Martens P, Beliën H, Dupont M, Vandervoort P, Mullens W. The reverse remodeling response to sacubitril/valsartan therapy in heart failure with reduced ejection fraction. *Cardiovasc Ther*. août 2018;36(4):e12435.
  66. Januzzi JL, Butler J, Fombu E, Maisel A, McCague K, Piña IL, et al. Rationale and methods of the Prospective Study of Biomarkers, Symptom Improvement, and Ventricular Remodeling During Sacubitril/Valsartan Therapy for Heart Failure (PROVE-HF). *Am Heart J*. 2018;199:130-6.
  67. Seronde M-F, Gayat E, Logeart D, Lassus J, Laribi S, Boukef R, et al. Comparison of the diagnostic and prognostic values of B-type and atrial-type natriuretic peptides in acute heart failure. *Int J Cardiol*. 9 oct 2013;168(4):3404-11.
  68. Odermatt J, Hersberger L, Bolliger R, Graedel L, Christ-Crain M, Briel M, et al. The natriuretic peptide MR-proANP predicts all-cause mortality and adverse outcome in community patients: a 10-year follow-up study. *Clin Chem Lab Med*. 28 août 2017;55(9):1407-16.
  69. Darche FF, Baumgärtner C, Biener M, Müller-Hennessen M, Vafaie M, Koch V, et al. Comparative accuracy of NT-proBNP and MR-proANP for the diagnosis of acute heart failure in dyspnoeic patients. *ESC Heart Fail*. août 2017;4(3):232-40.
  70. Packer M, McMurray JJV, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, et al. Angiotensin receptor neprilysin inhibition compared with enalapril on the risk of clinical progression in surviving patients with heart failure. *Circulation*. 6 janv 2015;131(1):54-61.
  71. Jaffe AS, Apple FS, Mebazaa A, Vodovar N. Unraveling N-terminal pro-B-type natriuretic peptide: another piece to a very complex puzzle in heart failure patients. *Clin Chem*. août 2015;61(8):1016-8.
  72. Myhre PL, Vaduganathan M, Claggett B, Packer M, Desai AS, Rouleau JL, et al. B-Type Natriuretic Peptide During Treatment With Sacubitril/Valsartan: The PARADIGM-HF Trial. *J Am Coll Cardiol*. 26 mars 2019;73(11):1264-72.
  73. Zile MR, O'Meara E, Claggett B, Prescott MF, Solomon SD, Swedberg K, et al. Effects of Sacubitril/Valsartan on Biomarkers of Extracellular Matrix Regulation in Patients With HFrEF. *J Am Coll Cardiol*. 26 févr 2019;73(7):795-806.
  74. Seferovic JP, Claggett B, Seidelmann SB, Seely EW, Packer M, Zile MR, et al. Effect of sacubitril/valsartan versus enalapril on glycaemic control in patients with heart failure and diabetes: a post-hoc analysis from the PARADIGM-HF trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017;5(5):333-40.
  75. Vodovar N, Nogue H, Launay JM, Solal AC, Logeart D. Sacubitril/valsartan in PARADIGM-HF. *The lancet Diabetes & endocrinology* 2017;5:495-496.
  76. Giamouzis G, Butler J. Glycaemic control in heart failure: a PARADIGM shift for patients with concomitant diabetes? *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017;5(5):314-5.

## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

AMM : Autorisation de mise sur le marché  
ANP : Atrial natriuretic peptide  
ARA2 : Antagoniste du récepteur de l'angiotensine 2  
BNP : Brain natriuretic peptide  
DAI : Défibrillateur automatique implantable  
ENac : Canal sodé épithélial  
ESC : European Society of Cardiology  
FA : Fibrillation atriale  
FC : Fréquence cardiaque  
FEVG : Fraction d'éjection ventriculaire gauche  
FV : Fibrillation ventriculaire  
GICC : Groupe Insuffisance Cardiaque et Cardiomyopathies  
GMPc : GMP cyclique  
GTP : Guanosine triphosphate  
GICC : Groupe Insuffisance Cardiaque et Cardiomyopathies  
GMPc : GMP cyclique  
GTP : Guanosine triphosphate  
HVG : Hypertrophie ventriculaire gauche  
IC : Insuffisance cardiaque  
IEC : Inhibiteur de l'enzyme de conversion  
ITV : Intégrale temps-vitesse  
LCZ696 : inhibiteur de l'angiotensine et de la néprilysine avec association de sacubitril / valsartan  
NEP : Néprilysine  
NPR-A : Récepteur natriurétique de type A  
NPR-B : Récepteur natriurétique de type B  
NPR-C : Récepteur responsable de la clairance des peptides natriurétiques  
NT-pro-BNP : N-terminal pro-B natriuretic peptide  
NYHA : New York Heart Association

OG : Oreillette gauche

PN : Peptide natriurétique

RAA : Rénine-angiotensine

SFC : Société Française de Cardiologie

SRAA : Système rénine-angiotensine-aldostérone

TV : Tachycardie ventriculaire

## Résumé en français

**Objectif :** Cette étude visait à évaluer les effets du sacubitril/valsartan (LCZ696) sur l'activité de la néprilysine (NEP), le métabolisme des peptides natriurétiques dans l'insuffisance cardiaque chronique (ICC) et à fournir des informations supplémentaires sur le mode d'action du médicament.

**Méthodes et résultats :** Nous avons recruté 73 patients souffrant d'ICC chez qui nous avons introduits le LCZ696 en remplacement de l'IEC ou ARA2 préalable. En plus de l'évaluation clinique et échocardiographique, les biomarqueurs plasmatiques ont été mesurés avant introduction du LCZ696 puis à J3 et J90 après le début du traitement. L'introduction de LCZ696 a été associée à une diminution, liée à la dose, de l'activité de la néprilysine soluble (sNEP), tandis que la concentration en sNEP n'était pas modifiée. L'inhibition de la NEP se traduit par une augmentation de ses substrats tels que le peptide natriurétique auriculaire (ANP), la substance P et le peptide 1 semblable au glucagon, ce dernier se traduisant par une diminution de la fructosamine. Les taux de Troponine cardiaque et de ST2 soluble, ainsi que les biomarqueurs de la sévérité de l'ICC non liés au métabolisme de la NEP ont également diminué. Malgré une augmentation d'environ 4 fois de l'ANP, nous n'avons observé aucune modification du peptide natriurétique cérébral (BNP) et de l'activité du BNP plasmatique, et une légère diminution de la concentration du proBNP N-terminal (NT-proBNP). Enfin, nous avons trouvé une augmentation progressive de la relation entre le BNP et le NT-proBNP, fortement corrélée à une augmentation de la glycosylation du proBNP ( $R^2 = 0,94$ ).

**Conclusion :** Le LCZ696 a rapidement et fortement réduit l'activité de la sNEP, amélioré le métabolisme du glucose en partie *via* l'augmentation du GLP-1 et modérément réduit le NT-proBNP tout en laissant le BNP plasmatique inchangé. Ces données remettent en cause l'explication mécanistique actuelle des effets bénéfiques du LCZ696 sur l'ICC.

## Titre en anglais

**Effects of sacubitril/valsartan on neprilysin targets and the metabolism of natriuretic peptides in chronic heart failure: a mechanistic clinical study**

## Résumé en anglais

**Aim:** This study aimed at evaluating the effects of sacubitril/valsartan on neprilysin (NEP), and the metabolism of natriuretic peptides in heart failure (HF) and providing additional mechanistic information on the mode of action of the drug.

**Methods and Results:** We enrolled 73 chronic HF patients who were switched from angiotensin-converting enzyme inhibitor or angiotensin receptor blocker to sacubitril/valsartan. In addition to clinical and echocardiographic assessment, plasma biomarkers were measured at baseline, day 30 and day 90 after initiation of treatment. Sacubitril/valsartan led to decrease in New York Heart Association class and improvement of echocardiographic parameters, as well as a dose-dependent decrease in soluble NEP (sNEP) activity, while sNEP concentration remained unchanged. Neprilysin inhibition translated into an increase in its substrates such as atrial natriuretic peptide (ANP), substance P, and glucagon-like peptide 1, the latter translating into a decrease in fructosamine. Cardiac troponin and soluble ST2 levels, biomarkers of HF severity unrelated to NEP metabolism also decreased. While there was a ~4-fold increase in ANP, we observed no change in plasma brain natriuretic peptide (BNP) and plasma BNP activity, and a mild decrease in N-terminal proBNP (NT-proBNP) concentrations. Finally, we found a progressive increase in the relationship between BNP and NT-proBNP, which strongly correlated with an increase in T71 proBNP glycosylation ( $R^2 = 0.94$ ).

**Conclusion:** Sacubitril/valsartan rapidly and strongly reduced sNEP activity, leading to an increase in levels of NEP substrates. These data suggest a pleiotropic favourable impact of sacubitril/valsartan on the metabolism of HF patients with ANP rather than BNP as major effectors amongst natriuretic peptides.

## Mots-clés en français

Sacubitril/valsartan – Néprilysine – ANP – Peptides natriurétiques de type B – Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection ventriculaire gauche réduite

## Mots-clés en anglais

Sacubitril/valsartan • Neprilysin • Atrial natriuretic peptide • Brain natriuretic peptide • Heart failure with reduced ejection fraction

**Laboratoire d'accueil de la thèse :** Inserm UMR-S 942, Lariboisière Hospital, Paris, France  
**Adresse :** 2, rue Ambroise Paré 75475 Cedex 10.